

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Sledování vybraných parametrů v buvolím mléce

Diplomová práce

Bc. Eliška Rubešová

Výživa a potraviny

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

Konzultant: Ing. Soňa Formánková Herman

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze, dne 19.4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Veronice Legarové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce za její odborné rady. Dále velmi děkuji Ing. Soně Formánkové Herman, mé konzultantce, za její trpělivost, pozitivní a ochotný přístup, který mně pomohl při zkompletování mé práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Ing. Elišce Třešňákové, mé study buddy, která mě provedla nejedním těžkým zkouškovým obdobím a motivovala mě dokončit toto studium. Děkuji také své rodině, která mě psychicky podporovala a pomáhala s korekcí této práce.

Sledování vybraných parametrů v buvolím mléce

Souhrn

Po tisíce let bylo mléko základem lidské stravy díky svému komplexnímu nutričnímu profilu, který zahrnuje veškeré esenciální aminokyseliny, vhodný obsah tuku, sacharidů, vitamíny rozpustné v tucích i vodě. Vápník je jeho hlavní složkou z minerálních látek, následován fosforem a hořčíkem. Rozdíly ve složení mléka jsou odrazem genetických dispozic, klimatických podmínek, typem krmiva, plemena a taktéž krmiva či způsobu chovu.

Rostoucí poptávka po rozmanitých potravinách je hnací silou vzniku nových drobných chovů, ne příliš známých druhů hospodářských zvířat pro účely zpracování mléka. V roce 2017 přesáhla celosvětová populace buvolů 200 milionů a je stále na druhé pozici v produkci mléka hned za mlékem kravským, přičemž 97 % buvolů se nacházelo v Asii – 56 % v Indii, 19 % v Pákistánu, 11 % v Číně, kde se buvol přirozeně vyskytuje a chová, podobně jako například v České republice krávy. Pouze 3 % populace buvolů byla rozprostřena na ostatních kontinentech. V Evropě se s buvolem můžeme setkat tradičně v Itálii, odkud pochází mnoho známých výrobků jako je mozzarella di Bufala, ricotta či provola. V dalších evropských zemích se buvol vyskytuje v Rumunsku a Bulharsku. V současné době se zpracováním buvolího mléka a produkcí sezónních výrobků z něj zabývají pouze dvě farmy v České republice.

Složením se kravské a buvolí mléko liší v obsahu tuku, který je až dvojnásobně vyšší, než u mléka kravského, s čímž souvisí i vyšší obsah sušiny. Další parametry jako je obsah bílkovin, laktózy, vitamínů či minerálních látek je s kravským mlékem srovnatelný či mírně vyšší.

V této práci bylo cílem komparovat obsah vybraných složek, konkrétně laktózy a citrónové kyseliny v buvolím mléce s mlékem kravským pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s DAD WR detektorem a zároveň porovnat výsledky přeměřené na přístroji MilkoScan FT 120.

V praktické části bylo analyzováno 20 vzorků syrového buvolího mléka odebraných z farmy Ohař a 10 vzorků syrového kravského mléka z farmy Struhy pro porovnání. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem DAD WR byla zvolena z důvodu časové nenáročnosti, přesnosti a automatizovatelnosti.

Výsledky chromatografického měření neprokázaly statisticky významný rozdíl v obsahu laktózy mezi vzorky buvolího a kravského mléka, oproti tomu byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v obsahu citrónové kyseliny v těchto vzorcích. U měření přístrojem MilkoScan FT 120 tomu bylo právě naopak. Problematickým aspektem při porovnávání chromatografie a MilkoScanu je fakt, že chromatografie měří obsah čisté laktózy, zatímco MilkoScan stanovuje celkový obsah sacharidů ve vzorku a hodnoty jsou vyšší. Metoda chromatografie má do budoucna velký potenciál při zkoumání složení obsahu složek v mléce.

Klíčová slova: buvolí mléko, složky, kvalita, sýr, mikrobiologie.

Monitoring of selected parameters in buffalo milk

Summary

For thousands of years, milk has been a staple of the human diet due to its complex nutritional profile, which includes all essential amino acids, high fat, carbohydrate, fat-soluble and water-soluble vitamins. Calcium is its main mineral component, followed by phosphorus and magnesium. Differences in the composition of milk reflect genetic disposition, climatic conditions, type of feed, breed and also the feed or farming method.

The growing demand for a variety of foods is driving the emergence of new small-scale farming, not well known species of livestock for milk processing purposes. In 2017, the global buffalo population exceeded 200 million and is still second only to cows in milk production, with 97% of buffalo found in Asia - 56% in India, 19% in Pakistan, 11% in China, where buffalo are naturally found like cows. Only 3% of the buffalo population was spread across other continents. In Europe, the buffalo is traditionally found in Italy, where many well-known products such as mozzarella di Bufala, ricotta and provola originate. In other European countries, the buffalo is found in Romania and Bulgaria. At present, only two farms in the Czech Republic process buffalo milk and produce seasonal products from it.

The difference in composition between cow's milk and buffalo milk is in the fat content, which is up to twice as high as that of cow's milk, which is linked to the higher dry matter content. Other parameters such as protein, lactose, vitamin and mineral content are comparable or slightly higher than cow's milk.

In the present study, the aim was to compare and the content of selected constituents, namely lactose and citric acid in buffalo milk with cow milk using high performance liquid chromatography method with DAD WR detector and also to compare the results measured on MilkoScan FT 120.

In the practical part, 20 samples of raw buffalo milk collected from Ohař farm and 10 samples of raw cow milk from Struhy farm were analyzed for comparison. The high-performance liquid chromatography method with DAD WR detector was chosen because of its time saving, accuracy and automation.

The results of chromatographic measurements showed no statistically significant difference in lactose content between buffalo and cow milk samples, whereas a statistically significant difference in citric acid content was observed in these samples. The opposite was true for the MilkoScan FT 120 measurements. A problematic aspect when comparing chromatography and MilkoScan is the fact that chromatography measures the pure lactose content whereas MilkoScan determines the total carbohydrate content of the sample and the values are higher. The chromatography method has great potential in the future for investigating the composition of the constituents in milk.

Keywords: buffalo milk, components, quality, cheese, microbiology.

Obsah

1	Úvod	11
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	12
3	Literární rešerše	13
3.1	Buvol	13
3.1.1	Chov buvolů	14
3.1.2	Dojení buvolů	14
3.1.3	Normy pro přijetí syrového buvolího mléka v ČR	16
3.1.4	Chov buvolů v ČR	17
3.2	Bvolí mléko	17
3.2.1	Fyzikální vlastnosti buvolího mléka	18
3.2.2	Mléčný tuk	19
3.2.3	Bílkoviny	20
3.2.3.1	Aminokyseliny	21
3.2.4	Alergie na mléčnou bílkovinu	22
3.2.5	Sacharidy	23
3.2.6	Intolerance	23
3.2.7	Organické kyseliny	25
3.2.8	Minerální látky a stopové prvky	25
3.2.9	Vitamíny	26
3.2.10	Potraviny z buvolího mléka	27
3.2.10.1	Jogurtové nápoje	27
3.2.10.2	Ghee	28
3.2.10.3	Sýry	28
3.3	Metody stanovení laktózy a organických kyselin v buvolím mléce	29
3.3.1	Kapalinová chromatografie	29
3.3.2	MilkoScan™ FT 120	30
3.3.3	Metoda dle Luff-Schoorla	30
4	Metodika	31
4.1	Vzorky mléka	31
4.2	Chemikálie	32
4.3	Přístroje	33
4.4	Přípravy vzorků k analýze	33
4.5	Analýza vybraných parametrů	33
5	Výsledky	34
5.1	Analýza přístrojem HPLC	34

5.2	Analýza přístrojem MilkoScan FT 120	38
5.3	Statistické zpracování výsledků	39
6	Diskuze	42
7	Závěr.....	44
8	Literatura	45

1 Úvod

Mléko je kompletní potravina s vyváženým nutričním složením a tvoří součást lidské výživy po tisíciletí. Obsahuje všechny esenciální aminokyseliny, vitamíny lipofilní i hydrofilní. Z minerálních látek dominuje vápník, dále fosfor a hořčík. Tlak ze strany konzumenta na širší škálu výrobků a hledání alternativních produktů se projevuje na rozšíření chovu buvolů v malém měřítku i u nás v České republice. Momentálně jsou zde dvě farmy, které zpracovávají buvolí mléko a prodávají sezónně výrobky z něj.

Buvolí mléko je po kravském mléku druhým nejprodukovanějším mlékem na světě, a to především v zemích Asie. V Evropě je chov buvolů omezený, rozšířil se do Itálie, v menší míře do Rumunska a Bulharska. Buvolí mléko je nutričně jedno z nejbohatších v porovnání s ostatními druhy mlék, avšak informace o jeho chemickém složení a fyzikálních vlastnostech jsou stále nedostatečné. Konkrétní rozdílnost ve složení mléka kravského a buvolího je výrazná především v obsahu sušiny, jejíž hodnota se pohybuje v rozmezí 15-20 % u mléka buvolího a 10,5-15 % u mléka kravského. Obsah tuku v buvolím mléce dosahuje až dvakrát vyšších hodnot než je tomu u mléka kravského, a to konkrétně s průměrnými hodnotami 6-11 % u buvolího mléka a 3,5-6 % u kravského. Hodnota obsahu bílkovin je u buvolího mléka mírně vyšší než u mléka kravského, stejně tak jako obsah laktózy. Chuť a barva buvolího mléka je jedinečná a nezaměnitelná, proto by produkty z něj mohly rozšířit nabídku mlék a výrobků z něj.

Tato práce je zaměřena na stanovení a porovnání obsahu laktózy a citrónové kyseliny v buvolím a kravském mléce za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pomocí výsledků budeme schopni říci, zda je buvolí mléko přijatelnou alternativou k mléku kravskému a zda je zde potenciál do budoucna využívat buvolí mléko k produkci mléčných výrobků ve velkém měřítku.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotézou práce je, že obsah laktózy a některých organických kyselin je odlišný od mléka kravského.

Cílem práce je porovnat obsah vybraných složek, konkrétně laktózy a vybraných organických kyselin, ve vzorcích buvolího mléka pomocí metod kapalinové chromatografie.

3 Literární rešerše

3.1 Buvol

Termínem buvol se označují tři živočišné druhy z čeledi turovití (*Bovidae*). Těmito druhy jsou: americký bizon (*Bison bison*), buvol africký (*Syncerus caffer*) a buvol asijský (*Bubalus*). První dva druhy nebyly ještě domestikovány, zatímco buvol asijský (*Bubalus bubalis*), byl domestikován v přibližně stejnou dobu jako skot, tedy zhruba 7 000 př. n. l. (Wahid & Rosnina 2016).

Buvol asijský se dělí na dvě plemena: buvol říční (*Bubalus bubalis bubalis*) a buvol bažinný (*Bubalus bubalis kerebau*), které jsou geneticky odlišné, s různým počtem chromozomů. Buvol říční má 50 chromozomů, kdežto buvol bažinný jen 48. Dále se liší morfologií, fyziologií a produkční a reprodukční výkonností (Hegde & Abdullah-Al-Zabir 2019). Říční buvoli jsou obvykle větší než bažinní, váží 450 až 1000 kg a jsou chováni především pro produkci mléka. V některých částech jižní a západní Asie se buvol také používá k produkci masa. Říční buvoli mají černou, či tmavě šedou barvu srsti a zatočené rohy. Naopak buvoli bažinní jsou menší a lehčí, obvykle váží 330 až 450 kg a jsou chováni především pro tažné účely, někde také k produkci masa. Buvol bažinný se vyznačuje šedou barvou srsti, svěšeným krkem a mohutnými rovnými rohy, jeho výskyt převažuje v jihovýchodní Asii a Austrálii (Minervino et al. 2020).

V Evropě je nejvíce zastoupený podtyp říčního buvola – italský středomořský buvol (*Bufala Mediterranea Italiana*), patrný na obrázku 1, jež je využíván k výrobě tradiční buvolí mozzarely či jiných mléčných a masných výrobků. Italský středomořský buvol má černou srst, tmavě šedou kůži a hmotnost se pohybuje mezi 300 až 600 kg (Borghese & Moioli 2016).



Obr. 1: Italský středomořský buvol (*Bufala Mediterranea Italiana*) (Breed list 2021)

3.1.1 Chov buvolů

V roce 2017 čítala světová populace buvolů přes 200 milionů kusů, z toho 97 % připadlo na Asii – 56 % v Indii, 19 % v Pákistánu, 11 % v Číně a pouze 3 % byla rozptýlena na ostatních kontinentech (Hegde & Abdullah-Al-Zabir 2019). Nejběžnějším typem ustájení pro buvoly je tzv. tradiční systém, kde jsou buvoli přes noc ustájeni a přes den se vyskytují venku v ohrazených prostorách (Egypt, Turecko, Itálie). Na jihozápadě Íránu jsou buvoli celoročně chováni venku na pastvě, kde mají přístup do bažin, zatímco v Kazachstánu jsou přes zimu chováni ve stájích (Borghese & Moioli 2016).

Buvol dosahuje pohlavní dospělosti ve věku 1,5 až 3 let věku. Buvoli se rozmnožují po celý rok, ale průběh otelení je ovlivněn srážkami, krmivem a teplotou. V Indii a Pákistánu se většina buvolů telí mezi listopadem a březnem. Ačkoli nejčastější je metoda přirozeného páření, praktikována je i umělá inseminace. Mezi nejspolehlivější projevy říje jsou: časté močení, neklid, mírný pokles dojivosti a potíže s pouštěním mléka. Délka cyklu u buvolů je 21-29 dní, v závislosti na plemeni. Doba ovulace je 10-14 hodin po skončení období říje (Hegde & Abdullah-Al-Zabir 2019). Samice při zabřeznutí váží obvykle 250-275 kg. Samčí spermie se objevují ve věku 24 měsíců. Březost je u buvolů delší, než u skotu a pohybuje se u říčních buvolů od 305 dní do 320 dní a u bažinných buvolů od 320 do 340 dní. Porodní hmotnost telat je od 26 kg do 35 kg, přičemž samčí telata jsou o 2-3 kg těžší. Interval mezi oteleními je 15-18 měsíců (Wahid & Rosnina 2016).

3.1.2 Dojení buvolů

Anatomie buvolích struků se mírně liší od struků skotu. Základem mléčné žlázy je sekreční alveolus, jež je tvořen sekrečními buňkami. Alveoly jsou obklopeny cévkami a dohromady vytvářejí lalůčky. Jednotlivé části jsou spojeny mlékovody, které ústí do mléčné žlázy. Část ve vemeni a část ve struku, kde se mléko hromadí. Poslední částí vývodného systému je struk se strukovým kanálem, který je obklopen svěračem z hladké svaloviny. Buvol má čtyři struky, které se nacházejí podobně jako u skotu. Struky se liší tvarem a velikostí. Obecně jsou větší než struky skotu. Přední struky jsou v průměru dlouhé 5,8 až 6,4 cm a jejich průměr je přibližně 2,6 cm. Zadní struky jsou dlouhé 6,9 až 7,8 cm a průměr o 0,2 cm větší, než u struků předních. Zadní čtvrtě vemene jsou o něco větší než přední a obsahují více mléka. Přibližný poměr je 60:40 (zadní:přední), stejně jako u skotu. Dojení zadních čtvrtí trvá déle. Epitel strukového kanálku je u buvolů silnější a kompaktnější, než u skotu. Svěračová svalovina kolem strukového kanálku je u buvolů silnější, než u skotu. K otevření kanálku je proto zapotřebí větší síly. To je příčinou toho, že buvolci jsou "těžce dojitelní" (Mota-Rojas et al. 2019).

U skotu se mléko syntetizuje v alveolech a pravidelně se přenáší do velkých kanálků a zásobních kanálků mléčné žlázy a struku. U buvolů tomu tak není, místo toho se mléko zadržuje v horní, žláznaté části vemene, v alveolech a malých kanálcích. Mezi dvěma dojeními se v mléčnici neukládá žádné mléko. Proto buvolci nemají žádnou mléčnou frakci v zásobních kanálcích. Mléko je vylučováno do mléčnice pouze při skutečném výronu mléka.

Fyzická stimulace struků, ať již sáním telete, nebo rukama dojiče aktivuje receptory, z nichž jsou vysílány nervové impulsy do zadní hypofýzy, což způsobuje sekreci hormonu oxytocinu. Hormon je krví přenášen do mléčné žlázy. Vzhledem k faktu, že se na reflexu vypuzení mléka podílejí jak hormony, tak nervové impulsy, nazývá se tento neurohormonální reflex. Oxytocin stimuluje kontrakci alveolů a malých kanálků, čímž vyprazdňuje mléko do větších kanálků a struků. Poté může být mléko z vemene vypuzeno. Kontrakci alveolů mohou do jisté míry podpořit hmatové podněty na vemeni (masírování, mačkání) - tzv. kohoutkový reflex. Když telata sají, dotýkají se vemene, aby zvýšila sekreci mléka. Manuální masáž vemene během dojení tento reflex napodobuje.

Dojení je realizováno ručně či strojově. Ruční dojení se využívá pouze v některých domácnostech, kde nemají strojové zařízení. Pro nádoj jednoho litru je zapotřebí zhruba 80-120 stisků, tento způsob dojení je časově i fyzicky velmi náročný. Strojní dojení, které je patrně na obrázku 2, se dále rozděluje – na stání, v dojírně či robotem (Borghese et al. 2007).

Vhodný režim dojení je důležitý z hygienických a produkčních důvodů, stejně jako pro vytvoření příjemného a bezproblémového prostředí pro zvířata a dojiče. U dojnic bylo prokázáno, že praktikování přísné rutiny dojení vede ke zvýšení produkce mléka.

Níže uvedenou rutinu mohou dodržovat jak ruční, tak strojní dojiči ve stájích s vázaným ustájením, kde:

- 1) Je buvolice uvázána a krmena.
- 2) Je hnůj odstraněn z podlahy.
- 3) Jsou ruce dojiče umyty mýdlem a osušeny.
- 4) Jsou struky očištěny speciálními ručníky a jsou důkladně promasírovány.
- 5) Je buvolice ručně předdojena do hrnku a vzhled mléka je zkontrolován.
- 6) Je dojící zařízení jemně přiloženo a zkontrolováno.
- 7) Je každou chvíli buvolice kontrolována, zda se s přístrojem cítí dobře.
- 8) Je pohmatem vemeno zkontrolováno, zda je prázdné.
- 9) Je dojící souprava sejmuta z vemene.
- 10) Jsou struky namočený do vhodného dezinfekčního roztoku.
- 11) Je veškeré vybavení dojírny řádně vyčištěno.

V případě ručního dojení v těchto stájích se body 6 až 9 vynechávají.

Délka laktace buvolů se pohybuje od 200 do 290 dnů, nejčastěji však 260 dnů. Celosvětová průměrná mléčná užitkovost v laktaci je 1600 kg. Nejvyšší průměrnou užitkovost – 2000 kg dosahují v Itálii, zatímco v Turecku je průměrná užitkovost nižší, než 1000 kg za laktaci a v Íránu nemají buvoli vyšší nádoj, než 700 kg za laktaci. Zdravé buvolice absolvují 9-10 laktací během svého života.

V současné době dominuje v celosvětové produkci mléka: skot (83 % produkce), buvoli (13 % produkce), kozy (2 % produkce), ovce (1 % produkce) a velbloudi (0,2 % produkce) (Barłowska et al. 2011). Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů (FAO)

evidovala v roce 2021 roční produkci buvolího mléka v celkovém množství 137 milionů metrických tun (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2022).



Obr. 2: Automatické dojení na farmě Ohař. <http://www.buvolifarmaohar.cz/>

Mléko po nadojení většinou obsahuje mechanické částice z okolního prostředí (z dojnice, země, krmiva apod.), které je zapotřebí odstranit filtrací či cezením. Mléko má po nadojení teplotu cca 33 °C a mělo by být co nejdříve ochlazeno, aby se zabránilo rozvoji nežádoucích mikroorganismů a byla tak zachována kvalita mléka, než se zpracuje, či spotřebuje. Pokud je mléko sváženo každý den, musí být zchlazeno na teplotu 8 °C. V případě svozů ob den musí být mléko zchlazeno na 6 °C nebo zmrazeno, jak udává vyhláška o veterinárních požadavcích na mléko a mléčné výrobky č. 274/2019 Sb.

3.1.3 Normy pro přijetí syrového buvolího mléka v ČR

Syrové buvolí mléko určené k výrobě mléčných výrobků musí vyhovovat následujícím normám:

- 1) Celkový počet mikroorganismů (CPM) při 30 °C $\leq 1\,000\,000$ na 1 ml.
- 2) Počet somatických buněk (PSB) $\leq 500\,000$ na 1 ml.

Je-li určeno k výrobě výrobků „vyrobených se syrovým mlékem“ bez tepelného ošetření:

- 1) **CPM** při 30 °C $\leq 500\,000$ na 1 ml
- 2) **PSB** $\leq 400\,000$ na 1 ml

3) *Staphylococcus aureus* na 1 ml

n = 5 (počet jednotek vzorku, tvořících celý vzorek)

m = 500 (prahová hodnota počtu bakterií, výsledek je považován za uspokojivý, pokud počet bakterií ve všech jednotkách vzorku není vyšší než m)

M = 2 000 (nejvyšší hodnota počtu bakterií, výsledek je považován za neuspokojivý, pokud je počet bakterií v jedné nebo více jednotkách vzorku vyšší nebo roven M)

c = 2 (počet jednotek vzorku, u nichž může být počet bakterií mezim a M)

Celý vzorek je považován ještě za přijatelný, pokud další jednotky vzorku mají počet bakterií nižší nebo roven m.

Je-li určeno k výrobě konzumního tepelně ošetřeného mléka či mléčných výrobků:

1) **CPM** < 1 500 000 na 1 ml

3.1.4 Chov buvolů v ČR

Momentálně se na našem území nacházejí dvě farmy, které se specializují na výrobu produktů z buvolího mléka. První začala chovat buvoly od roku 2017. Tato buvolí Farma Ohař, která se nachází na pomezí Jihočeského a Středočeského kraje, chová okolo 20 buvolů, kteří jsou na pastvě téměř po celý rok. Na této farmě je možné zakoupit mléko pasterované i syrové, dále jogurty bílé a s medem, čerstvé sýry (ricotta a labneh) a mozzarella (Emailová korespondence – listopad 2023).

Druhou farmou, zpracovávající buvolí mléko i maso je Buffalo farm v Kralupech nad Vltavou. Tato farma vznikla rovněž v roce 2017. Na této farmě se nachází zhruba 30 buvolů, kteří jsou rovněž chováni na pastvinách. Na farmě Buffalo se prodávají mimo mléčné výrobky také mleté buvolí maso na kebab.

3.2 Buvolí mléko

Mléko je produktem mléčných žláz samic savců během laktace. Mléko je výživná biologická tekutina, která je bohatá na vysoce kvalitní bílkoviny, lipidy, minerální látky (vápník, hořčík, selen) a vitamíny (riboflavin, vitamín B12, kyselina pantotenová). Primární biologickou funkcí mléka je poskytovat výživu a imunitu kojencům. V důsledku toho je mléko z nutričního hlediska považováno za plnohodnotnou potravinu. Někteří kojenci, děti a dospělí jsou však na mléko alergičtí, protože mléko obsahuje potenciální alergeny ve formě bílkovin.

Mléko se obchodně hodnotí dle dvou důležitých prametrů: mléčného tuku a tukuprosté sušiny (složena převážně z bílkovin, laktózy a minerálních látek), které dávají dohromady celkovou sušinu. U buvolího mléka se celková sušina pohybuje v rozmezí 15-16 %. Mléko je majoritně složeno z vody, která je zastoupena v rozmezí 83-87 %. Malé procento vody v mléce je hydratováno na laktózu a soli, zatímco určitá část je vázána na bílkoviny.

Buvolí mléko se obecně vyznačuje vysokým obsahem tuku, laktózy, bílkovin, kaseinu a popelovin. Sledováním změn v buvolím mléce v průběhu let je důležitým prvkem, neboť se jedná o ukazatel environmentálních a genetických faktorů. Rozdíly ve složení buvolího mléka

v různých lokalitách odrážejí rozdíly v plemenech, managementu, krmení, podmínkách prostředí.

Tuk představuje hlavní složku sušiny buvolího mléka, s minimem 6,6 g/100 g a maximem 8,8 g/100 g. Druhou hlavní složkou je laktóza, s minimem 4,5 g/100 g a maximem 5,2 g/100 g. Obsah bílkovin v buvolím mléce se pohybuje v rozpětí 3,8-4,5 g/100 g. Minimální obsah popelovin byl naměřen 0,71 g/100 g a maximální 0,9 g/100 g (Tab. 1) (Abd El-Salam & El-Shibiny 2011). Průměrné složení různých druhů mlék je uveden v tabulce 1.

Druh	Voda (%)	Protein (%)	Tuk (%)	Laktóza (%)	Cholesterol (mg/100 g)
Skot	87	3,4	4,1	4,8	25,6-31,4
Buvol	83	4,4	7,7	4,8	6,5-10,2
Ovce	80	5,7	7,0	4,7	14,2
Koza	88	3,2	4,1	4,5	16,9-18,1
Velbloud	86	3,3	3,8	4,3	31,3-37,1

Tab. 1: Průměrné chemické složení různých druhů mlék (Barłowska et al. 2011).

3.2.1 Fyzikální vlastnosti buvolího mléka

Mléko je koloidní disperze, jehož fyzikální i chemické vlastnosti jsou závislé jak na vnitřních faktorech – složení mléka a struktuře, tak na vnějších – teplotě a ošetření po nadojení.

Průměrné pH (aktivní kyselost) čerstvého buvolího mléka se liší mezi jednotlivými vzorky. V Indii byly zaznamenány u plemene Murrah hodnoty pH kolem 6,74. V Itálii byly u plemene italských středomořských buvolů naměřeny hodnoty pH 6,73 v létě a hodnoty pH 6,85 v zimě. Všechny hodnoty byly u buvolího mléka oproti kravskému mléku vyšší a vykazovaly v průměru pH 6,6. Buvolí i kravské mléko má tendenci ztrácet postupně oxid uhličitý (CO₂) a tím mírně zvyšovat své pH v průběhu času. Následně dochází k poklesu pH v důsledku produkce kyseliny mléčné činností bakterií. Zvířata infikovaná mastitidou budou vykazovat zvýšené hodnoty pH > 7,0. Hodnota pH buvolího mléka není závislá na denní produkci, stádiu laktace či počtu laktací (Zava & Sansiřena 2017).

Měrná hmotnost je další fyzikální konstantou čerstvého buvolího mléka. Průměrné hodnoty se pohybují v rozmezí 1,030 až 1,032 g/m³, což je srovnatelné s mlékem skotu. Nižší hodnoty jsou spojovány s vyšším podílem tuku. U této veličiny však závisí na teplotě, složení a stavu skupenství měřeného vzorku.

Bod tuhnutí jakékoli biologické tekutiny se nachází pod bodem tuhnutí čisté vody. Průměrný bod tuhnutí pro plnotučné mléko je téměř totožný s mlékem skotu, a to – 0,545 °C.

Jednou z dalších fyzikálních vlastností mléka je fluorescence. Při vystavení mléka skotu ultrafialovému světlu se mléko zbarví do kanárkově žluté barvy díky přítomnosti vitamínu B2 – riboflavinu, přičemž buvolí zůstane křídově bílé.

Další důležitou fyzikálně-chemickou vlastností je doba koagulace, nebo-li srážení či precipitace. Vzhledem k vysokému obsahu vápníku je rychlejší u buvolího mléka, než u mléka kravského. V průměru trvá 257 sekund u buvolího mléka a 310 sekund u mléka skotu. Tato doba může být zkrácena přidáním kyseliny.

3.2.2 Mléčný tuk

Primární funkcí tuku v mléce je uspokojení energetických požadavků novorozence. Mléčný tuk je zdrojem esenciálních mastných kyselin a lipofilních vitamínů. Jak již bylo zmíněno výše, tuk je nejvíce zastoupenou složkou v buvolím mléce, kde je rozptýlen ve formě tukových kapiček, nazývaných také mléčné tukové kuličky. Odrazem světla od malých nerozpustných kuliček tuku nabývá mléko charakteristickou bílou barvu. Velikost tukové kuličky buvolího mléka je přibližně 4-5 μm , což je ve srovnání s mlékou jiných přežvýkavců (kravské tukové kuličky 3 μm , ovčí 3 μm , kozí 2,5 μm) větší velikost. Velikost tukové kuličky koreluje s obsahem tuku v mléce. Tukové kuličky se skládají z 98 % z triacylglycerolů (TAG), což jsou estery glycerolu a mastných kyselin a jsou uloženy v jádru tukové kuličky. Mléčný tuk obsahuje převážně nasycené mastné kyseliny (66 %) s různou délkou řetězce a s nízkým obsahem nenasycených mastných kyselin (29 %). Toto složení se však může měnit v závislosti na plemeni, fázi laktace, ročním období a výživě zvířete (Ménard et al. 2010).

Ve studii z roku 2007 od Varricchio et al. bylo analyzováno celkem 203 vzorků mléka buvolů z jižní Itálie a dále kvantifikováno pět nejdůležitějších mastných kyselin, přehledně v tabulce 2: kyselina máselná (C4), kyselina palmitová (C16), kyselina olejová (C18:1), kyselina myristová (C14) a kyselina stearová (C18).

Jednou ze specifických vlastností mléka buvolů je přítomnost konjugované kyseliny linolové (CLA), která má řadu funkčních účinků. Biologicky neaktivnější je konfigurace izomeru cis-9 a trans-11, o kterých se tvrdí, že inhibují výskyt a rozvoj nádorových onemocnění kůže, prsu, tlustého střeva a žaludku, zatímco izomer trans-10 a cis-12 je považován jako přínosný faktor k prevenci obezity. Kromě toho CLA snižuje hladinu TAG, celkového cholesterolu a zlepšuje poměr LDL/HDL v plazmě, což je rozhodující faktor v prevenci srdečních onemocnění a aterosklerózy (Tricon et al. 2004).

Minoritní složkou mléčného tuku jsou také fosfolipidy s průměrným zastoupením v buvolím mléčném tuku 21 mg/100 ml, což je méně v porovnání s mlékem skotu (33 mg/100 ml).

Cholesterol a jeho obsah v buvolím mléce je nižší než u mléka skotu, ačkoli je obsah tuku u buvolího mléka vyšší, což lze přičíst především rozdílu ve velikosti tukových kuliček u obou druhů. Průměrný obsah cholesterolu v buvolím mléce je 235-248 mg/100 g mléčného tuku, kdežto u mléka skotu je to 317-413 mg/100 g mléčného tuku. Na začátku laktace je obsah cholesterolu obecně nejnižší, postupně se zvyšuje a ke konci laktace dosahuje nejvyšší hodnoty. V mlezivu je hodnota obsahu cholesterolu poměrně vysoká, v prvním dojení dosahuje hodnota cholesterolu až 570-1950 mg/100 g mléčného tuku a během dalších dojení postupně klesá na normální hodnoty (Abbas et al. 2019).

Mastná kyselina	Průměrné zastoupení (%)
C4	3,4
C14	10,6
C16	30,6
C18	12,2
C18:1	21,4

Tab. 2: Průměrné zastoupení nejdůležitějších mastných kyselin v % v buvolím mléce (Varricchio et al. 2007).

TAG v jádru jsou obklopeny tenkou membránou o tloušťce 10-20 nm, jejíž funkcí je ochrana jádra před poškozením a enzymatickou degradací. Tato membrána je složena, v závislosti na zdroji, z 25-70 % specifické bílkoviny, především glykoproteinů, fosfo- a sfingolipidů. Sfingolipidy (vysoce bioaktivní molekuly), se nacházejí také v membránách mozkových buněk, míše, ledvinách i vaječném žloutku (Dewettinck et al. 2008).

3.2.3 Bílkoviny

Bílkoviny jsou jednou z hlavních složek mléka, které mají zásadní vliv na nutriční a technologickou vhodnost k dalšímu zpracování. Mléčné bílkoviny jsou heterogenní skupinou sloučenin, které se liší chemickým složením a vlastnostmi. Dělí se na kaseinové a syrovátkové frakce. Kasein, nejdůležitější bílkovina v mléce, tvoří více než 75 % z celkového obsahu bílkovin a tudíž se buvolí mléko řadí mezi mléka kaseinová. Obsah celkového kaseinu je kolem 4 g/100 g mléka, což představuje téměř dvojnásobek, oproti mléku kravskému. Z tohoto důvodu se například v Indii mléko ředí vodou, když je určeno pro lidskou spotřebu (Bartowska et al. 2011).

Hlavními frakcemi kaseinu v buvolím mléce jsou obdobně jako u jiných typů mléka: α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein, β -kasein a κ -kasein. Tyto frakce kaseinu se z chemického hlediska řadí mezi fosfoproteiny. V porovnání s kravským mlékem obsahuje buvolí mléko více α_{s2} -kaseinu a κ -kaseinu, což je i jeden z faktorů, který urychluje enzymatickou fázi srážení při výrobě sýra. Dalšími bílkovinami, na které připadá 17-20 % z celkového obsahu bílkovin, jsou syrovátkové bílkoviny. Z nutričního hlediska je lze označit jako důležitější než bílkoviny kaseinové, jelikož obsahují cystin. Cystin je aminokyselina obsahující síru, jež pomáhá udržovat strukturu bílkovin v těle a je zapotřebí k výrobě aminokyseliny taurinu, který pomáhá při podávání inzulínu do pankreatu. Mezi syrovátkové bílkoviny patří: α -laktalbumin a β -laktoglobulin (Abd El-Salam & El-Shibiny 2011).

D'Ambrosio et al. (2008) ve své studii identifikovali několik minoritních syrovátkových bílkovin, které lze dle funkce rozdělit do skupin:

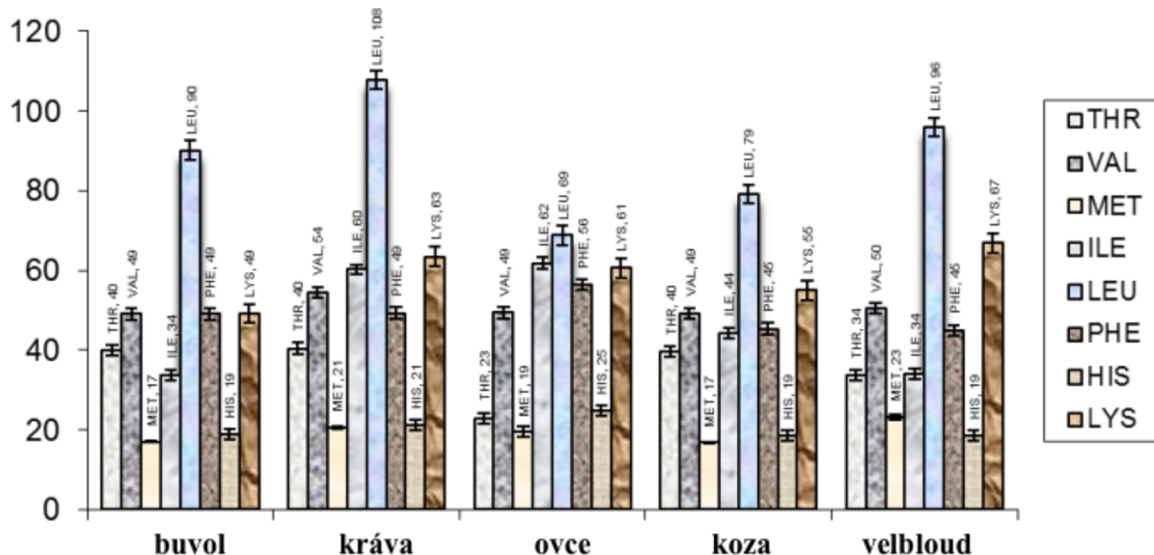
- 1) Obranné/imunitní složky, mezi které se řadí například laktoferin (glykoprotein je tvořen v mléčné žláze se schopností vázat ionty železa, díky kterému dochází k inhibici růstu některých bakterií z prostředí), imunoglobuliny, α -inhibitor trypsinu a nukleobindiny.
- 2) Transportní složky, mezi něž patří albumin, protein vázající foláty a inhibitor růstu produkovaný mléčnou žlázou.

- 3) Metabolické složky jako enzym laktoperoxidáza, který má antimikrobiální a antioxidační vlastnosti, z důvodu katalýzy tvorby hypothiokyanátového iontu.

3.2.3.1 Aminokyseliny

Mléko obsahuje všechny esenciální aminokyseliny pro člověka a tím je řazeno mezi kompletní plnohodnotné potraviny. Konkrétně aminokyselina leucin byla zastoupena v buvolím mléce v obsahu 90 mg/g, jež je patrné z obrázku 2. Leucin hraje roli v metabolismu bílkovin a translaci bílkovin, při syntéze svalových bílkovin a zároveň se podílí na reverzibilní fosforylaci proteinů.

Na druhé místo z nejvíce zastoupených aminokyselin v buvolím mléce se řadí lysin, fenylalanin a valin. Obsah těchto aminokyselin byl průměrně 49 mg/g. Lysin hraje hlavní roli ve vstřebávání vápníku, v budování svalů, zraněních, v produkci tělesných hormonů a enzymů. Fenylalanin slouží k tvorbě neurotransmiterů: v dřeni nadledvin a v mozku se vyrábějí katecholaminy (dopamin, adrenalin, noradrenalin), ve štítné žláze tyroxin a trijodtyronin a biosyntetizuje se z něj také melanin (pigment kůže, vlasů, vousů, očí). Zbýlých 10 % fenylalaninu, který dospělý člověk zkonzumuje se použije na syntézu proteinů. Valin se pro svůj hydrofobní charakter vyskytuje především zabořený uvnitř proteinů, kde zprostředkovává hydrofobní interakce. Je málo reaktivní a většinou se proto neúčastní enzymatických reakcí. (Medhammar et al. 2012; Rafiq et al. 2015). Další aminokyseliny, důležité pro organismus, obsahují síru (methionin, cystein). Metihionin je esenciální aminokyselinou, posilující imunitní funkce prostřednictvím nitrobuňčné přeměny na glutathion a slouží tak jako antioxidant. Metionin je rovněž mezičlánkem při biosyntéze cysteinu, karnitinu, taurinu, lecitinu, fosfatidylcholinu a dalších fosfolipidů (Pinnen et al. 2009).



Obr. 2: Obsah esenciálních aminokyselin v kaseinech různých druhů mléka v (mg/g) (Rafiq et al. 2015).

3.2.4 Alergie na mléčnou bílkovinu

Ačkoli existují určité podobnosti ve složení bílkovin kravského a lidského mléka, rozdíly v typu bílkovin a jejich koncentraci v kravském mléce jsou dostatečné k vyvolání imunitní reakce u lidí. Nežádoucí reakce organismu na mléko jsou rozděleny na obrázku 3.

Většina postižených dětí z alergie do čtyř let věku vyroste, některé si ji ale zachovají po celý život (Jaiswal & Worku 2022). Bylo zjištěno, že bílkoviny kravského mléka jsou nejčastější příčinou potravinové alergie u kojenců (do dvou let). U zdravých jedinců rozpoznává imunitní systém mléčné bílkoviny jako neškodné látky, zatímco jedinci alergičtí na bílkoviny kravského mléka jsou vysoce citliví na mléčné bílkoviny, které spouštějí zánětlivé reakce charakteristické pro alergie. Mapování epitopů mnoha bílkovin kravského mléka, včetně kaseinů a syrovátkových bílkovin, ukázalo, že mnohé bílkoviny nesou více alergenních epitopů, které se podílejí na alergických reakcích (Haug et al. 2007).

Tyto epitopy jsou vnímány B a T lymfocyty, které produkují protilátky, respektive buněčně zprostředkované imunitní reakce. Alergie na mléko je často chybně diagnostikována jako intolerance laktózy, nicméně tyto dva jevy nejsou totožné. U mnoha dospělých se vyskytuje intolerance laktózy, která je způsobena především nedostatkem enzymů laktázy ve střevě, jak již bylo vysvětleno výše (Crittenden & Bennett 2005). Hlavním alergenem v mléce skotu je sérový albumin. Alergenita sérového albuminu skotu se přisuzuje především jeho povrchovým epitopům, vázajícím se na imunoglobulin E (IgE), které mohou snadno reagovat s cirkulujícími IgE a vyvolat alergickou reakci u pacienta. I když je množství sérového albuminu v mléce nízké, toto malé množství má vazebnou účinnost až 50 % vzorků séra pacienta, což může vyvolat závažnou alergickou reakci (Jaiswal & Worku 2022).



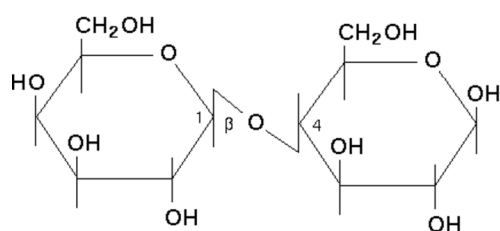
Obr. 3: Možné nežádoucí reakce organismu po konzumaci mléka (Crittenden & Bennett 2005).

3.2.5 Sacharidy

Základním sacharidem tvořícím z 99 % mléko je laktóza, viz obrázek 4. Laktóza je redukujícím disacharidem, který je tvořen glukózou, jež přechází z krve buvola do mléka a galaktózou, která je tvořena až v mléčné žláze. Sladivost laktózy je oproti sacharóze 6-10 krát nižší, avšak monosacharidy, ze kterých je složena jsou samy o sobě sladší. Laktóza je významným zdrojem energie, podporujícím absorpci vápníku. Je nezbytnou složkou pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků, podílí se na barvě, chuti a vůni mléka i výrobků z něj, přispívá k nutriční hodnotě mléka a mléčných výrobků. Ostatní sacharidy zastoupené v mléce ve stopových množstvích jsou: glukóza (75 mg/l), fruktóza, glukosamin, galaktosamin a oligosacharidy (Navrátilová et al. 2012).

Průměrný obsah laktózy v buvolím mléce se pohybuje v rozmezí 4,7-5 %, zatímco mléko skotu má nižší obsah laktózy 4,5-4,8 %. Laktóza reaguje s bílkovinami za vzniku vysoce aromatických zlatohnědých pigmentů, které se běžně vyskytují například i při pečení pečiva. Této reakci se říká Maillardova reakce. Při záhřevu dochází dále k izomeraci laktózy na laktulózu. Tato sloučenina je využívána jako indikátor intenzity tepelného zpracování. Laktóza se podílí v potravinářství na chuti, textuře, vzhledu, trvanlivosti a opékací vlastnosti pečených potravin. Laktóza se může oddělit buď z mléka nebo ze syrovátky vykrystalizováním. Ve farmaceutickém průmyslu se laktóza hojně využívá při výrobě prášků a tablet, kde slouží jako výplňový materiál (Yoganandi et al. 2014; Nayak 2015).

Ke stanovení obsahu laktózy v mléce se běžně používá přístroj MilkoScan, jež dokáže zanalyzovat až 24 parametrů během 30 sekund u jediného vzorku. MilkoScan využívá princip infračervené spektroskopie. Dále lze pro stanovení obsahu laktózy použít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s refraktometrickou detekcí. V neposlední řadě se laktóza dá měřit metodou podle Luff-Schoorla, při které se využívá redukční schopnosti sacharidů (Marrubini et al. 2017).

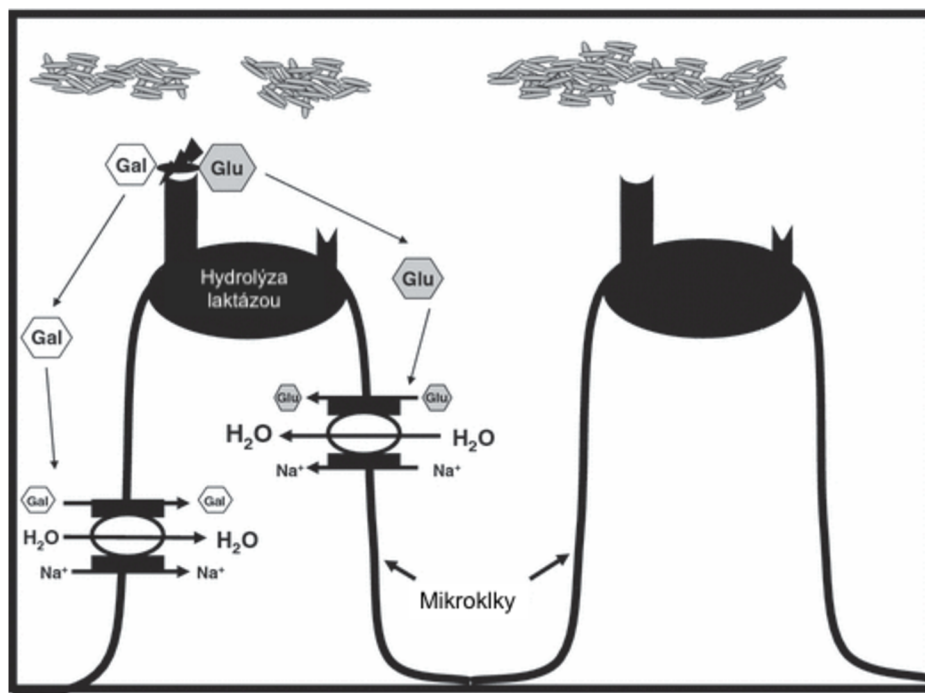


Obr. 4: Chemická struktura laktózy (Gänzle 2022).

3.2.6 Intolerance

Jednou z nesnášenlivostí určitého nutrientu v mléce je intolerance laktózy. Za normálních okolností je laktóza při konzumaci hydrolyzována na glukózu a galaktózu enzymem laktázou, rovněž známou jako β -galaktosidáza (EC 3.2.1.23), který se nachází v kartáčovém lemu tenkého střeva. Tato hydrolýza je popsána na obrázku 5. Konkrétně jej produkují enterocyty (cylindrické buňky střevní sliznice). Nedostatek laktázy z jakékoli příčiny vede ke klinickým příznakům. Hladina enzymu laktázy je nejvyšší krátce po narození a poté

klesá s věkem, přestože je laktóza stále přijímána v potravě. Lidé původem ze severní Evropy či severozápadní části Indie si obvykle zachovávají schopnost trávit laktózu i v dospělosti. Naopak některé populace, například jihoamerické, asijské či africké, projevují nedostatek enzymu laktázy v dospělosti. Nesnášenlivost laktózy se projevuje nadýmáním, bolestmi břicha, řídkou stolicí a nevolností (Crittenden & Bennett 2005).



Obr. 5: Hydrolyza laktózy na monosacharidy v tenkém střevě (Lomer et al. 2008).

Primární příčinou intolerance bývá nedostatek enzymu laktázy produkovaného enterocyty tenkého střeva, jak již bylo zmíněno výše. Sekundární nedostatek laktázy může být způsoben v důsledku několika infekčních, zánětlivých nebo jiných onemocnění, které poškodí střevní sliznici a způsobí tak nedostatek laktázy. Mezi tyto onemocnění patří: gastroenteritida, celiakie, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, případně léčebné procesy jako chemoterapie či opakované užívání antibiotik. Další příčinou nedostatku laktázy je vrozený nedostatek v důsledku autozomálně recesivní dědičnosti. Od narození dochází ke snížení nebo absenci aktivity laktázy, která se projevuje u novorozence po požití mléka. Jedná se o vzácnou příčinu deficitu, jejíž genetické pochody nejsou doposud známé (Malik & Panuganti 2023). Poslední známou příčinou nedostatku enzymu laktázy je vývojový nedostatek laktázy, který se vyskytuje u nedonošených dětí, narozených ve 28. a 37. týdnu těhotenství. Střevo dítěte je nedostatečně vyvinuté, což vede k neschopnosti hydrolyzovat laktózu. Tento stav se zlepšuje přibývajícím věkem v důsledku postupného dovyvíjení střevních enterocytů (Mobassaleh et al. 1985).

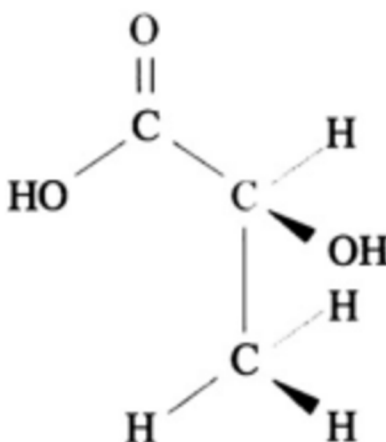
Celosvětově se odhaduje, že 65-70 % dospělé populace má sníženou produkci enzymu laktázy či kompletní absenci (Bayless et al. 2017). Laktáza je komerčně vyráběna z kvasnic *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* a hub *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*. Účelem je hydrolyzovat laktózu v mléce a mléčných produktech pro lidi s intolerancí laktózy.

Takové produkty mají snížený obsah laktózy, případně jsou zcela bez laktózy a jsou tak lépe stravitelné.

3.2.7 Organické kyseliny

V mléce je známa řada organických kyselin, jmenovitě: mléčná, citronová, orotová, sialová, benzoová, sorbová a další. Hlavní organickou kyselinou v syrovém mléce je citronová kyselina, která během skladování rychle mizí působením bakterií. Mléčná a octová kyselina jsou produkty rozkladu laktózy. Orotová kyselina je meziproduktem biosyntézy pyrimidinových nukleotidů. Ostatní kyseliny, jako je benzoová a sorbová kyselina, jsou přítomny v menším množství. Díky svým konzervačním vlastnostem jsou společně s dalšími biologicky aktivními sloučeninami, jako jsou imunoglobuliny, laktoferin a lysozym, důležité při inhibici růstu nežádoucích mikroorganismů v mléce.

Během fermentace mléka se koncentrace některých organických kyselin (mléčné, propionové a octové kyseliny) zvyšuje, zatímco koncentrace orotové či citronové kyseliny klesá. V závislosti na přítomných mikroorganismech probíhá fermentace mléka buďto cestou glykolýzy s majoritním podílem tvorby mléčné kyseliny, jejíž strukturní vzorec je uveden na obrázku 6) nebo dráhou pentózofosfátového cyklu s tvorbou octové a mléčné kyseliny. Ve výrazně nižším množství dochází také k tvorbě benzoové a sorbové kyseliny (Urbiené & Leskauskaitė 2006).



Obr. 6: Chemická struktura mléčné kyseliny (Castillo Martinez et al. 2013).

3.2.8 Minerální látky a stopové prvky

Mléko je pro člověka důležitým zdrojem minerálních látek, zejména vápníku, fosforu, sodíku, draslíku, chloridu, jódu, hořčíku a v malém množství i železa. Publikované údaje o koncentracích chemických prvků v mléce vykazují rozdíly, zejména u stopových prvků. Dostupné literární údaje o složení mléka pocházejí z experimentálních pozorování prováděných v různých lokalitách, a odrážejí tak rozdíly v plemenech, managementu a podmínkách prostředí. Plemeno, stádium laktace a zdravotní stav mléčné žlázy jsou hlavními faktory ovlivňujícími koncentraci minerálních látek v mléce, zatímco dieta má relativně malý vliv na koncentraci většiny stopových prvků (Fantuz et al. 2022).

Hlavními minerálními látkami v mléce jsou vápník a fosfor, které jsou důležité pro růst kostí a správný vývoj novorozenců. Obsah těchto a dalších minerálních látek v různých druzích mléka je uveden v tabulce 3. Vysoká biologická využitelnost těchto látek ovlivňuje jedinečnou výživovou hodnotu mléka. Vápník, vázaný v koloidní formě na kasein, (v organické i minerální formě) vykazuje významnou dostupnost během procesu trávení mléka. Dostupnost úzce souvisí s vyšší koncentrací kaseinu (Barłowska et al. 2011). Obsah vápníku v buvolím mléce se může lišit a je výrazně ovlivněn plemenem, prostředím a citlivostí použitých analytických metod stanovení.

Koncentrace železa v mléce je přirozeně nízká a je ovlivněna přítomností laktoferinu. Železo, měď a zinek v mléce přežvýkavců souvisí především s obsahem kaseinové frakce, zatímco v lidském mléce jsou tyto minerální prvky spojeny s rozpustnými bílkovinami (Fantuz et al. 2022).

Druh	Vápník (mg/100 g)	Fosfor (mg/100 g)	Hořčík (mg/100 g)	Zinek (μg/kg)	Železo (μg/kg)
Buvol	180-240	99-145	18	410	161
Skot	120	119	12	530	80
Ovce	195	124-158	18-21	520-747	72-122
Koza	134	121	16	56	7

Tab. 3: Průměrné zastoupení minerálních látek v mléku různých živočišných druhů (Abd El-Salam & El-Shibiny 2011; Barłowska et al. 2011).

3.2.9 Vitamíny

Nedostatek vitamínů je v celosvětovém měřítku stále velkým problémem. Pokud nejsou nedostatky závažné, často nejsou klinicky rozpoznány, nicméně i mírný nedostatek může mít závažné, nepříznivé důsledky. Nedostatek vitamínů se týká všech věkových kategorií a často se vyskytuje současně s nedostatkem minerálních látek (Griffiths 2013).

Mléko je významným zdrojem vitamínů pro člověka. Obsah vitamínů je nestálý a bývá ovlivněn mnoha faktory: krmivem, zdravotním stavem, plemenem, střevní mikroflórou či stádiem laktace. Obsah vitamínu A je v buvolím mléce průměrně vyšší než u skotu. Přehled srovnání obsahu vitamínů je uveden v tabulce 4. Buvoli metabolizují veškerý karoten na vitamin A, který se poté přenáší do mléka. Z tohoto důvodu má buvolí mléko křídově bílou barvu, kdežto kravské je více nažloutlé, což je důsledkem přítomnosti karotenu (A. Presicce 2017). Nedostatek vitamínu A se projevuje potížemi se zrakem, zhoršením stavu pokožky a anémií. Vitamin B12 (kobalamin) je syntetizován mikroorganismy, které jsou součástí trávicí soustavy přežvýkavců, kde je celulóza zpracovává bakteriální fermentací. Nadbytek kobalaminu se hromadí ve tkáních a v mléce, jež se stává zdrojem pro potomstvo, a to jak pro masožravce, tak pro všežravce (Schneider & Stroinski 1987). Průměrnou koncentraci

kobalaminu ve vzorcích mléka skotu i buvolů stanovil Fedosov et al. (2019) na 4 µg/l. Rozdíl byl však ve vazbách na specifické proteinové nosiče, jeho vyvázání z tohoto komplexu a následné využití člověkem. U mléka skotu jsou tyto vazby slabší, tudíž je kobalamin využit více, než u mléka buvolů. Nedostatek kobalaminu je spojován s poruchami neurologického a hematologického charakteru.

Druh	Vitamin A (µg/100 g)	Vitamin D (µg/100 g)	Vitamin C (mg/100 g)
Buvol	127-190	2	2,3
Skot	126	2	0,9
Ovce	146	1,2	4,2
Koza	185	2,3	1,3

Tab. 4: Průměrné zastoupení vybraných vitamínů v mléku různých živočišných druhů (Abd El-Salam & El-Shibiny 2011; Barłowska et al. 2011).

3.2.10 Potraviny z buvolího mléka

Z buvolího mléka, stejně jako z mléka kravského, lze vyrábět širokou škálu mléčných produktů: smetanu, máslo, zmrzlinu, jogurt či sýry, aniž by bylo nutné měnit zařízení nebo způsob zpracování. Některé technologie však nejsou pro zpracování buvolího mléka dostatečně vhodné vzhledem k rozdílům ve složení, fyzikálně-chemickým a funkčním vlastnostem mléka. Díky svému vysokému obsahu tuku a větší velikosti tukových kuliček je buvolí mléko vhodnější pro výrobu tučných výrobků, jako je například smetana, máslo, sýr, či kondenzované mléko (Dorni et al. 2018).

3.2.10.1 Jogurtové nápoje

Lassi – tradiční indický jogurtový nápoj, který je připravován smícháním jogurtu, vody a koření. Lassi je vyobrazen na obrázku 7. Dle oblasti či druhu lassi lze při výrobě použít kmín, pepř (Namkin lassi), šafrán a růžovou vodu (Meethi lassi), konopí (Bhang lassi) či kardamom. Lassi může být smícháno dále s ovocnou složkou, či s ořechy (Lassi masalewal).



Obr. 7: Lassi prodávané na ulici v Indii In: whats4eats.com [online]. 2.3.2024 [cit. 2024-03-02]. Dostupné z: <https://www.whats4eats.com/beverages/lassi-recipe>.

3.2.10.2 Ghee

Druhý nejdůležitější produkt po mléce je pro oblasti Indie a Íránu je ghee – přepuštěné máslo s 99 % tuku, které lze skladovat v pokojové teplotě. Ghee z buvolího mléka je téměř průsvitné barvy (na rozdíl od žluté barvy ghee vyrobeného z mléka skotu) a to díky absenci karotenoidů. Ghee je připravováno dvěma způsoby – z másla, či z vařené smetany. Ghee je využíváno jako složka potravy a rovněž jako součást hindských rituálů. Více než 40 % produkce buvolího mléka je v Indii použito k výrobě ghee – s ročním průměrem produkce 480 000 tun. Průměrná roční spotřeba v Indii je 1,2 kg/osobu (Bharat 2019).

3.2.10.3 Sýry

Mozzarella di Bufala Campano D.O.P – italský čerstvý tahaný a hnětený sýr, mléko z buvolů chovaných v regionu Kampánie. Zpracování probíhá ve stejném regionu, díky kterému nabývá označení D.O.P. (chráněné označení původu). Barva slonovinové kosti, tenká a hladká kůrka o tloušťce 1 mm, bez otvorů, vyrobena bez konzervantů, inhibitorů a barviv. Při krájení mírný odtok krémové syrovátky.

Provola affumicata – italský sýr, uzená verze mozzarely varáběna spalováním rýže, či jiného druhu slámy pod nádobami s mlékem, přičemž se přikryje vlhkou látkou, aby byly zachyceny kouřové látky a vlhkost.

Ricotta – čerstvý italský sýr vyráběný ze syrovátky, která zůstala po výrobě sýra. Jelikož se při výrobě sýra odfiltruje kasein, je ricotta vhodná pro osoby s nesnášenlivostí kaseinu. Obsahuje vysoký podíl bílkovin a nízký podíl tuku.

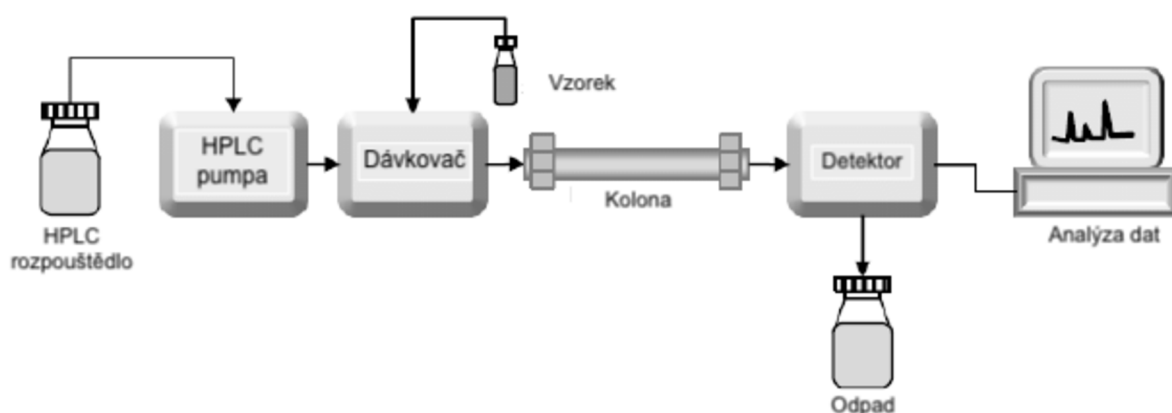
Khoa – sýr typický pro indický subkontinent vyráběný ze sušeného plnotučného mléka zahříváním v otevřené pánvi. Má nižší vlhkost než typické čerstvé sýry, jako je ricotta (Kehler 2016).

3.3 Metody stanovení laktózy a organických kyselin v buvolím mléce

3.3.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie byla původně objevena jako analytická technika na počátku 20. století a poprvé byla použita jako metoda separace barevných sloučenin. Odtud byl odvozen název chromatografie – chroma znamená barva, graphy znamená písmo. Ruský botanik Michail S. Cvět použil základní formu chromatografické separace k přečištění směsi rostlinných pigmentů (McDonald 2008).

Všechny chromatografické separace fungují na stejném základním principu – každá sloučenina interaguje s ostatními chemickými prvky charakteristickým způsobem. Chromatografie rozděluje vzorek na jednotlivé složky díky rozdílům v relativní afinitě různých molekul k mobilní – pohyblivé fázi a stacionární – nepohyblivé fázi použité při separaci (Swadesh 2001). Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC = high performance liquid chromatography) slouží k separaci a současně k analýze složek vzorku na základě jejich povahy a následně identifikaci a kvantifikaci. Schéma HPLC je vidět na obrázku 8. HPLC byla vyvinuta jako metoda, která řeší některé nedostatky standardní kapalinové chromatografie. Příkladem je využití vysokých tlaků v úzké koloně, jež tak dosahuje účinnější separace v mnohem kratším čase, než bylo nutné u klasické kapalinové chromatografie. Mobilní fáze neboli rozpouštědlo v HPLC je obvykle směs polárních a nepolárních kapalných sloučenin, jejichž příslušné koncentrace se mění v závislosti na složení vzorku. V koloně HPLC se složky vzorku oddělují na základě rozdílných interakcí s obsahem kolony. Pokud určitá látka silněji interaguje se stacionární fází v koloně, stráví na adsorbentu kolony více času, a proto bude mít delší retenční čas (Shockcor 2017). Kolony mohou být plněny pevnými látkami, jako je oxid křemičitý či oxid hlinitý. Tyto kolony se nanazývají homogenními kolonami (Czaplicki 2013).



Obr. 8: Schéma vysokoučinné kapalinové chromatografie (Czaplicki 2013).

3.3.2 MilkoScan™ FT 120

K vyhodnocování vzorků mléka se dále využívá přístroj MilkoScan, který dokáže analyzovat až 24 parametrů během 30 sekund u jednoho vzorku mléka a je vidět na obrátku 9. Základní konfigurace nabízí stanovení tuku, bílkovin, laktózy, celkovovou sušinu a beztukovou sušinu v mléce, smetaně či dalších mléčných výrobcích.

MilkoScan využívá princip infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Tato metoda je analytická technika měřící pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce při průchodu vzorkem, při které proběhnou změny rotačně vibračních stavů molekuly.



Obr. 9: Přístroj MilkoScan FT 120

3.3.3 Metoda dle Luff-Schoorla

Další metodou pro stanovení obsahu laktózy je metoda dle Luff-Schoorla, která využívá redukční schopnosti sacharidů. Cukerný extrakt reaguje za horka s definovaným množstvím Cu^{2+} ve formě tzv. Luffova roztoku a vzniká oxid měďný. Směs se vaří přesně 10 minut. Po ochlazení a okyselení se nadbytek Cu^{2+} stanoví jodometricky. Provádějí se dvě titrace thiosíranem. První bez vzorku (místo cukerného extraktu se odpipetuje stejný objem vody) a druhá se vzorkem. Z rozdílu spotřeb $0,1\text{M Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ se z tabulky určí množství příslušného cukru (Marrubini et al. 2017).

4 Metodika

V této práci byla zvolena metoda přesná, opakovatelná a časově méně náročná pro stanovení laktózy a citrónové kyseliny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Touto metodou byl stanoven obsah laktózy a citrónové kyseliny. K ověření naměřených výsledků pomocí HPLC byl zároveň použit přístroj MilkoScan FT 120.

4.1 Vzorky mléka

V rámci této diplomové práce bylo analyzováno celkem 20 směsných vzorků syrového buvolího mléka z farmy Ohař na pomezí Jihočeského a Středočeského kraje. Pro porovnání bylo analyzováno 10 vzorků syrového kravského mléka z farmy Struhy z Jihočeského kraje.

Vzorky mléka byly z farem převáženy v chlazených boxech do ČZU, kde byly zmrazeny a skladovány při mrazírenské teplotě -20 °C. Všechny tyto vzorky s kódy (BMW – buvolí, CMW - kravské) jsou seřazeny chronologicky dle data nadoje v tabulce 5.

Kód vzorku	Datum nádoje
BMW4521	11.11.2021
BMW4621	18.11.2021
BMW4821	02.12.2021
BMW4921	09.12.2021
BMW0122	07.01.2022
BMW0222	13.01.2022
BMW0322	20.01.2022
BMW0422	27.01.2022
BMW0622	10.02.2022
BMW0722	17.02.2022
BMW0822	24.02.2022
BMW1122	17.03.2022
BMW1222	24.03.2022
BMW1322	31.03.2022
BMW1422	07.04.2022
BMW1722	28.04.2022
BMW1822	05.05.2022
BMW2022	12.05.2022
BMW20221	19.05.2022
BMW20222	26.05.2022
CMW3623	05.09.2023
CMW3723	12.09.2023
CMW3923	26.09.2023
CMW4423	31.10.2023
CMW4523	07.11.2023
CMW4623	14.11.2023
CMW4723	21.11.2023
CMW4823	28.11.2023
CMW4923	05.12.2023
CMW5023	12.11.2023

Tab. 5: Seznam analyzovaných směsných vzorků s daty nádoje.

4.2 Chemikálie

- Carez I (VWR)
- Carez II (VWR)
- Kyselina sírová (VWR)

4.3 Přístroje

- HPLC 1260 Infinity II (Agilent technologies, USA)
 - DAD WR detektor (Agilent technologies, USA)
 - Kolona AminexR HPX-87H, 300 x 7,8 mm (Bio.Rad, USA)
- Vodní lázeň (Strojobal, ČR)
- Vortex RS-VF 10 (Phoenix, DE)
- Odstředivka (Hettich, DE)
- MilkoScan FT 120 (FOSS, DNK)

4.4 Přípravy vzorků k analýze

Zkumavky se vzorky buvolího mléka byly rozmrazeny a temperovány na pokojovou teplotu. Následně byly před použitím důkladně zvortexovány. Každý vzorek buvolího mléka byl připraven a analyzován ve dvou opakováních.

Ze zvortexované zkumavky byl odebrán 1 ml vzorku syrového buvolího mléka, ke kterému byl přidán roztok Carez I a Carez II. Oba roztoky o objemu 0,3 ml. Dále bylo přidáno 8,4 ml destilované vody, aby celkový objem ve zkumavce tvořil 10 ml. Takto připravený vzorek byl protřepán a vložen do centrifugy po dobu 10 minut při 9000 otáčkách/min. Po 10 minutách v centrifuze byla ve zkumavkách oddělena vodná vrstva - s obsahem laktózy a organických kyselin a tuhá vrstva – s obsahem tuku a bílkovin.

Injekcí byla odebrána část vodné vrstvy a přes filtr přecezena do skleněné vialky. Filtr byl použit, aby se zabránilo vniknutí nečistot a nemožnosti dále analyzovat vzorky v HPLC.

4.5 Analýza vybraných parametrů

Vzorky byly analyzovány pomocí přístroje HPLC a poté MilkoScan FT 120. Detekce výsledků pomocí HPLC byla prováděna detektorem DAD (UV-VIS detektor s deuteriovou lampou). U všech vzorků byl stanoven průměr dvou měření a směrodatná odchylka pomocí programu Microsoft Excel. Analýza vzorků probíhala ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii 1260 Infinity II DAD WR, díky kterému bylo možné provádět souběžné měření laktózy i citrónové kyseliny. Měření byla prováděna na analytické koloně AminexR HPX-87H (300 x 7,8 mm, velikost částic 9 μm) a za použití izokratické eluce s 0,005 M kyselinou sírovou (průtok 0,6 ml za min.). Pro každou analýzu bylo vstříknuto 20 μl a každý vzorek byl analyzován dvakrát.

Parametry vysokoúčinné kapalinové chromatografie a podmínky analýzy:

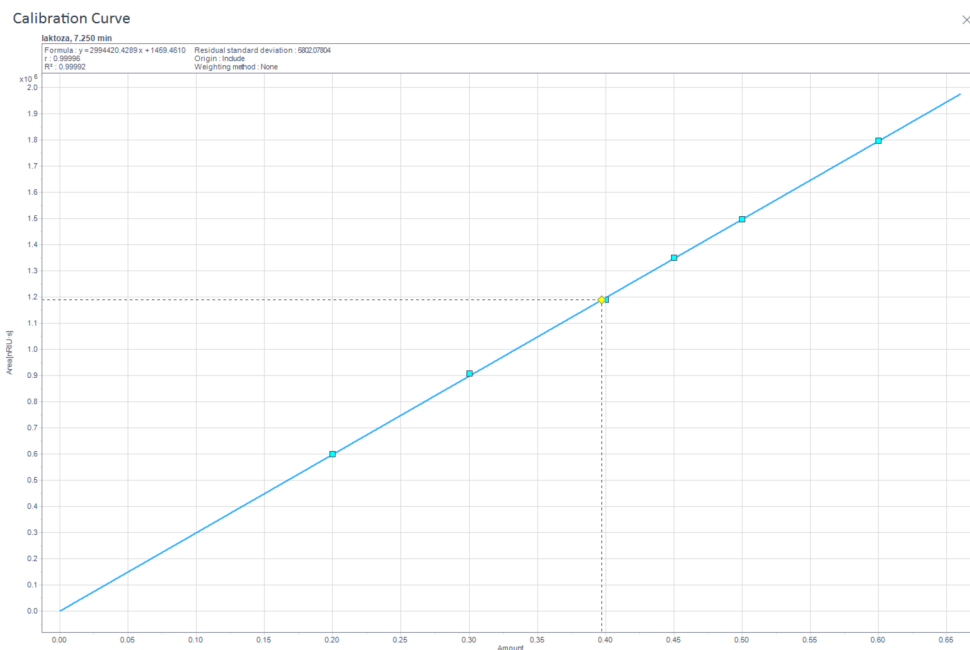
- Mobilní fáze: 0,005 mol/l H_2SO_4
- Průtoková rychlost: 0,6 ml/min
- Teplota kolony: 65 °C
- Teplota obou detektorů: 35 °C

5 Výsledky

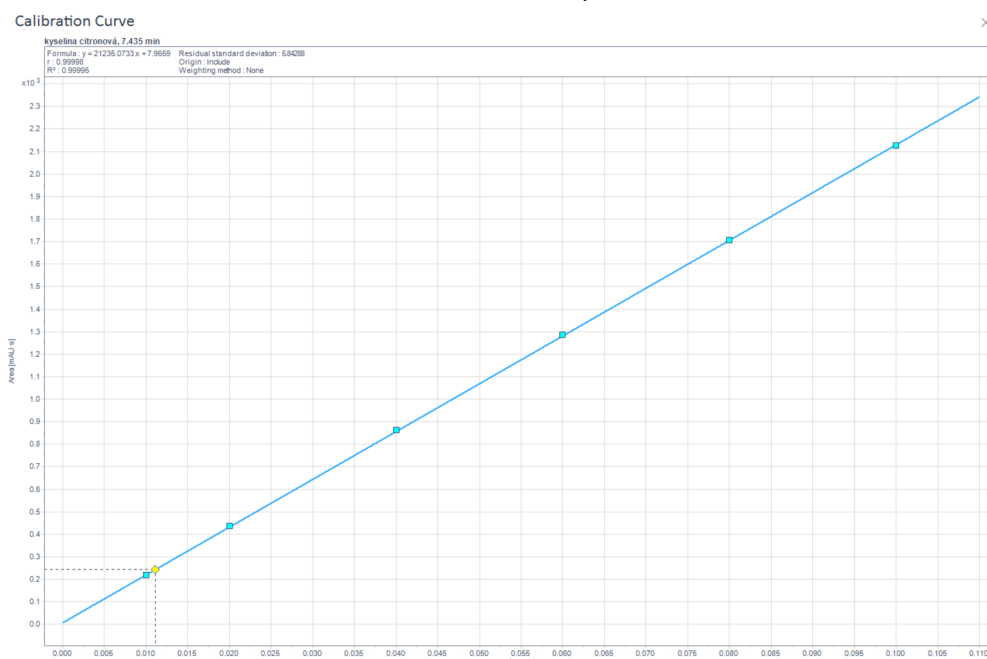
Ke zpracování a vyhodnocení výsledků byly v této práci použity programy Microsoft Excel a OpenLab.

5.1 Analýza přístrojem HPLC

Na obrázku 10 je vyobrazena kalibrační křivka laktózy, na obrázku 11 je vyobrazena kalibrační křivka citrónové kyseliny. V obou případech se jedná o vzorek BMW1222. Obrázky byly vygenerovány pomocí OpenLab programu.



Obr. 10: Kalibrační křivka laktózy vzorku BMW1222.



Obr. 11: Kalibrační křivka citrónové kyseliny vzorku BMW1222.

Tabulka 6 předkládá výsledky stanovení laktózy a citrónové kyseliny v procentech, které byly měřeny pomocí přístroje HPLC. Každý vzorek byl měřen ve dvou opakováních, přičemž tyto hodnoty byly pro účely vyhodnocení zprůměrovány. Výsledky s nejvyšší či nejnižší hodnotou jsou pro přehlednost tučně vyznačené v tabulkách níže.

Vzorek	Citrónová kyselina (%)		Laktóza (%)	
	Průměrná hodnota	SD	Průměrná hodnota	SD
BMW4521	0,15	0,02	4,52	0,34
BMW4621	0,14	0,02	5,10	0,35
BMW4821	0,12	0,02	5,24	0,34
BMW4921	0,15	0,02	4,96	0,32
BMW0122	0,13	0,02	4,53	0,31
BMW0222	0,13	0,02	4,96	0,32
BMW0322	0,14	0,02	4,98	0,31
BMW0422	0,13	0,02	4,86	0,30
BMW0622	0,14	0,02	4,74	0,29
BMW0722	0,10	0,02	4,24	0,29
BMW0822	0,13	0,02	4,64	0,42
BMW1122	0,15	0,02	4,72	0,34
BMW1222	0,10	0,02	4,26	0,35
BMW1322	0,11	0,02	4,76	0,34
BMW1422	0,10	0,02	3,85	0,32
BMW1722	0,09	0,02	4,18	0,31
BMW1822	0,10	0,02	4,52	0,32
BMW2022	0,09	0,02	4,10	0,31
BMW20221	0,10	0,02	4,48	0,30
BMW20222	0,08	0,02	4,80	0,29
Všechny vzorky	0,12	0,02	4,62	0,29
CMW3623	0,27	0,04	4,59	0,21
CMW3723	0,15	0,02	4,97	0,22
CMW3923	0,18	0,02	4,68	0,18
CMW4423	0,13	0,02	4,09	0,17
CMW4523	0,15	0,02	4,65	0,09
CMW4623	0,09	0,02	4,49	0,07
CMW4723	0,15	0,01	4,56	0,08
CMW4823	0,13	0,01	4,43	0,09
CMW4923	0,16	0,01	4,61	0,09
CMW5023	0,14	0,01	4,43	0,21
Všechny vzorky	0,16	0,02	4,55	0,14

Tab. 6: Průměrné výsledky stanovení obsahu citrónové kyseliny a laktózy v % u směsných vzorků buvolího a kravského mléka pomocí přístroje HPLC.

Z výše uvedených výsledků je patrné, že vzorky BMW4521, BMW1122 a BMW4921 vykazují nejvyšší hodnoty obsahu citrónové kyseliny, a to 0,15 %. Naopak nejnižší hodnotu vykazoval vzorek BMW20222, a to 0,08 %. V porovnání s kravskými obsahoval vzorek CMW3623 nejvyšší hodnotu citrónové kyseliny, a to 0,27 %. Avšak tato hodnota byla v porovnání s ostatními vzorky mimo průměrné výsledky dalších vzorků, tudíž zde mohla nastat chyba při analýze vzorku. Nejméně citrónové kyseliny obsahoval vzorek CMW4623, a to 0,09 %. Průměrná hodnota obsahu citrónové kyseliny všech vzorků buvolího mléka byla 0,12 %. U vzorků kravského mléka byla průměrná hodnota citrónové kyseliny 0,16 %.

U obsahu laktózy vykázal vzorek BMW4821 nejvyšší hodnotu, a to 5,24 % a nejnižší vzorek BMW1422, a to 3,85 %. U kravských vzorků byla nejvyšší naměřená hodnota u vzorku CMW3723 4,97 % obsahu laktózy a nejnižší u vzorku CMW4423, a to 4,09 %. Průměrná hodnota obsahu laktózy u všech vzorků buvolího mléka byla 4,62 %. U vzorků kravského mléka byla průměrná hodnota laktózy 4,55 %.

Následující obrázek 11 byl vytvořen v programu Microsoft Excel a cílem tohoto grafu bylo znázornit výkyvy v obsahu laktózy v průběhu půl roku u vzorků buvolího mléka. Až na jisté výkyvy, které mohly být způsobeny nepřesností měření či lidskou chybou, je obsah laktózy stabilní v celém průběhu laktace. Průměrný obsah laktózy v buvolím mléce vzorků z farmy Ohař byl 4,61 %.



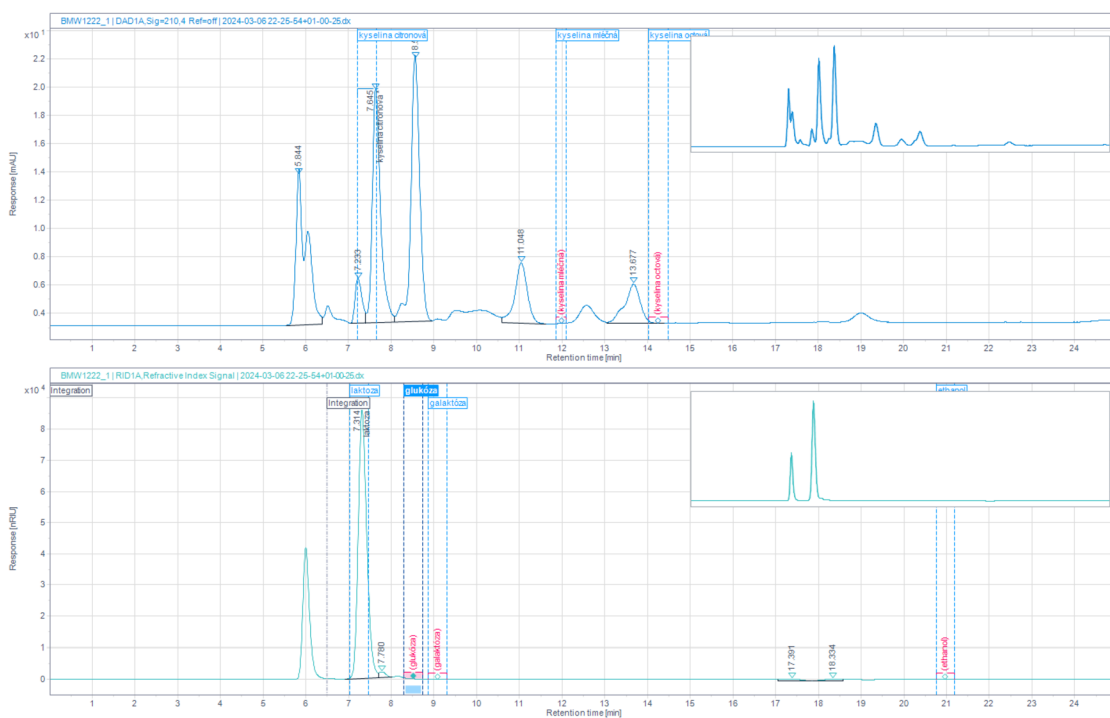
Obr. 11: Změny obsahu laktózy v buvolím mléce během laktace měřený HPLC.

Následující obrázek 12 byl vytvořen v programu Microsoft Excel a cílem tohoto grafu bylo znázornit výkyvy v obsahu citrónové kyseliny v průběhu půl roku u vzorků buvolího mléka. Hodnoty, které lze vyčíst z křivky mají klesající trend, který lze přičíst závislosti na době odběru vzorku. Z důvodu nepříznivé epidemiologické situace byly vzorky odebírány a analyzovány pouze polovinu roku.



Obr. 12: Změny obsahu citrónové kyseliny v buvolím mléce během půl roku.

Obrázek 13 je chromatogram znázorňující vzorek BMW2111, konkrétně v horní části citrónovou kyselinu a v dolní části laktózu. K vyhodnocení chromatogram byl použit program OpenLab.



Obr. 13: Chromatogram vzorku BMW1222 znázorňující citrónovou kyselinu v horní části a laktózu v dolní části.

5.2 Analýza přístrojem MilkoScan FT 120

V tabulce 7 jsou zobrazeny výsledky z vyhodnocení složení vzorků mléka analyzované pomocí přístroje MilkoScan FT 120. Tučně jsou vyobrazeny výsledky, které vykazují nejvyšší nebo nejnižší hodnotu ze všech porovnávaných vzorků.

Vzorky	Tuk (%)	Bílkoviny (%)	Laktóza (%)	Sušina (%)	Tukoprostá sušina (%)	Citronová kyselina (%)
BMW4521	6,33	3,75	5,26	15,8	9,55	0,15
BMW4621	5,59	3,72	5,44	15,55	9,67	0,15
BMW4821	6,23	3,77	5,57	15,87	9,74	0,12
BMW4921	6,51	3,64	5,24	15,67	9,27	0,15
BMW0122	6,82	3,85	5,35	16,45	9,76	0,14
BMW0222	6,34	3,78	5,31	15,65	9,54	0,13
BMW0322	5,6	3,94	5,49	15,54	10,02	0,14
BMW0422	7,02	3,92	5,41	16,79	9,88	0,12
BMW0622	5,57	4,32	6,13	16,75	11,33	0,15
BMW0722	7,58	3,98	5,42	17,32	9,91	0,11
BMW0822	7,51	4,02	5,38	17,44	10,02	0,13
BMW1122	6,8	3,76	5,47	16,26	9,55	0,10
BMW1222	8,02	4,17	5,19	18,08	9,98	0,11
BMW1322	8,34	4,06	5,12	17,96	9,73	0,10
BMW1422	5,1	4,02	5,02	14,78	9,52	0,09
BMW1722	7,77	4,05	5,13	17,4	9,68	0,09
BMW1822	8,21	4,06	5,09	17,87	9,64	0,09
BMW2022	8,3	4,08	5,09	18,05	9,66	0,08
BMW20221	7,73	4,03	5,04	17,32	9,49	0,08
BMW20222	7,41	3,94	5,44	16,79	9,76	0,08
Všechny vzorky	6,94	3,94	5,33	16,67	9,79	0,12
CMW3623	4,53	3,43	4,66	13,32	8,95	0,16
CMW3723	3,96	3,48	4,75	12,85	9,06	0,15
CMW3923	4,35	3,57	4,77	13,43	9,10	0,16
CMW4423	3,95	3,41	4,73	12,75	8,87	0,14
CMW4523	3,27	3,61	4,67	12,33	9,08	0,14
CMW4623	4,14	3,53	4,65	12,91	8,94	0,14
CMW4723	3,83	3,32	4,65	12,37	8,68	0,14
CMW4823	3,86	3,60	4,84	13,13	9,31	0,19
CMW4923	3,95	3,57	4,70	12,85	9,08	0,15
CMW5023	4,22	3,47	4,68	13,02	8,85	0,14
Všechny vzorky	4,01	3,50	4,71	8,99	12,90	0,15

Tab. 7: Výsledky vzorků pomocí přístroje MilkoScan FT 120 v procentech.

Z výše uvedených výsledků bylo vyvozeno, že vzorky BMW4521 a BMW4921 vykazují nejvyšší hodnoty citrónové kyseliny, a to 0,15 %. Oproti tomu vzorek BMW1122, jež byl přeměřen na MilkoScanu FT 120, vykazoval pouze 0,10 % citrónové kyseliny. Zde je patrné, že každá metoda analyzování vzorků má svá úskalí a je třeba vždy měřit více opakování, aby byla minimalizována chybovost. Nejnižší hodnoty obsahu citrónové kyseliny byly naměřeny u vzorků BMW2022, BMW 20221 a BMW 20222 to 0,08 %.

Průměrný obsah laktózy všech vzorků buvolího mléka byl dle analýzy MilkoScan FT 120 5,33 %. U kravského mléka byla průměrná hodnota obsahu laktózy 4,71 %. Průměrný obsah citrónové kyseliny všech vzorků buvolího mléka byl 0,12 % a u kravského mléka 0,15 %.

5.3 Statistické zpracování výsledků

Statistické šetření mezi buvolími a kravskými vzorky mléka bylo zpracováno pomocí programu Microsoft Excel, konkrétně pomocí metody dvouvýběrového F-testu pro rozptyly, s hladinou významnosti $p < 0,05$. Pro statistické šetření mezi výsledky z měření HPLC a MilkoScan byl využit T-test pro nezávislé výběry, s hladinou významnosti $p < 0,05$. Výsledkem statistického šetření byla p hodnota, jež udávala míru podobnosti výsledků. Pokud tato p hodnota byla vyšší než 0,05, nejednalo se o statisticky významný rozdíl mezi porovnávanými vzorky. Při hodnotě p nižší než 0,05 byl potvrzen statisticky významný rozdíl ve vzorcích a záleželo na přesné hodnotě – čím nižší p hodnota byla, tím větší byla významná statistická rozdílnost.

V tabulce 8 je výsledek statistického šetření v obsahu laktózy pomocí přístroje HPLC mezi vzorky mléka kravského a buvolího. Hodnota p byla vyšší než 0,05, konkrétně 0,07, a tím bylo prokázáno, že se obsah laktózy ve vzorcích syrového kravského a buvolího mléka neliší.

	Krávy	Buvoli
Střední hodnota	4,55	4,622
Rozptyl	0,05028889	0,13097474
Pozorování	10	20
Rozdíl	9	19
F	0,38395869	
P (F<=f) (1)	0,07159345	
F krit (1)	0,33925307	

Tab. 8: Statistické šetření rozdílu obsahu laktózy mezi buvolem a krávou u vzorků měřených přístrojem HPLC.

V tabulce 9 bylo stejným způsobem statisticky vyhodnoceny výsledky měření obsahu citrónové kyseliny přístrojem HPLC mezi vzorky kravského a buvolího syrového mléka. Toto statistické vyhodnocení ukázalo, že rozdíly obsahu citrónové kyseliny mezi buvolím a kravským mlékem jsou významné. Hodnota p byla podstatně nižší a to konkrétně 0,0039 po zaokrouhlení.

	Krávy	Buvoli
Střední hodnota	0,155	0,119
Rozptyl	0,00218333	0,00051474
Pozorování	10	20
Rozdíl	9	19
F	4,24164963	
P (F<=f) (1)	0,00387893	
F krit (1)	2,42269894	

Tab. 9: Statistické vyhodnocení rozdílu obsahu citrónové kyseliny mezi buvolem a krávou u vzorků měřených přístrojem HPLC.

Rozdíly ve výsledných průměrných hodnotách měření obsahu laktózy a citrónové kyseliny jsou znázorněny v tabulkách 10 a 11. Hodnota p v tabulce 10 se blíží téměř nule, což vypovídá o statisticky významném rozdílu mezi měřeními HPLC a MilkoScan přístrojem. Výsledné hodnoty obsahu citrónové kyseliny v tabulce 11 se u měření pomocí přístroji HPLC a MilkoScan statisticky nelišily, jak potvrzuje výsledná hodnota p, která byla 0,69.

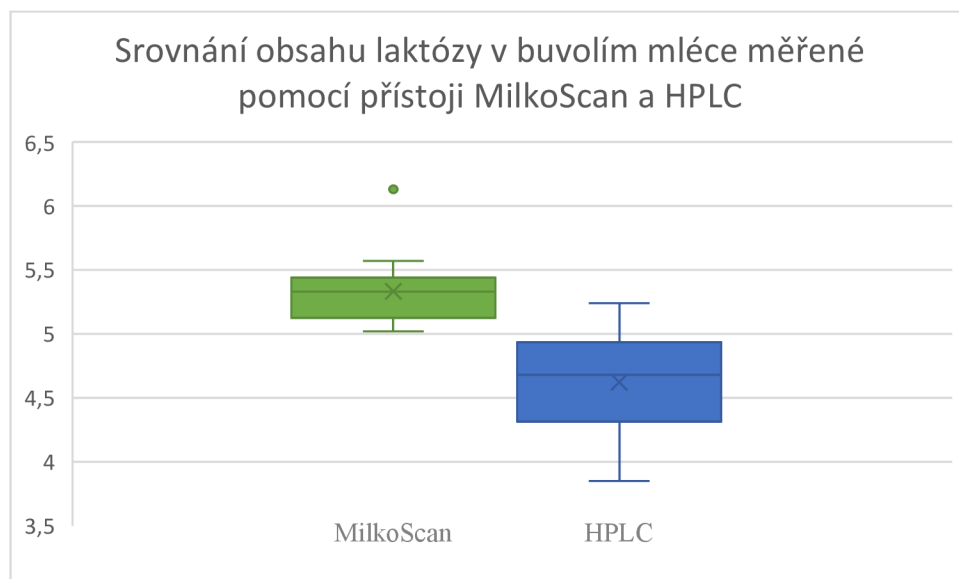
	HPLC	MilkoScan
Střední hodnota	4,622	5,3295
Rozptyl	0,130974737	0,062994474
Pozorování	20	20
df	34	
t Stat	-7,184144234	
P (T<=t)	0,00000	

Tab. 10: Statistické vyhodnocení rozdílu obsahu laktózy v buvolím mléce změřené HPLC a MilkoScanem.

	HPLC	MilkoScan
Střední hodnota	0,119	0,1159
Rozptyl	0,000514737	0,000640305
Pozorování	20	20
df	38	
t Stat	0,407922616	
P (T<=t)	0,68561981	

Tab. 11: Statistické vyhodnocení rozdílu obsahu citrónové kyseliny v buvolím mléce změřené HPLC a MilkoScanem.

Graficky znázorněný statisticky významný rozdíl v obsahu laktózy v buvolím mléce měřené odlišnými metodami – MilkoScan a HPLC na obrázku 14.



Obr. 14: Porovnání obsahu laktózy v buvolím mléce měřené přístroji MilkoScan a HPLC.

6 Diskuze

Mléko a mléčné výrobky jsou součástí lidské výživy již po celá tisíciletí. Z nutričního hlediska je mléko považováno za plnohodnotnou potravinu. Obsahuje všechny esenciálních aminokyseliny, dále vitamíny lipofilní a hydrofilní. Z minerálních látek se v mléce nachází fosfor, hořčík, draslík a také nelze opomenout vápník, jehož vstřebatelnost v těle je nejvyšší ze všech potravin, a to až 30 %.

V dnešní době je vyvíjen tlak v oblasti dostatečně širokého a často obměňovaného portfolia prodávaných mléčných výrobků. Spotřebitel rád vyhledává a zkouší nové alternativy k tradičním výrobkům. Zařazení buvolího mléka a mléčných výrobků z něj do obchodů by konzumentům rozšířilo sortiment o další nutričně a sensoricky zajímavé produkty. Buvolí mléko je oproti kravskému mléku nutričně bohatší, a to konkrétně výrazně vyšším obsahem tuku a bílkovin.

Záměrem této práce bylo porovnat složení kravského a buvolího mléka, konkrétně obsah laktózy a citrónové kyseliny v průběhu laktace. Druhotným cílem práce bylo zjistit, zda je vysokoúčinná kapalinová chromatografie se sériově zapojeným DAD WR detektor vhodnou metodou ke stanovení obsahu laktózy a citrónové kyseliny. HPLC má totiž vysoký stupeň přesnosti, je časově nenáročná, opakovatelná a uživatelsky jednoduchá metoda analýzy vzorků (Trani et al. 2017). Pro statistické účely bylo 20 vzorků syrového buvolího mléka a 10 vzorků syrového kravského mléka měřeno také na přístroji MilkoScan FT 120, kde byla měřena celková hodnota sacharidů ve vzorku a ne pouze obsah laktózy. Z tohoto důvodu byly výsledky z přístroje HPLC a MilkoScan v obsahu laktózy rozdílné.

V průběhu laktace se dle Kumar Patbandha et al. (2015) mění nejen množství, ale také složení nadojeného mléka. Konkrétně obsah laktózy měl ve studii klesající trend, ačkoli je laktóza považována za jednu z nejméně proměnlivých složek mléka. Nejvyšší hodnotu vykazoval obsah laktózy v první třetině laktace (5,83 %), ve druhé třetině laktace (5,65 %) a na konci laktace byl obsah laktózy 5,51 %. Vzorky mléka byly analyzovány v této studii pomocí přístroje LACTOSCAN (New dairy engineering and trading company Pvt. Ltd., Delhi, India). Oproti tomu studie Kuralkar & Kuralkar (2022), kde byl rovněž porovnáván vliv doby laktace a ročního období na průměrný obsah laktózy, se tyto parametry ukázaly jako statisticky nevýznamné. Výsledky měření této studie byly rovněž analyzovány pomocí přístroje LACTOSCAN a průměrný obsah laktózy byl 3,96 %. V kontextu s výsledky mé diplomové práce, kde pro porovnání byla analýza provedena pomocí přístroje MilkoScan FT 120, byl naměřen průměrný obsah laktózy $5,33 \pm 0,20$ %, což je v rozpětí obou studií.

Ve studii Srivastava et al. (2014) byl uveden průměrný obsah laktózy v buvolím mléce 7,17 %. V této studii byla použita metoda vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie (HPLC), oproti našemu průměrnému obsahu laktózy z přístroje HPLC $4,6 \pm 0,3$ %. Rozdíly v této práci mezi přístroji MilkoScan a HPLC jsou zapříčeny v konkrétních měřeních jednotlivých frakcí přístroji. Přístroj HPLC měří pomocí kolony pouze laktózu obsaženou ve vzorku, oproti přístroji MilkoScan, který měří hodnotu všech sacharidů v mléce. Proto byla celková průměrná hodnota obsahu laktózy při měření pomocí MilkoScan vyšší, což dokazuje hodnota p , jež se blíží nule. Tudíž můžeme říci, že se jednalo o statisticky významný rozdíl v měření.

U přístroje HPLC, jsou výsledné hodnoty obsahu laktózy přesnější a to jak u vzorků buvolího, tak kravského mléka.

Ve studii Johansson et al. (2019) sledovali obsah různých parametrů v buvolím mléce 6 týdnů po otelení a sběr vzorků trval 3 měsíce. Ve studii bylo zahrnuto pouze 6 buvolic, což je malý vzorek k porovnávání a statistickému šetření. Obsah citrónové kyseliny byl v prvním týdnu měření 0,15 %. V dalších týdnech se obsah citrónové kyseliny ustálil na 0,18 %, což je mírně vyšší obsah, než uveden v této práci, kde byl obsah citrónové kyseliny v rozmezí 0,8-0,15 % s průměrnou hodnotou $0,12 \pm 0,02$ %. V této studii byla k analýze hodnot použita metoda infračervené spektroskopie. Pro porovnání v další studii Ahin et al. (2014) byly hodnoty měřeny pomocí přístroje FOSS MilkoScan TM 120 s výslednou průměrnou hodnotou obsahu citrónové kyseliny 0,13 %, hodnoty byly v rozmezí 0,11-0,15 %, což odpovídá výsledkům v této práci. V této studii bylo analyzováno přes 600 vzorků získávaných po dobu celé laktace buvolic.

Již na první pohled je z výsledků této práce a v porovnání s ostatními studiiemi zřejmé, že se výsledky obsahu laktózy z různých typů přístrojů liší, avšak naše měření ve dvou opakování přineslo až na výjimky přesné výsledky. Směrodatné odchylky vypovídají o vysoké přesnosti metody určování obsahu výše zmíněných frakcí v mléce. Celkově ze statistického šetření jsou výsledky přesné a správné. Statistické šetření prokázalo, že se složení mléka skotu a buvolů statisticky liší v obsahu citrónové kyseliny, ale neliší se v obsahu laktózy, při měření HPLC. Samozřejmě je bráno v potaz, že rozdíly ve výsledcích mohou být zapříčiněny nedokonalou analýzou, či finálním zpracováním výsledků.

Přínosem této práce je skutečnost, že lze metodu HPLC bezpečně používat pro určení obsahu laktózy a citrónové kyseliny a je možné ji doporučit pro budoucí testování, které by mělo být více rozsáhlé a mělo by trvat po dobu celé laktace.

7 Závěr

Cílem práce bylo porovnat obsah vybraných složek ve vzorcích buvolího mléka pomocí metody kapalinové chromatografie, proto byla v práci prověřena metoda stanovení obsahu laktózy a citrónové kyseliny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s DAD WR detektorem. Tato analýza byla zvolena z důvodu vysoké přesnosti, časové nenáročnosti a opakovatelnosti. Během analýzy bylo změřeno 20 vzorků buvolího mléka a srovnávacích 10 vzorků kravského mléka. Každý vzorek byl analyzován ve dvou opakováních pro lepší vyhodnocení a možnost prověření dat.

Hypotézou práce bylo, že obsah laktózy a některých organických kyselin je odlišný od mléka kravského. Tato hypotéza byla pomocí měření přístrojem HPLC částečně potvrzena. Konkrétně obsah laktózy se ve vzorcích buvolího a kravského mléka statisticky nelišil, avšak obsah citrónové kyseliny vykazoval ve vzorcích buvolího a kravského mléka statisticky významný rozdíl. Při srovnání s měřením přístrojem MilkoScan tomu bylo naopak.

Ze závěru této práce vyplývá několik skutečností. Celkový obsah laktózy měřený HPLC v buvolím mléce je mírně vyšší než u mléka kravského, ale není statisticky významný. Obsah citrónové kyseliny je vyšší u kravského mléka oproti buvolímu mléku a tento rozdíl je statisticky významný. Naproti tomu výsledky měřené přístrojem MilkoScan FT 120 vykazovaly statisticky významný rozdíl v obsahu laktózy mezi vzorky kravského a buvolího mléka, což bylo způsobeno použitím přístroje MilkoScan, který měří celkový obsah sacharidů v mléce nikoli pouze obsah laktózy a je tedy nepřesný. Obsah citrónové kyseliny měřený pomocí přístroje MilkoScan nevykazoval statisticky významné rozdíly ve vzorcích kravského a buvolího mléka. Z naměřených dat lze usuzovat, že buvolí mléko je vhodným alternativním řešením za mléko kravské. Dále se zde nabízí myšlenka začít chovat buvoly ve větší míře v České republice a inspirovat se v zemích Asie, kde je chov buvolů a zpracování jejich mléka naprosto rutinní záležitostí.

Metoda stanovení obsahu laktózy a citrónové kyseliny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s DAD WR detektorem se ukázala jako účinná, ale je třeba dalšího zdokonalování, aby výsledky byly přesnější.

8 Literatura

- A. Presicce G, editor. 2017. The Buffalo (*Bubalus bubalis*) - Production and Research. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS.
- Abbas HM, Badawy L, El-Hamid A, Abd ;, Abo E-H, Asker E-H, Jihan ;, Kassem M, Salama MI. 2019. Bioactive Lipids and Phospholipids Classes of Buffalo and Goat Milk Affected by Seasonal Variations.
- Abd El-Salam MH, El-Shibiny S. 2011. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Science & Technology* **91**:663–699.
- Ahin AS, Yildirim A, Ulutas, Z. 2014. SOME PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF RAW MILK OF ANATOLIAN BUFFALOES. *Page Ital. J. Food Sci.*
- Barłowska J, Sz wajkowska M, Litwińczuk Z, Król J. 2011. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **10**:291–302.
- Bayless TM, Brown E, Paige DM. 2017. Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance. *Current Gastroenterology Reports* **19**:23.
- Bharat A. 2019. Reading Material for Ghee Production Under PMFME Scheme. Available from www.niftem.ac.in.
- Borghese A, Moioli B. 2016. Management of Dairy Animals: Buffalo: Mediterranean Region. Pages 845–849 *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier.
- Borghese A, Rasmussen M, Thomas CS. 2007. Milking management of dairy buffalo. *Italian Journal of Animal Science* **6**:39–50.
- Breed list. 2021, June 12. <https://www.breedslist.com/mediterranea-italiana.htm>.
- Castillo Martinez FA, Balciunas EM, Salgado JM, Domínguez González JM, Converti A, Oliveira RP de S. 2013. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology* **30**:70–83.
- Crittenden RG, Bennett LE. 2005a. Cow's Milk Allergy: A Complex Disorder. *Journal of the American College of Nutrition* **24**:582S-591S.
- Crittenden RG, Bennett LE. 2005b. Cow's Milk Allergy: A Complex Disorder. *Journal of the American College of Nutrition* **24**:582S-591S.
- Czaplicki S. 2013. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. *Page Column Chromatography*. InTech.
- D'Ambrosio C, Arena S, Salzano AM, Renzone G, Ledda L, Scaloni A. 2008. A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens. *PROTEOMICS* **8**:3657–3666.
- 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.
- Dorni C, Sharma P, Saikia G, Longvah T. 2018. Fatty acid profile of edible oils and fats consumed in India. *Food Chemistry* **238**:9–15.
- Fantuz F, Todini L, Ferraro S, Fatica A, Marcantoni F, Zannotti M, Salimei E. 2022a. Macro Minerals and Trace Elements in Milk of Dairy Buffaloes and Cows Reared in Mediterranean Areas. *Beverages* **8**:51.
- Fantuz F, Todini L, Ferraro S, Fatica A, Marcantoni F, Zannotti M, Salimei E. 2022b. Macro Minerals and Trace Elements in Milk of Dairy Buffaloes and Cows Reared in Mediterranean Areas. *Beverages* **8**:51.

- Fedosov SN, Nexo E, Heegaard CW. 2019. Vitamin B12 and its binding proteins in milk from cow and buffalo in relation to bioavailability of B12. *Journal of Dairy Science* **102**:4891–4905.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. Production quantities of Raw milk of buffalo by country.
- Gänzle MG. 2022. Lactose. Pages 96–102 *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier.
- Griffiths JK. 2013. Vitamin Deficiencies. Pages 997–1002 *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*. Elsevier.
- Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. 2007. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease* **6**:25.
- Hegde NG, Abdullah-Al-Zabir). 2019. Buffalo Husbandry for Sustainable Development of Small Farmers in India and other Developing Countries. Page *Asian Journal of Research in Animal and Veterinary Sciences*.
- Jaiswal L, Worku M. 2022. Recent perspective on cow's milk allergy and dairy nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **62**:7503–7517.
- Johansson M, Lundh A, Sivananthawerl T. 2019. Composition and Coagulation Properties of Buffalo Milk Produced Under Swedish Conditions; Changes Taking Place During the First Weeks of Lactation. *Dairy & Veterinary Sciences* **14**:46–53.
- Kehler M. 2016. *The Oxford Companion to Cheese*.
- Kumar Patbandha T, Ranjan Maharana B, Marandi S, Patbandha TK, Ravikala K, Maharana BR, Marandi S, Ahlawat AR, Gajbhiye PU. 2015. Effect of season and stage of lactation on milk components of Jaffrabadi buffaloes. Available from www.thebioscan.in.
- Kuralkar P, Kuralkar S. 2022. Effect of season and stage of lactation on milk components in Purnathadi buffaloes. *Buffalo Bulletin* **41**:511.
- LOMER MCE, PARKES GC, SANDERSON JD. 2008. Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **27**:93–103.
- Malik TF, Panuganti KK. 2023. Lactose Intolerance.
- Marrubini G, Papetti A, Genorini E, Ulrici A. 2017. Determination of the Sugar Content in Commercial Plant Milks by Near Infrared Spectroscopy and Luff-Schoorl Total Glucose Titration. *Food Analytical Methods* **10**:1556–1567.
- Mcdonald PD. 2008. *James Waters and His Liquid Chromatography People: A Personal Perspective*.
- Medhammar E, Wijesinha-Bettoni R, Stadlmayr B, Nilsson E, Charrondiere UR, Burlingame B. 2012. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **92**:445–474.
- Ménard O, Ahmad S, Rousseau F, Briard-Bion V, Gaucheron F, Lopez C. 2010. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chemistry* **120**:544–551.
- Minervino AHH, Zava M, Vecchio D, Borghese A. 2020. *Bubalus bubalis: A Short Story*. *Frontiers in Veterinary Science* **7**.
- Mobassaleh M, Montgomery RK, Biller JA, Grand RJ. 1985. Development of carbohydrate absorption in the fetus and neonate. *Pediatrics* **75**:160–6.
- Mota-Rojas D, Rosa G de, Mora-Medina P, Braghieri A, Guerrero-Legarreta I, Napolitano F. 2019. Dairy buffalo behaviour and welfare from calving to milking. *CABI Reviews*:1–9.
- Nayak NK. 2015. MILK COMPOSITION AND ITS CONSTITUENTS.
- Pavčina Navrátilová Mvd, Michaela Králová Mvd, MVDr Bohumíra Janštová D, Hana Přidalová I, Šárka Cupáková Mvd, Lenka Vorlová Mvd. 2012. *HYGIENA PRODUKCE MLÉKA*. Brno.

- Pinnen F et al. 2009. Codrugs Linking l-Dopa and Sulfur-Containing Antioxidants: New Pharmacological Tools against Parkinson's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **52**:559–563.
- Rafiq S, Huma N, Pasha I, Sameen A, Mukhtar O, Khan MI. 2015. Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **29**:1022–1028.
- Schneider Z, Stroinski A. 1987. *Comprehensive B12*. DE GRUYTER.
- Shockcor JP. 2017. HPLC–NMR, Pharmaceutical Applications. Pages 141–151 *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier.
- Srivastava A, Tripathi R, Verma S, Srivastava N, Rawat AKS, Deepak D. 2014. A novel method for quantification of lactose in mammalian milk through HPTLC and determination by a mass spectrometric technique. *Anal. Methods* **6**:7268–7276.
- Swadesh JK. 2001. HPLC: Practical and Industrial Applications. Page (Swadesh JK, editor). CRC Press.
- Trani A, Gambacorta G, Loizzo P, Cassone A, Fasciano C, Zambrini AV, Faccia M. 2017. Comparison of HPLC-RI, LC/MS-MS and enzymatic assays for the analysis of residual lactose in lactose-free milk. *Food Chemistry* **233**:385–390.
- Tricon S, Burdge GC, Kew S, Banerjee T, Russell JJ, Jones EL, Grimble RF, Williams CM, Yaqoob P, Calder PC. 2004. Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* **80**:614–620.
- Urbienė S, Leskauskaitė D. 2006. FORMATION OF SOME ORGANIC ACIDS DURING FERMENTATION OF MILK. Page *POLISH JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION SCIENCES* Pol. J. Food Nutr. Sci.
- Varricchio ML, Di Francia A, Masucci F, Romano R, Proto V. 2007. Fatty acid composition of Mediterranean buffalo milk fat. *Italian Journal of Animal Science* **6**:509–511.
- Wahid H, Rosnina Y. 2016. Management of Dairy Animals: Buffalo: Asia. Pages 836–844 *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier.
- Yoganandi J, Mehta BM, Wadhvani KN, Darji VB, Aparnathi KD. 2014. Evaluation and comparison of camel milk with cow milk and buffalo milk for gross composition. *Journal of Camel Practice and Research* **21**:259.
- Zava MA, Sansiñena M. 2017. The Buffalo (*Bubalus bubalis*) - Production and Research. Page (A. Presicce G, editor). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS.