

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Použití metody NMR k detekci falšování kozího a ovčího  
mléka mlékem kravským**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Šárka Altmannová**

**Obor studia: Výživa a potraviny (AMD)**

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

**Konzultant: Ing. Lucie Rysová**

**© 2021 ČZU v Praze**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Použití metody NMR k detekci falšování kozího a ovčího mléka mlékem kravským" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4. 2021

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Veronice Legarové, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při vypracování diplomové práce a Ing. Lucii Rysové za zprostředkování vzorků mléka, poskytnutí cenných rad a ochotnou asistenci během zpracovávání praktické části. Velký vděk bych také ráda vyjádřila své rodině za dosavadní podporu a poskytnutí ideálních podmínek pro studium na vysoké škole.

# Použití metody NMR k detekci falšování kozího a ovčího mléka mlékem kravským

## Souhrn

Falšování potravin má pravděpodobně stejně dlouhou historii jako jejich samotná výroba a tato problematika se nevyhýbá ani mléku a mléčným produktům. Obvyklým případem falšování je nahrazení drahého a vysoce kvalitního mléka levnějším mlékem jiného druhu. Příkladem takového falšování je ředění kozího a ovčího mléka mlékem kravským. Konzumace kozího a ovčího mléka přináší řadu zdravotních benefitů a těší se vzrůstající oblibě. Zároveň je ale produkce těchto druhů mlék značně omezená a finančně nákladnější, a tak se jako atraktivní možnost jeví obtížně prokazatelný přídavek levnějšího a dostupnějšího kravského mléka pro navýšení ekonomického zisku z produkce. Praktikováním této nekalé činnosti dochází ke klamání spotřebitele a existuje zde i riziko ohrožení zdraví konzumenta.

V současnosti je věnována pozornost vývoji spolehlivých analytických metod umožňujících autentizaci potravin a získání účinného nástroje pro zajišťování kvality a bezpečnosti potravin. Jednou z metod skýtajících potenciál pro využití v oblasti odhalování adulterace mléka je nukleární magnetická rezonance. Hlavní výhody této spektroskopické metody spočívají v jednoduchosti, robustnosti a schopnosti analyzovat rychle velká množství vzorků.

Cílem této práce bylo ověřit vhodnost metody  $^1\text{H}$  NMR pro detekci falšování kozího a ovčího mléka mlékem kravským. Byly analyzovány a navzájem porovnávány sady vzorků kravského mléka se vzorky kozího a ovčího mléka. Na základě získaných NMR spekter a dat z dostupné vědecké literatury byla identifikována řada látek odpovědných za druhovou variabilitu jednotlivých druhů mlék, které by mohly sloužit jako indikátory falšování.

$^1\text{H}$  NMR se zde osvědčila jako vhodná metoda pro použití k odhalování falšování kozího a ovčího mléka kravským mlékem, je však zapotřebí dalšího výzkumu. Získaná data mohou být vhodným podkladovým materiálem pro další testování NMR, zejména v rámci cílené analýzy.

**Klíčová slova:** falšování, NMR, mléko kravské, mléko kozí, mléko ovčí

# The use of the NMR method for the detection of goat and sheep milk adulteration by cow milk

## Summary

Food adulteration has the same long history as food production itself, and milk and dairy products do not avoid this problem either. Usual case of adulteration is replacing expensive and high quality milk by cheaper types of milk. A typical example of this method of adulteration is the dilution of goat and sheep milk by cow milk. Consumption of goat and sheep milk brings a number of health benefits and it has been growing in popularity in recent years. However, the production of these types of milk is very limited and expensive. For increasing of the producers' economic profit, an attractive option is the addition of cheaper and more affordable cow milk, which is also difficult to prove. Practicing this unfair activity misleads the customers and it also poses a risk of health hazards.

Nowadays, great attention is paid to the development of reliable analytical methods enabling food authentication and obtaining an effective tool for ensuring food quality and safety. One of these methods is nuclear magnetic resonance. The main advantages of this method are simplicity, robustness and the ability to quickly analyze large numbers of samples.

The aim of this work was to verify the suitability of  $^1\text{H}$  NMR for the detection of adulteration of goat and sheep milk by cow milk. Samples of pure cow milk were analyzed and compared to the goat and sheep milk. Based on the obtained NMR spectra, a number of substances have been identified from available scientific literature. These metabolites are considered as responsible for the species variability of individual types of milk and they could function as indicators of adulteration.

The  $^1\text{H}$  NMR method has proven to be suitable for the detection of goat and sheep milk adulteration, but further testing is needed in the future. The data obtained could be a suitable material for further NMR testing in a targeted analysis.

**Keywords:** adulteration, NMR, cow milk, goat milk, sheep milk

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Hypotéza a cíl práce .....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Mléko a jeho význam ve výživě člověka.....</b>	<b>9</b>
3.1.1	Produkce kravského, kozího a ovčího mléka .....	10
3.1.2	Složení mléka a rozdíly mezi kravským, kozím a ovčím mlékem.....	11
<b>3.2</b>	<b>Falšování mléka a mléčných výrobků.....</b>	<b>21</b>
3.2.1	Definice falšování potravin .....	21
3.2.2	Způsoby falšování mléka.....	22
3.2.3	Falšování kozího a ovčího mléka kravským mlékem .....	23
<b>3.3</b>	<b>Nukleární magnetická rezonance .....</b>	<b>28</b>
3.3.1	Instrumentace NMR.....	28
3.3.2	Princip NMR .....	29
3.3.3	Využití NMR v mlékařství.....	32
3.3.4	Výhody a limitace NMR analýzy .....	33
<b>4</b>	<b>Materiály a metodika.....</b>	<b>35</b>
4.1	Úvod do experimentu .....	35
4.2	Analyzované vzorky mléka .....	35
4.3	Použité chemikálie .....	37
4.4	Přístroje a vybavení .....	37
4.5	Software.....	37
4.6	Příprava vzorků pro $^1\text{H}$ NMR analýzu .....	38
4.7	Provedení a parametry analýzy $^1\text{H}$ NMR .....	38
4.7.1	Statistické zpracování a vyhodnocení dat .....	39
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>40</b>
5.1	Kozí a kravské mléko.....	40
5.2	Ovčí a kravské mléko .....	45
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>55</b>

## 1 Úvod

Mléko a mléčné produkty mají v historii lidstva velmi dlouhou tradici a patří mezi významné komodity na trhu. Vzhledem k nutričně výhodnému složení hrají důležitou roli v lidské výživě. Kromě kaloricky významné laktózy a lipidů je mléko také zdrojem vysoce kvalitních bílkovin a biologicky aktivních látek, řady vitaminů a minerálních prvků, které jej staví v oblasti výživy člověka na přední příčky významnosti.

V současné době je světově nejrozšířenější konzumace kravského mléka. Stoupající oblibě se ale těší také mléka malých přežvýkavců, jako jsou ovce a kozy. Ovčí a kozí mléko má oproti kravskému do jisté míry procentuálně odlišné složení některých komponent, které činí tyto dva druhy mlék v porovnání s mlékem kravským z nutričního hlediska výhodnějšími a také jsou u nich patrné rozdílné organoleptické vlastnosti. Produkce těchto zdraví prospěšných a sensoricky zajímavých komodit je ale v porovnání s kravským mlékem značně omezena sezónní cyklicitou a výrazně nižší dojivostí. Tato limitace činí produkci kozího a ovčího mléka ekonomicky nákladnou, což se odráží zejména ve vysoké ceně mléka, a může bránit i uspokojivému pokrytí stále rostoucí poptávky na trhu. Proto zde existuje nezanedbatelné riziko, že se výrobci za účelem ekonomického zisku a uspokojení poptávky spotřebitelů budou uchýlovat k nekalým praktikám prostřednictvím falšování. Jako atraktivní a jednoduchý způsob adulterace kozího a ovčího mléka se jeví ředění levnějším a dostupnějším kravským mlékem.

Falšování kozího a ovčího mléka kravským znamená nejen jasné klamání spotřebitele, ale také pro některé konzumenty představuje značné zdravotní riziko. Odhalení tohoto způsobu falšování je velmi obtížné. Proto je věnována pozornost vývoji různých analytických metod vhodných k úspěšné autentizaci potravin a tím zajištění ochrany spotřebitele a bezpečnosti a kvality potravin.

Jednou z aktuálně rozvíjených metod je nukleární magnetická rezonance. Využívá magnetických vlastností jader prvků a umožňuje získat obsáhlé objemy informací o metabolomu mléka a řady dalších potravin. Tato metoda má do budoucna značný potenciál pro využití v oblasti falšování potravin a mohla by se například uplatnit i jako rutinní technika využívaná k odhalování ředění mléka mlékem jiného živočišného druhu.

## **2 Hypotéza a cíl práce**

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

Cílem této diplomové práce je proměřit několik sad předem připravených vzorků kozího, ovčího a kravského mléka z různých farem v České republice a ověřit vhodnost metody  $^1\text{H}$  NMR k odhalování falšovaného kozího a ovčího mléka.



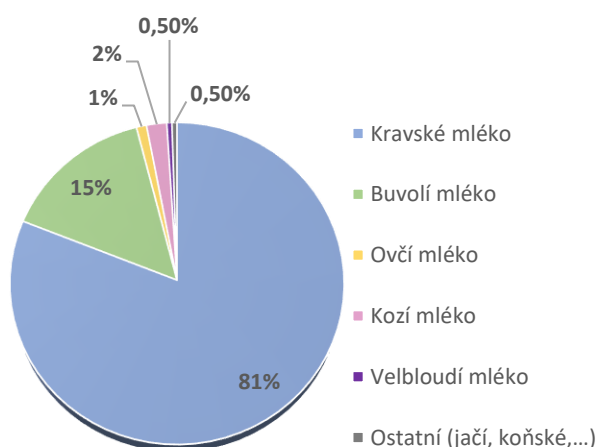
### 3 Literární rešerše

#### 3.1 Mléko a jeho význam ve výživě člověka

Mléko je definováno jako fluidní sekret mléčných žláz savců (Yang et al. 2016). Jedná se o komplexní, nutričně vyvážený produkt, primárně určený pro pokrytí výživových potřeb mláďat. Mléko hospodářských zvířat však od pradávna plní pro člověka funkci žádoucího a cenného zdroje potravy a tvoří celoživotní součást jídelníčku, jež v rámci výživy poskytuje řadu nepostradatelných makro- i mikronutrientů. Historie konzumace mléka hospodářských zvířat člověkem sahá do neolitického období před 11 000 lety, kdy naši předci upustili od kočovného způsobu života a v blízkosti svých stálých příbytků začali pěstovat plodiny a domestikovat zvířata za účelem obživy a hospodářského užitku. Prvními domestikovanými zvířaty byly ovce a kozy na Blízkém východě, a to díky jejich tělesné konstituci, nenáročnosti na chov, přizpůsobivosti a sociální povaze (Barlowska et al. 2011; Balthazar et al. 2017).

Kromě kaloricky významných lipidů a laktózy mléko obsahuje další biologicky aktivní látky jako esenciální aminokyseliny, nenasycené mastné kyseliny, lecitin, karnitin, kreatin, cholin, oligosacharidy, imunoglobuliny, peptidy či nukleotidy. Je významným zdrojem některých vitaminů a minerálních látek (Arsić et al. 2009; Sundekilde et al. 2013; Li et al. 2017). Skladbu mléčných komponent ovlivňuje řada abiotických a biotických faktorů (Yang et al., 2016). Složení mléka má mimo jiné vliv na technologické vlastnosti a tím jeho zpracovatelnost v mléčném průmyslu a následně i uvádění mléčných výrobků na trh (Park et al. 2007).

Nejvyužívanějším druhem mléka je v současnosti mléko kravské. Zastává 81 % světové produkce mléka a jeho průmyslového zpracování. V některých zemích také hraje významnou roli mléko buvolí (15 % světové produkce). Menší hospodářský význam mají v celosvětovém měřítku mléka ovčí, kozí, jačí, koňské nebo například velbloudí. Ty hrají důležitou roli zejména v rozvojových zemích (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2020a). Podíl zastoupení jednotlivých druhů mlék na celkové světové produkci je graficky shrnut na Obrázku 1.

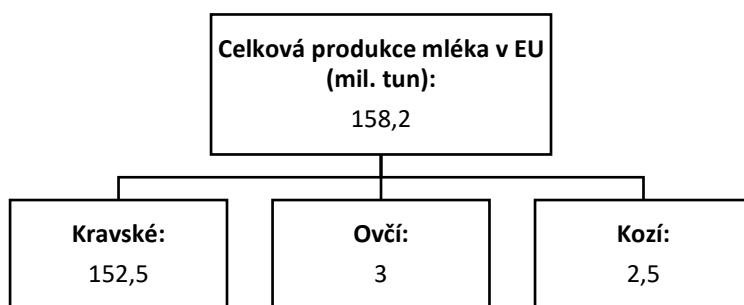


**Obrázek 1:** Světová produkce mléka dle druhů hospodářských zvířat (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2020a).

### 3.1.1 Produkce kravského, kozího a ovčího mléka

Pozici světového lídra v produkci mléka zastává aktuálně Indie následována Evropskou unií (která je také hlavním exportérem mléka) a USA. Jak již bylo zmíněno, převážná část globální produkce mléka (v roce 2019 celkově 852 milionů tun) připadá kravskému mléku (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2020b). Zaměříme-li se na produkci mléka v Evropské unii, jeho množství činilo v roce 2019 celkem 158,2 milionů tun, přičemž se kravské mléko podílelo z 96 % (Eurostat 2019).

Malí přežvýkavci, jako jsou kozy a ovce, se využívají jako zdroj obživy především v rozvojových zemích s nepříliš vlídnými klimatickými podmínkami, mimo to i díky nízkým nákladům na chov a kratším březostem zvířat. Kozy mají vyšší výnos mléka než ovce a jejich chov je rozšířen zejména v Asii (až 60 % světové populace koz), oblastech Karibiku a střední a západní Afriky, a to nejčastěji v rámci domácností pro vlastní potřebu. Největšími producenty kozího mléka ve světě jsou Indie, Bangladéš a Pákistán. Ovce jsou v rozvojových zemích chovány spíše pro maso. Chovy pro mléčnou produkci se koncentrují zejména v oblasti Středomoří a Blízkého východu. Nejvíce světové produkce ovčího mléka pokrývá Čína, Turecko a Řecko, v rámci EU se chov ve větší míře soustředí zejména Španělsko, Francie a již zmíněné Řecko a Kypr, kde tvoří významný ekonomický element (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2020c). V České republice chov ovcí a koz od výrazného úpadku v devadesátých letech zažívá renesanci a díky stoupající oblibě produkce kozího a ovčího mléka v současnosti mírně roste (Ministerstvo zemědělství České republiky 2018). Podíl produkce kravského, kozího a ovčího mléka je znázorněn na Obrázku 2.



**Obrázek 2:** Produkce jednotlivých druhů mlék v Evropské unii za rok 2019 (Eurostat 2021).

### 3.1.2 Složení mléka a rozdíly mezi kravským, kozím a ovčím mlékem

Přestože je podstata mléka u všech savců stejná, z hlediska obsahu jednotlivých komponent a fyzikálně-chemických vlastností existují mezi jednotlivými druhy mlék určité rozdíly. Průměrné zastoupení základních živin kravského, kozího a ovčího mléka je shrnuto v Tabulce 1. Zastoupení většiny nutrientů v kravském, kozím a ovčím mléce je přibližně stejné. Ovčí mléko v porovnání s kravským, obsahuje více tuku, bílkovin vč. kaseinu a syrovátkových bílkovin a popelovin (Jandal 1996). Jak ale bylo zmíněno, na reálný obsah látek v mléce má vliv řada faktorů, jako jsou genetika, stádium laktace, roční období, výživa zvířete, či stáří a případná onemocnění zvířete. Výrazné rozdíly v obsahu mléčných složek se mohou vyskytovat mezi jednotlivými plemeny hospodářských zvířat (Yang et al., 2016). Pomocí suplementace krmiv se může také navyšovat i zastoupení žádoucích a lidskému zdraví prospěšných složek, například konjugované linolové kyseliny či nenasycených mastných kyselin (Mir et al. 1999). Obsah základních složek kravského mléka se v průběhu roku výrazně neliší, k otelování a dojení skotu v chovech dochází celoročně. Oproti tomu je kozí a ovčí mléko produkováno sezónně a v průběhu laktace se složení dle změn ročního období různí – ke konci laktace se zvyšuje podíl tuku, bílkovin, sušiny a minerálních látek, naopak klesá obsah laktózy (Park et al. 2007).

**Tabulka 1:** Průměrné zastoupení základních živin kozího, ovčího a kravského mléka.

Složka	Kravské mléko	Kozí mléko	Ovčí mléko
Voda (%)	87,8	88,9	83
Laktóza (%)	4,8	4,4	4,9
Tuk (%)	3,9	3,5	7
Bílkoviny (%)	3,3	3,1	5,8
Kasein (%)	2,7	2,6	4,9
Albuminy, globuliny (%)	0,6	0,6	1
Popeloviny (%)	0,7	0,8	0,9
Ca (mg/100 ml)	120	100	190
Cholesterol (mg/100 ml)	14	10	11
<b>Mastné kyseliny</b>			
Nasycené (g/100 g)	2,4	2,3	3,8
Monoenové (g/100 g)	1,1	0,8	1,5
Polyenové (g/100 g)	0,1	0,1	0,3

Zdroj: Kuchtík et al. (2011).

### 3.1.2.1 Sacharidy

Stejně jako u většiny savců i u kravského, kozího a ovčího mléka představuje hlavního a specifického zástupce sacharidů laktóza, která je tvořena v mléčné žláze za aktivní účasti  $\alpha$ -laktoglobulinu z glukózy a galaktózy. Obsah laktózy dosahuje u těchto tří druhů mlék podobných hodnot, u kozího mléka bývá hladina laktózy přibližně o 0,2-0,5 % nižší než u kravského. Poměr obsahu laktózy v mléce ovčím je vůči celkové sušině menší než u ostatních dvou druhů. Z nutričního hlediska představuje laktóza kaloricky cenný nutrient usnadňující absorpci vápníku, hořčíku a fosforu ve střevě (Park et al. 2007).

Neopomenutelnou součástí mléka jsou oligosacharidy. Pro jejich vysoký obsah je favorizováno kozí mléko, v němž množství oligosacharidů převažuje až čtyřnásobně nad kravským a desetinásobně nad ovčím mlékem. Díky tomu, že se profil jednotlivých oligosacharidů do určité míry podobá lidskému mléku, může být kozí mléko považováno za potenciálně vhodný přirozený zdroj oligosacharidů, které hrají nezastupitelnou roli ve výživě kojenců. Oligosacharidy se mj. podílí na vývoji centrální nervové soustavy, mají prebiotické, antiadhezivní a antipatogenní účinky. Mezi nutričně významné zástupce přítomné v kozím mléce patří například 3'-galaktosyllaktóza, 6'-galaktosyllaktóza či 2'-fukosyllaktóza (Bode 2015; Sousa et al. 2019).

### 3.1.2.2 Lipidy

Lipidy mléka představují stěžejní složku nejen z výživového hlediska, ale také z pohledu fyzikálních a sensorických vlastností či ceny mléčných produktů. Mléčnou tukovou složku zastupují z 98 % triacylglyceroly (TAG), dále diacylglyceroly, monoacylglyceroly, komplexní lipidy (fosfolipidy) a liposolubilní komponenty, jako je například cholesterol (Park & Haenlein 2007).

Tuková frakce mléka malých přežvýkavců je v porovnání s kravským mlékem odlišná. Tukové globule v mléce ovcí a koz dosahují v průměru menší velikosti než v mléce kravském (průměrně 3.30  $\mu\text{m}$  pro ovčí, 3.49  $\mu\text{m}$  pro kozí, 4.55  $\mu\text{m}$  kravské mléko). Se zmenšující se velikostí tukových kuliček vzrůstá celkový povrch, což umožňuje snazší přístup lipázám. Kozí a ovčí mléko je díky tomuto aspektu přirozeně homogenizované a lépe stravitelné lidským trávicím systémem v porovnání s kravským (Park & Haenlein 2007; Kumar et al. 2012). Kozí mléko postrádá aglutinační protein způsobující shlukování tukových kuliček a nedochází tak k rapidnímu vyvstávání smetany, což je běžné u kravského mléka (Jandal 1996).

Výrazné rozdíly mezi lipidy jednotlivých druhů mlék můžeme sledovat z hlediska obsahu mastných kyselin (MK). TAG kozího a ovčího mléčného tuku jsou tvořeny vyšším množstvím MK s krátkým a středním řetězcem. Orientační přehled procentuálního zastoupení MK v jednotlivých druzích mlék je uveden v Tabulce 2. Zejména mléko kozí se vyznačuje vyšším obsahem kapronové (C6), kaprylové (C8) a kaprinové (C10) kyseliny. Přítomnost těchto mastných kyselin zapříčiňuje typickou „kozí“ chuť a aroma mléka a produktů z něj (Jandal 1996; Park et al. 2007).

Z nutričního hlediska je také u jednotlivých druhů mlék porovnáván obsah cholesterolu spojeného se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění. Nejvyšší podíl má v tukové frakci kozí (0,54 %), dále ovčí (0,47 %) a nejnižší obsah cholesterolu z těchto tří druhů mlék obsahuje dle Smiddyho et al. (2012) mléko kravské (0,42 %). S přihlédnutím na celkový obsah tuku u těchto tří druhů mlék však vede v obsahu cholesterolu na množství mléka mléko ovčí. Na druhou stranu byl ale u mléka vypořádován jeho hypocholesterolemický efekt Hepner et al. (1979). Významnější potenciál z hlediska pozitivního vlivu na hladinu demonizovaného nízkodenzitního cholesterolu vykazuje kozí a ovčí mléko. Jak již bylo zmíněno, v kozím a ovčím mléce jsou oproti kravskému hojněji přítomny MK se středním řetězcem, ale také monoenoové MK a esenciální polyenoové MK. Vyšší hladiny mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem mohou zapříčinit redukci syntézy endogenního cholesterolu a jeho absorpce ve střevě. Nenasycené MK jsou známy pro své hypocholesterolemické účinky (Park et al. 2006; López-Aliaga et al. 2010).

**Tabulka 2:** Zastoupení mastných kyselin v kozím, ovčím a kravském mléce.

MK	Kravské mléko (%)	Kozí mléko (%)	Ovčí mléko (%)
C4:0	3,3	2,6	4
C6:0	1,6	2,9	2,6
C8:0	1,1	2,7	2,5
C10:0	3	8,4	7,5
C12:0	3,1	3,3	3,7
C14:0	9,5	10,3	11,9
C16:0	26,5	24,6	25,2
C16:1	2,3	2,2	2,2
C18:0	14,6	12,5	12,6
C18:1	29,8	28,5	20
C18:2	2,5	2,2	2,1

Zdroj: Jandal (1996).

Další specifitu poskytují kozí a ovčí mléčné produkty. Během zrání sýrů dochází ke vzniku větvených MK s methylovým či ethylovým substituentem (např. 3-methylbutanová, 4-methylpentanová a další). Mastné kyseliny 4-methyloktanová a 4-ethyloktanová, které jsou pro kozí a ovčí produkty specifické, pravděpodobně také dodávají produktům charakteristické kozí a skopové aroma (Raynal-Ljutovac et al. 2008; Whetstine & Drake 2008).

V oblasti výživy člověka vykazuje mléko potenciál funkční potraviny, a to díky možnosti zvyšování obsahu zdraví prospěšných látek v mléce prostřednictvím výživy dojeného zvířete. Můžeme tak docílit i žádoucích změn mléčné tukové frakce. Suplementací krmiva slunečnicovými semeny lze například navýšit obsah konjugované linolové kyseliny (CLA) (Hernández et al. 2007), či přidávkem rybího tuku obohatit mléko o n-3 mastné kyseliny - eikosapentaenovou (EPA) a dokosahexaenovou kyselinu (DHA) (Albenzio et al. 2016).

CLA ve formě izomeru 9c, 11t-18:2 vzniká v bacheru přežvýkavců mikrobiální hydrogenací linolenové kyseliny. Vykazuje řadu vlastností, jako jsou antikancerogenní, hypolipidemické, antihypertenzní a antidiabetické (Hur et al. 2017). EPA a DHA, metabolicky příbuzné látky esenciální linolenové kyseliny, mohou vykazovat celou řadu molekulárních a buněčných účinků, vedoucích ke snížení závažnosti rizikových faktorů metabolických, zánětlivých a kardiovaskulárních onemocnění. DHA je také nezbytná pro zachování správné funkce zraku a centrální nervové soustavy (Marventano et al. 2015).

### 3.1.2.3 Proteiny

Mléko a mléčné výrobky jsou z nutričního hlediska hodnotným zdrojem vysoce kvalitních bílkovin s vyváženým zastoupením aminokyselin a ovlivňují také technologické vlastnosti mléka. Kromě toho řada z nich vykazuje škálu biologických aktivit ve prospěch lidského organismu (viz Tabulka 3) (Korhonen et al. 1998). Obsah bílkovin se v kravském a kozím mléce pohybuje okolo 32 g/l a ovčí mléko může obsahovat až kolem 60 g/l. Množství bílkovin v mléce je jedním z hlavních kvalitativních kritérií a významně ovlivňuje cenu mléka (Raynal-Ljutovac et al. 2008; Pereira 2014).

Majoritní proteiny kozího, ovčího a kravského mléka se svojí podstatou neliší, rozdílné jsou jejich poměry. Zhlediska jejich základního rozdělení na nerozpustnou kaseinovou frakci a rozpustné syrovátkové bílkoviny jsou standardně dále klasifikovány do skupin  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\kappa$ -kaseinů,  $\alpha$ -laktalbuminů a  $\beta$ -laktoglobulinů (Kumar et al. 2012). Obě skupiny mléčných proteinů jsou nutričně ceněnými komponenty mléka vyznačující se vysokou stravitelností a obsahem esenciálních aminokyselin. Zatímco syrovátka je obzvláště bohatá na aminokyseliny s rozvětveným řetězcem jako leucin, isoleucin, valin či lysin, kasein má vyšší podíl histidinu, methioninu a fenylalaninu (Pereira 2014). Za zmínku stojí také z nutričního hlediska výskyt aminokyselin methioninu a cysteinu. Kozí a ovčí mléko zcela pokrývá nutriční požadavky člověka, u kravského mléka jsou tyto dvě AK limitujícími (Barlowska et al. 2011). Zastoupení kaseinů a syrovátkových bílkovin je do jisté míry ovlivňováno genetickým polymorfismem hospodářských zvířat, jenž podmiňuje složení proteinové frakce a tím mimo jiné i technologické parametry mléka (Borková & Snášelová 2005).

**Tabulka 3:** Biologická aktivita mléčných proteinů.

<b>Bílkovina</b>	<b>Funkce</b>
Kaseiny ( $\alpha$ , $\beta$ a $\kappa$ )	iontový transport (Ca, $\text{PO}_4$ , Fe, Zn, Cu), prekurzor bioaktivních peptidů
$\beta$ -laktoglobulin	transport retinolu, vazba MK, možný antioxidant
$\alpha$ -laktalbumin	syntéza laktózy v mléčné žláze, transport Ca, imunomodulace, antikancerogenní
Imunoglobuliny A, M a G	imunoprotektivní
Glykomakropeptid	antivirový, bifidogenní
Laktoferin	antimikrobiální, antioxidační, imunomodulační, absorpce železa, antikancerogenní
Laktoperoxidáza	antimikrobiální
Lysozym	antimikrobiální, synergický efekt s imunoglobuliny a laktoferinem

Zdroj: Korhonen et al. (1998); upraveno autorem.

#### 3.1.2.3.1 Kaseiny

Kaseiny u přežvýkavců tvoří přibližně 80% podíl mléčné bílkoviny a v mléčném séru se primárně vyskytuje ve formě kaseinových micel (Martin et al. 2003). Jedná se o fosfoproteiny, jejichž fosfátové skupiny vážou relativně vysoké množství vápníku. Proto jsou kaseiny ceněny jako významné nosiče minerálních prvků, zejména fosforu a vápníku, usnadňující i jejich stravitelnost. Kaseinové micely kozího a ovčího mléka jsou v porovnání s kravským více mineralizované. Micely kozího mléka dosahují oproti zbylým dvěma druhům větších rozměrů (Raynal-Ljutovac et al. 2008; Pereira 2014). Zastoupení kaseinových bílkovin v jednotlivých druzích mléka je demonstrováno v Tabulce 4.

Hlavním zástupcem kaseinové frakce v kozím mléce je  $\beta$ -kasein, zatímco v kravském a ovčím dominuje  $\alpha_{s1}$ -kasein (Park 2017). Obsah a zastoupení kaseinové frakce jsou u přežvýkavců také ovlivněny genetickým polymorfismem. Podle výskytu konkrétních alel například v genomu koz sledujeme u jejich mléka úplnou absenci, snížený (0,45 g/l) či naopak vysoký (3,5 g/l) obsah  $\alpha_{s1}$ -kaseinu. Podobně je tomu tak i u  $\alpha_{s2}$ -kaseinu (Park et al. 2007; Ballabio et al. 2011). Jeden genotyp s nízkou syntézou  $\alpha_{s1}$ -kaseinu se vyskytuje i u ovcí (Albenzio et al. 2016). Absence či nízký obsah  $\alpha_{s1}$ -kaseinu ovlivňuje technologické vlastnosti mléka a snižuje výtěžnost při výrobě sýrů (Yadav et al. 2016), avšak skýtá i neopomenutelnou výhodu. Díky nízkým hladinám  $\alpha_{s1}$ -kaseinu se kozí mléko více podobá profilu zastoupených kaseinů mateřského mléka a jeho nutriční význam zvyšuje také fakt, že  $\alpha_{s1}$ -kasein je jeden z alergenů vyskytujících se v mléce. Kozí mléko se v tomto ohledu zdá být vhodnou alternativou kravského mléka pro alergiky, včetně kojenců (Ballabio et al. 2011). Nižší

koncentrace  $\alpha_{s1}$ -kaseinu snižuje také citlivost na další alergenní mléčný protein, kterým je  $\beta$ -laktoglobulin (Lara-Villoslada et al. 2005).

**Tabulka 4:** Zastoupení kaseinové frakce v kravském, kozím a ovčím mléce.

	<b>Kravské mléko</b>	<b>Kozí mléko</b>	<b>Ovčí mléko</b>
Celkový obsah bílkovin (g/l)	27,8 ± 2,2	33,4 ± 1,6	59,4 ± 3,3
Podíl kaseinové frakce (%)	83 ± 10	99 ± 12	93 ± 10
$\alpha_{s1}$ -kasein (%)	37 ± 7	10 ± 6	33 ± 8
$\alpha_{s2}$ -kasein (%)	7 ± 1	-	14 ± 2
$\beta$ -kasein (%)	42 ± 8	63 ± 11	30 ± 5
$\gamma$ -kasein (%)	6 ± 2	18 ± 4	9 ± 1
$\kappa$ -kasein (%)	9 ± 4	8 ± 2	14 ± 2

Zdroj: Bramanti et al. (2003).

### 3.1.2.3.2 Syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové bílkoviny jsou skupinou definující globulární proteinovou frakci rozpustou při pH 4,6 a 20°C. Tvoří 17-22 % celkového množství bílkovin v mléce. Zastoupení komponent syrovátkové frakce je přibliženo v Tabulce 5. Obecně jsou z hlediska profilu aminokyselin syrovátkové bílkoviny považovány za nutričně výhodnější než kaseiny. Jsou v trávicím traktu rychleji vstřebatelné a hojněji zastoupené AK s rozvětveným řetězcem podporují růst svalové hmoty. Oproti kaseinu jsou však méně tepelně stabilní. Majoritní zástupce představují  $\beta$ -laktoglobulin a  $\alpha$ -laktalbumin. Ve všech třech druzích mléka představuje  $\beta$ -laktoglobulin dominantní protein syrovátkové frakce, následovaný  $\alpha$ -laktalbuminem. V kravském mléce jsou přítomny zpravidla v poměru 3:1. Výjimku představuje v tomto případě ovčí mléko, u něž se druhého místa v hojnosti výskytu ujímají imunoglobuliny. Minoritními složkami syrovátkové frakce jsou sérový albumin, proteoso-peptony či laktoferin (Ha & Zemel 2003; Borková & Snášelová 2005; Park et al. 2007). Jak je již v Tabulce 3 uvedeno, vykazují tyto zástupci terapeutický potenciál. V případě laktoferinu,  $\beta$ -laktoglobulinu,  $\alpha$ -laktalbuminu a sérového albuminu se jedná například o schopnost potlačování vývoje nádorů. Za zmínku stojí i například BAMLET – tzv. bovinní  $\alpha$ -laktalbumin letální pro tumorové buňky – komplex  $\alpha$ -laktalbuminu a olejové kyseliny, jež dokáže působit cytotoxicky u řady nádorových buněčných linií (Mills et al. 2011). Laktoferin, laktoperoxidáza a lysozym jsou důležitými antimikrobiálními činidly.  $\beta$ -laktoglobulin je také nosičem retinolu a antioxidantem. Laktoferin, nejhojněji přítomný v kozím mléce, se klíčově podílí na absorpci železa a má antioxidační účinky. Imunoglobuliny se jako imunomodulační látky podílejí na rozvoji obranyschopnosti organismu mláďat a jejich nejvyšší koncentrace můžeme sledovat v kolostru. Množství imunoglobulinů zde dosahuje až stonásobné hodnoty oproti mléku (Pereira 2014).



**Tabulka 5:** Zastoupení syrovátkových bílkovin.

	Kravné mléko	Kozí mléko	Ovčí mléko
Obsah syrovátkových bílkovin (g/l)	6,46	6,14	10,76
$\beta$ - laktoglobulin (%)	59,3	54,2	61,1
$\alpha$ - laktalbumin (%)	16,2	21,4	10,8
Imunoglobuliny (%)	15	11,5	20
Sérový albumin/laktoferin (%)	9,5	12,8	8,1

Zdroj: Law (1995).

### 3.1.2.3.3 *Biologicky aktivní peptidy*

V oblasti lidské výživy mají mléčné bílkoviny mnohem větší význam, než by se mohlo zdát. Během trávicích procesů v gastrointestinální soustavě totiž mohou z proteinů vznikat další fragmenty vykazující biologickou činnost a jsou předmětem intenzivního zkoumání jejich účinků na lidský organismus. Hydrolýzou kaseinové i syrovátkové frakce se vytváří peptidové látky poskytující širokou škálu zdravotních benefitů pro kardiovaskulární, nervový, imunitní či trávicí systém člověka. Biologicky aktivní peptidy mléka mohou působit antihypertenzivně, antimikrobiálně, antioxidačně, opioidně, cytomodulačně imunomodulačně či například hypocholesterolemicky a antikancerogenně. Některé peptidy, jako jsou například  $\beta$ -kasomorfíny, fungují podobně jako analgetika a trankvilizéry, které působí na centrální nervový systém. Jiné peptidy interferující v gastrointestinální soustavě podporují sekreci mucinu a podílí se tak na ochraně trávicího traktu před adhezí patogenů a na motilitě střeva (Korhonen & Pihlanto 2003; Pereira 2014). Primární struktury kozích, ovčích i kravných bioaktivních peptidů se příliš neliší. Jedním ze zástupců kozího mléka je například opioidní peptid  $\alpha$ -laktorfin, vznikající pepsinovou hydrolýzou  $\alpha$ -laktalbuminu (Raynal-Ljutovac et al. 2008).

Také při výrobě sýrů najdeme v syrovátkové frakci rozpustné kaseinomakropeptidy (CMP). Tyto deriváty vznikají hydrolýzou  $\kappa$ -kaseinu pomocí syřidla (chymosin). V závislosti na struktuře CMP vykazují účinky antitrombotické, antimikrobiální, imunomodulační či prebiotické, a pravděpodobně také stimulační pro sekreci cholecystokininu - hormonu podílejícího se na řízení příjmu potravy a trávení v duodenu (Manso & López-Fandiño 2004).

### 3.1.2.4 **Nebílkovinné dusíkaté látky**

Mezi dusíkaté látky nebílkovinné povahy (NPN) vyskytující se v kravném mléce patří například amoniak, močovina, močová kyselina, kreatinin či kreatin. Obsah těchto látek se liší zejména dle stravy zvířete a podílu bílkovin v ní. Vyšším podílem NPN se vyznačuje kozí mléko. Asi 19-20 % NPN tvoří aminokyseliny (AMK) (zejm. GLU, GLY, ALA, ASP) (Hadjipanayiotou 1995; Park et al. 2007).

Nutričně důležitými deriváty volných AMK v mléce jsou také taurin a karnitin. Dle studií je taurin obsažen v kravném mléce v průměrném množství 1  $\mu$ mol/100 ml, v ovčím

14  $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$  (Rassin et al. 1978) a v kozím 56  $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ , což je hladina přibližující se hodnotě lidského mléka (Tripaldi et al. 1998). Nutno však dodat, že hladina taurinu se výrazně mění dle stádia laktace a rozdíly jsou i mezi jednotlivými plemeny. Taurin se jako podmíněně esenciální AMK podílí na tvorbě žlučových solí a růstu a rozvoji nervové soustavy kojenců. Karnitin, významněji zastoupený v kravském mléce, hraje důležitou roli při usnadňování transportu MK do mitochondriální matrice k oxidaci, při iniciaci ketogeneze a při udržování termogeneze (Park et al. 2007).

Kozí mléko obsahuje v porovnání s ovčím a kravským větší množství nukleosidů (154  $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$  pro kozí, 93  $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$  pro ovčí a 68  $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$  pro kravské), jež slouží jako prekurzory pro tvorbu glykoproteinů, glykolipidů a oligosacharidů (Park et al. 2007), a také nukleotidů a ribonukleotidů. Kromě UMP, AMP a CMP běžných pro všechny přežvýkavce se navíc u koz a ovcí nachází UDP. Kozí (10,2  $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ ) a zejména ovčí (3,3  $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ ) mléko se odlišuje nízkou hladinou orotové kyseliny v porovnání s kravským (26,8  $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ ) (Raynal-Ljutovac et al. 2008). Orotová kyselina má rozsáhlý význam v metabolismu organismu a je také jedním z enzymů podílejících se na syntéze dusíkaté báze pyrimidinu. Význam v lidské výživě zahrnuje i její potenciál ke zmírnění hyperurikosurie u dny, podporu stavby svalové hmoty či vývoje zdravé střevní mikrobioty u novorozenců (Löffler et al. 2015).

### 3.1.2.5 Vitaminy

Mléko je cenným zdrojem široké škály vitaminů, a to zejména vitaminů skupiny B a lipofilních vitaminů. Koncentrace liposolubilních vitaminů pozitivně koreluje s obsahem tuku v mléce. Mezi jednotlivými druhy mlék můžeme sledovat určité rozdíly. Téměř bez výjimek má z těchto tří obecně nejvyšší obsah vitaminů mléko ovčí. Kozí a ovčí mléko disponuje významnějším množstvím retinolu (vitamin A), kravské naopak vyšší koncentrací folové kyseliny. Charakteristickým rysem odlišujícím kozí mléko od ovčího a kravského je jeho křídově bílá barva, kterou zapříčiňuje absolutní absence  $\beta$ -karotenu - prekurzoru retinolu. Nevýhodou kozího mléka vůči ostatním dvěma druhům je velmi nízká koncentrace folátu a vitamínu B<sub>12</sub>. Deficience těchto významných vitaminů může v případě využívání kozího mléka jako náhrady mléka mateřského zapříčinit incidenci megaloblastické anémie u kojenců (Balthazar et al. 2017; Park 2017). Obsah vitaminů v jednotlivých druzích mlék je zpřehledněn v Tabulce 6.

Pravděpodobně nejdiskutovanějším vitaminem v současné době je kalciferol, jehož význam pro lidský organismus tkví v jeho nenahraditelnosti v četných metabolických procesech, včetně regulace zrání a proliferace buněk, tvorbu kostní hmoty nebo naopak uvolňování vápníku a fosforu do krevního řečiště, ve střevech podporuje vstřebávání vápníku a fosforu. Vitamin D působí také na imunitní a kardiovaskulární systém a na svalovou, pankreatickou a metabolickou homeostázu. Primárním zdrojem vitamínu D je sluneční záření, přičemž působením UV záření dochází k aktivaci previtaminu v kůži a dále vznikne jeho izomerací metabolicky aktivní forma - cholekalciferol. V případě, že příjem kalciferolu nemůžeme uspokojivě zajistit pobytem na slunci, přichází na řadu elementární příjem stravou

či suplementace. Mléko, společně s tučnými rybami a vejci, představuje stěžejní zdroje tohoto vitamínu (Anderson et al. 2013; Brincat et al. 2015; Pludowski et al. 2018).

**Tabulka 6:** Zastoupení vitaminů v kozím, ovčím a kravském mléce (množství na 100 g mléka).

Vitamin	Kravské mléko	Kozí mléko	Ovčí mléko
Retinol (vitamin A) (μg)	37	54,32	64
Kalciferol (vitamin D) (μg)	0,2	0,15	0,2
Tokoferol (vitamin E) (mg)	0,08	0,04	0,11
Thiamin (B <sub>1</sub> ) (mg)	0,045	0,068	0,08
Riboflavin (B <sub>2</sub> ) (mg)	0,16	0,21	0,376
Niacin (B <sub>3</sub> ) (mg)	0,08	0,27	0,416
Pantothénová kyselina (B <sub>5</sub> ) (mg)	0,32	0,31	0,408
Pyridoxin (B <sub>6</sub> ) (mg)	0,042	0,046	0,08
Folová kyselina (B <sub>9</sub> ) (μg)	8,5	1	6
Biotin (B <sub>8</sub> ) (μg)	2	1,5	0,93
Kobalamin (B <sub>12</sub> ) (μg)	0,357	0,065	0,712
Askorbová kys. (vitamin C) (mg)	0,94	1,29	4,16

Zdroj: Anderson et al. (2013), Brincat et al. (2015) a Pludowski et al. (2018); upraveno autorem.

### 3.1.2.6 Minerální prvky

Znalost zastoupení a distribuce minerálních látek v mléce umožňuje považovat mléko jako bohatý zdroj esenciálních prvků a zároveň napomáhá porozumět fyzikálně-chemickým vlastnostem mléka, které jsou zásadní po technologické stránce výroby mléčných produktů. Obsah minerální frakce v mléce se pohybuje kolem 7-9 g/l (viz Tabulka 1) a mírná fluktuace hodnot závisí zejména na stádiu laktace, plemeni, krmivu aj. (Gaucheron 2005; Park et al. 2007). Z nutričního hlediska je mléko známo jako zdroj řady minerálních prvků, zejména vápníku, fosforu, zinku, draslíku, selenu a do určité míry i hořčíku. Zinek se převážně váže na micelární fázi proteinové frakce. Vápník, fosfor a hořčík jsou distribuovány mezi micelární a vodnou fází, přičemž hlavním faktorem ovlivňujícím poměr distribuce prvků hraje pH disperzního prostředí (Pereira 2014). Mléko je považováno za jeden z nejvýznamnějších zdrojů vápníku, prvku stěžejního pro stavbu a funkci kostní a svalové hmoty. Průměrná koncentrace vápníku je 1200 mg na litr mléka. Vápník je distribuován mezi micelární a vodnou fází. V micelární fázi je spojován s fosforylovými skupinami kaseinů, zatímco ve vodné fázi se vápník může vázat na syrovátkové proteiny nebo anorganické formy fosfátotvorných solí (Pereira 2014). Vyznačuje se vysokou biologickou dostupností, která souvisí s částečnou vazbou vápníku na kasein a také je vápník přítomen v optimálním poměru pro absorpci s fosforem (Ca: P 1,0: 1,5) (López-Aliaga et al. 2010; Gupta & Gupta 2014). Selen, důležitý konstituent antioxidantních enzymů, jako je například glutathionperoxidáza, je v mléce přítomen v průměrné koncentraci 30 μg/l, což představuje přibližně 67 % jeho denního referenčního

příjmu (Gupta & Gupta 2014; Pereira 2014). Průměrný obsah minerálů v mléce ve srovnání s referenčním příjmem potravy je uveden v Tabulce 7. Porovnání zastoupení jednotlivých makro- a mikroprvků v kozím, ovčím a kravském mléce je shrnuto v Tabulce 8. Kromě sodíku a draslíku v obsahu minerálních látek vede ovčí mléko, hojněji než v kozím a kravském mléce se zde vyskytuje vápník, fosfor, zinek, hořčík, jód a měď (Balthazar et al. 2017; Park 2017).

**Tabulka 7:** Průměrný obsah minerálů v mléce ve srovnání s referenčním příjmem potravy.

Minerální prvek	mg/100g	% referenční hodnoty příjmu v hrnku mléka (244 g)
Ca	119-124	37-40
P	93-101	16-32
Mg	10-14	8-10
K	151-166	8-9
Zn	0,4-0,6	9-14

Zdroj: Pereira (2014); upraveno autorem.

**Tabulka 8:** Průměrné zastoupení minerálních látek v kozím, ovčím a kravském mléce (množství na 100 g mléka).

Prvek	Kravské mléko	Kozí mléko	Ovčí mléko
Ca (mg)	112	130	197,5
Fe (mg)	0,1	0,06	0,1
Mg (mg)	11	14,5	19,5
P (mg)	91	109	141
K (mg)	145	185,5	138
Na (mg)	42	39,5	39
I (µg)	70	80	104
Zn (mg)	0,4	0,43	0,6
Cu (mg)	stopově	0,04	0,1
Se (µg)	1,8	1,665	1,7
Mn (µg)	6	8	7,15

Zdroj: Park et al. (2007) a Balthazar et al. (2017); upraveno autorem.

## **3.2 Falšování mléka a mléčných výrobků**

### **3.2.1 Definice falšování potravin**

Falšování potravin má v historii lidstva pravděpodobně stejnou tradici jako samotná výroba potravin. Povědomí o této problematice ve společnosti postupně roste a stejně tak i schopnost odhalení falšovacích taktik díky stále se rozvíjejícím vědeckým poznatkům a technologickému pokroku. Základní charakteristikou potravinových podvodů je úmyslné nedodržování potravinových zákonů a klamání spotřebitele za účelem finančního zisku. V současné době je falšování potravin ve větší míře záležitostí zejména rozvojových zemí, kde nejsou kladeny takové nároky na monitorování. Problematika falšování potravin je záležitostí etických a ekonomických aspektů, přináší s sebou ale i řadu zdravotních a technologických rizik (Azad & Ahmed 2016; Hong et al. 2017).

Mezi praktikované způsoby falšování spadá například nastavování potravin levnější složkou, přítomnost nedeklarovaných složek, nastavování potravin ke zlepšení jejich vlastností, klamavé uvádění geografického původu nebo způsobu produkce. Kromě snižování kvality potravin a uvádění spotřebitele v omyl může být falšování spjato i s rizikem ohrožení zdraví spotřebitele a znevýhodněním ostatních výrobců nekalou hospodářskou soutěží (Státní zemědělská a potravinářská inspekce 2015).

Důležitým prostředkem k zajištění bezpečnosti a kvality potravin, ochrany spotřebitelů i dodržování vnitrostátních a mezinárodních předpisů či norem je autentizace potravin (Hong et al. 2017). V minulosti a s pokračujícím současným trendem narůstá snaha vyvíjet různé účinné metody spočívající v morfologické nebo anatomické charakterizaci, organoleptických markerech a chemické analýze. Mezi současné tři základní strategie detekce falšování patří prokázání přítomnosti cizí látky nebo markeru v komoditě, prokázání, že se konkrétní složka odchyluje od své normální hladiny nebo zjištění velmi nepravděpodobného profilu zastoupených komponent (Bansal et al. 2017).

#### **3.2.1.1 Legislativní ošetření falšování potravin**

V české legislativě pojem falšování potravin není přímo definován, avšak dle ustanovení zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů je „zakázáno uvádět do oběhu potravin klamavě označené nebo nabízené ke spotřebě klamavým způsobem“ (Zákon č. 110/1997 Sb., § 10 odst. 1 písm. a)). Falšování potravinářských výrobků lze defacto považovat právě za klamavé označování či klamavou reklamu, tedy za nekalou soutěž, kterou definuje zákon č. 89/2012 Sb., občanský zákoník (Zákon č. 89/2012 Sb., § 2976).

Stejně tak se zaměřuje na ochranu spotřebitele před potravinovými falzifikáty i evropská legislativa skrze nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin. Podstatou potravinového práva je

chránit zájmy spotřebitelů a poskytovat jim základ umožňující vybírat se znalostí věci potraviny, které konzumují. Jeho cílem je rovněž zabránit podvodným nebo klamavým praktikám, falšování potravin a jiným praktikám, které mohou spotřebitele uvést v omyl (Potraviny Info 2019).

### 3.2.2 Způsoby falšování mléka

Falšování mléka znamená úmyslné snižování jeho kvality buď příměsí, náhradou podřadnými látkami nebo odstraněním některé cenné složky (Poonia et al. 2017). Podle Čížkové et al. (2012) je mléko a výrobky z něj druhou nejčastěji falšovanou komoditou, hned po olejích a tucích. Možnými příčinami praktikování adulterace mléka může být například převyšující poptávka nad nabídkou na trhu, nízká nákupní kapabilita zákazníků a také skutečnost, že mléko je rychle se kazící potravina. Řešení této problematiky neusnadňuje ani nedostatek vhodných detekčních metod (Azad & Ahmed 2016). Mléko je poměrně drahá surovina a z ekonomického hlediska se jeví jako komodita atraktivní k falšování přídavkem mléčných či nemléčných substancí. Obvyklými případy falšování je také nahrazení drahého a vysoce kvalitního mléka levnějším mlékem jiného druhu, nedodržení deklarovaného ošetření mléka a také podvodné označování geografického původu mléka a produktů z něj (Hong et al. 2017). Běžné parametry využívané ke kontrole a hodnocení kvality mléka jsou procentuální obsah tuku, tukuprostá sušina a bod mrznutí. K dodržování požadovaných hodnot těchto parametrů se využívá řada nepovolených aditiv (Azad & Ahmed 2016).

Jedním z nejčastěji praktikovaných způsobů adulterace mléka je přídavek dusíkatých sloučenin za účelem navýšení zdánlivého obsahu bílkovin. Vhodnými aditivy se pro výrobce jeví například močovina, syrovátka nebo melamin. Výhodou těchto aditiv je pro výrobce vysoký obsah dusíku a nízká cena. Syrovátka získávaná jako vedlejší produkt při výrobě sýrů navíc zvyšuje objem falšovaného mléka (Nascimento et al. 2017). Také nastavování mléka rostlinným proteinem bývá součástí běžné praxe, konkrétně ředění sójovým mlékem, jehož produkce je o 70 % méně nákladná než produkce mléka, nebo hrachovým či hydrolyzovaným pšeničným proteinem (Azad & Ahmed 2016).

Také falšování obsahu tukové frakce je v praxi běžnou záležitostí. Mléčný tuk je jako ekonomicky cenná složka mléka často z mléka odstraňován, dodatečně zpeněžován a kompenzován přídavkem rostlinných olejů (například slunečnicový, kokosový či palmový), ale také i hovězího loje či vepřového sádla. Následně se také mohou přidávat detergenty, které plní ve falšovaném mléce emulgační a pěnotvorné funkce (Azad & Ahmed 2016; Nascimento et al. 2017).

Jak již bylo řečeno, mléko patří ze své podstaty mezi rychle se kazící komodity, a proto přímo vybízí k přídavku konzervačních aditiv, která jeho trvanlivost prodlouží. Jedná se nejčastěji o peroxid vodíku, formaldehyd, salicylovou a benzoovou kyselinu či dichroman draselný (Nascimento et al. 2017).

Snad nejsnazším možným způsobem zvýšení objemu mléka s cílem ekonomického zisku je ředění vodou. Přídavek vody se často maskuje síranem amonným, který udržuje hodnoty

původní hustoty mléka. Ke zvyšování parametru tukuprosté sušiny je zneužíván například třtinový cukr, škrob či sírany (Azad & Ahmed 2016).

### **3.2.2.1 Zdravotní rizika falšování mléka**

Problematika falšování mléka (a potravin obecně) je většinou spojována spíše s porušováním mravních principů, nikoli s akutním rizikem ohrožení zdraví. Do mléka však mohou být výrobci přidávány také i látky velmi závažně ohrožující lidské zdraví. Jedním ze známých případů zdraví nebezpečnému falšování mléka je přídavek melaminu, způsobujícího nefrolitiázu. První případ přídavku melaminu byl zaznamenán v Číně v roce 2008, kde jako součást náhradní kojenecké výživy způsobil renální komplikace desítkám tisíců dětí a je zodpovědný i za několik úmrtí kojenců (Chan et al. 2008).

Mezi další nežádoucí aditiva, která mají nepříznivé účinky na zdraví, patří již zmíněné látky jako například močovina, formaldehyd, detergenty, síran amonný, hydroxid sodný, kyselina boritá, benzoová a salicylová kyselina, peroxid vodíku aj. Peroxidy i detergenty v mléce mohou vést od gastrointestinálních obtíží až ke gastritidě a zánětu střev (Azad & Ahmed 2016). Přídavek škrobu může v případě jeho nahromadění ve střevě rovněž zapříčinit průjemy a s fatálními komplikacemi se mohou potýkat zejména diabetici (Singuluri 2014). Močovina se v mléce přirozeně vyskytuje, avšak ve velmi nízké koncentraci a její nejvyšší povolená hodnota v mléce činí 70 mg/100 ml. Ve větším množství močovina zatěžuje ledviny (Kandpal et al. 2012). Formaldehyd a dichroman jsou prokázány jako látky s toxickým účinkem a jako karcinogeny (Nascimento et al. 2017). Nejen z těchto zdravotních důvodů je proto přítomnost zmíněných látek v mléce jednoznačně nežádoucí.

Závažné akutní zdravotní riziko představuje pro alergiky konzumace mléka nastaveného podstatně levnějším sójovým nebo pšeničným proteinem (Azad & Ahmed 2016). Nedeklarované nastavení kozího mléka kravským ohrožuje přítomností  $\alpha_{S1}$ -kaseinu (jakožto skrytého alergenu) jedince, jež trpí alergií na tuto bílkovinu a kteří užívají kozí mléko právě jako alternativu mléka s přirozenou absencí  $\alpha_{S1}$ -kaseinu (Osman et al. 2013).

### **3.2.3 Falšování kozího a ovčího mléka kravským mlékem**

Kozí a ovčí mléko se díky nutričním benefitům a unikátním sensorickým vlastnostem v posledních letech těší vzrůstající oblibě. Ve velkém měřítku je však průmyslová výroba v tomto odvětví omezena nízkou dojivostí a sezónní cyklicitou. Zatímco u některých mléčných plemen skotu jsou dojnice schopny individuálně vyprodukovat množství mléka v řádu několika tisíců litrů za jedno laktáční období (Laben et al. 1982), dojivost koz dosahuje přibližně 500-900 kg, u ovcí 50-80 kg, některá dojná plemena však produkují až 200-550 kg mléka za laktaci (Thomas et al. 2001). Tato skutečnost zvyšuje pravděpodobnost falšování kozího a ovčího mléka výrobci a jedním z možných způsobů je, jak již bylo výše zmíněno, přídavek levnějšího mléka. Vhodným adeptem pro nastavení je právě mléko kravské. Ačkoli přídavek

mléka jiného živočišného druhu za účelem zvětšení objemu suroviny (a většího finančního zisku) představuje jeden z nejsnazších způsobů falšování, jeho detekce a kvantifikace je komplikovaná kvůli genetickému i negenetickému polymorfismu (Azad & Ahmed 2016).

### 3.2.3.1 Metody využívané pro detekci falšování

Kvalitativní testy mléka a mléčných produktů jsou důležité nejen pro zajištění ochrany spotřebitele, ale také z hlediska kontroly technologických vlastností mléka v mlékárenském průmyslu (Azad & Ahmed 2016). Pro identifikaci druhu původu pro mléko a mléčné výrobky je k dispozici mnoho různých analytických metod, které zahrnují elektroforetické, chromatografické, spektroskopické či imunochemické techniky a PCR metodu (Hong et al. 2017). Každá z metod má v mnoha ohledech nepopřítelné výhody, některé techniky jsou však pracnější a časově náročné či nákladné, srovnáme-li je například s imunologickými metodami a metodami založenými na analýze DNA (Song et al. 2011).

#### 3.2.3.1.1 Elektroforetické metody

Elektroforetické metody jsou hojně využívány pro výzkum mléčných bílkovin a také genetických variant hlavních proteinových komponentů. V oblasti odhalování adulterace mléka se setkáváme se třemi zásadními typy elektromigračních technik – metoda PAGE (gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu), isoelektrická fokusace (IEF) a kapilární elektroforéza (CE) (Poonia et al. 2017).

PAGE metoda využívá separace molekul dle jejich náboje a velikosti v elektrickém poli a je založena na principu rozdílné mobility jednotlivých molekul proteinů (Borková & Snášelová 2005). Aplikovatelnost této metody je prokázána četnými studiemi, jednou z nich je například studie publikovaná Pesic et al. (2011), v níž kvantifikovali 3% přídavek kozího mléka kravským a 5% naředění ovčího mléka kravským za využití separace  $\alpha$ - a  $\beta$ -laktoglobulinů.

Isoelektrická fokusace separuje molekuly mléčných kaseinů na základě odlišnosti jejich isoelektrických bodů a je zejména vhodná pro analýzu jejich genetických variant (Poonia et al. 2017). IEF je v Evropské Unii stanovena jako referenční metoda pro detekci přítomnosti kravského mléka a kaseinátu v ovčích, kozích a buvolích sýrech (Borková & Snášelová 2005). Vhodnost IEF metody demonstroval například Špoljarić et al. (2013) s využitím odlišnosti bovinního  $\gamma$ -kaseinu, získaného hydrolýzou  $\beta$ -kaseinu přítomného v mléce.

Kapilární elektroforéza je modifikace metody prováděná pomocí kapiláry bez přítomnosti nosiče a umožňující rychlou separaci kaseinových a syrovátkových proteinů. Poskytuje vysoké rozlišení a snadnou kvantifikaci s detekčním limitem 1-2 % přidaného kravského mléka bez potřeby velkých objemů vzorků a pufrů (Borková & Snášelová 2005; Poonia et al. 2017).



### 3.2.3.1.2 *Chromatografické metody*

Mezi nejčastěji využívané separační metody patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC; High Performance Liquid Chromatography). Principem metody je separace analytů na základě jejich distribuce mezi mobilní a stacionární fází. Při separaci dochází k interakcím analytu s mobilní nebo se stacionární fází a interakcím mobilní fáze se stacionární. Ke zvýšení účinnosti separace je chromatografická kolona tvořena mikročásticovým sorbentem kladoucím odpor prostupující kapalně mobilní fázi, proto je v této analytické metodě aplikován vysoký tlak (Kazakevich & Lobrutto 2007). V oblasti odhalování falšování mléka se setkáváme s metodami HPLC s reverzní fází (RP HPLC), ionexovou HPLC (IE HPLC) a hydrofobní interakční chromatografií (HIC). Chromatografické metody nacházejí rozsáhlé uplatnění zejména při izolaci syrovátkové a kaseinové frakce mléčných bílkovin (Borková & Snášelová 2005). Detekci a kvantifikaci směsí kozího a ovčího mléka s kravským (v poměrech 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 75 a 95 %) se pomocí RP-HPLC věnovala například studie Ferreira & Caçote (2003). Výsledkem bylo získání tří různých chromatogramů syrovátkových bílkovin a každý typ mléka vykazoval odlišné retenční časy přítomných  $\beta$ -laktoglobulinů. Detekční limit pro identifikaci přídavku jiného druhu mléka činil 2 % a kvantifikovatelnost přidaného kravského mléka 5 %. Veloso et al. (2002) rovněž pomocí RP-HPLC prokázali možnost detekce 5% zředění kozího mléka kravským na základě přítomnosti  $\alpha$ -kaseinu. Obě zmíněné studie využily RP-HPLC ve spojení s UV spektroskopickou metodu.

Za zmínku také stojí jeden z prvních pokusů využití plynové chromatografie (GC) pro účely autentizace mléka, jež se od kapalinové liší nástřikem derivatizovaného vzorku do nosného plynu, který je dále unášen chromatografickou kolonou. Scano et al. (2014) ve směsích kozího a kravského mléka zaznamenal statisticky významnou specifitu složení těchto dvou mlék, kde byly nalezeny talóza a jablečná kyselina jako specifické markery pro kravské mléko a GC v kombinaci s hmotnostní spektrometrií tak vyhodnotili jako metodu s potenciálem využití pro tuto problematiku.

### 3.2.3.1.3 *Imunochemické metody*

Podstata imunochemických metod spočívá v reakci antigenu (transgenního proteinu) s protilátkou. Jedná se o velmi citlivý druh analýzy uplatňovaný k detekci a kvantifikaci specifických frakcí proteinů kozího, ovčího a kravského mléka. Analýza využívá specifických protilátek, které reagují se syrovátkovými proteiny, jednotlivými kaseinovými frakcemi a peptidovými fragmenty kaseinů mléka ( $\beta$ -laktoglobuliny, imunoglobuliny,  $\kappa$ -kaseiny či  $\beta$ -kaseiny). Protilátky jsou vysoce specifické. Po proběhnutí reakce protilátky s antigenem je tento substrát enzymaticky katalyzován za vzniku barevného produktu, jenž se následně stanovuje spektrofotometricky. Mezi využívané imunochemické metody řadíme metodu ELISA (angl. zkratka Enzyme Linked Immunosorbent Assay), kterou lze aplikovat ve dvou variantách – nepřímá (kompetitivní) ELISA a SANDWICH (nekompetitivní) ELISA (Crowther 2000; Borková & Snášelová 2005). Například Song et al. (2011) prokázal vhodnost nepřímé ELISA metody pro detekci ředění kozího mléka kravským pomocí anti- $\beta$ -kaseinu – protilátky reagující

s bovinním  $\beta$ -kaseinem. Testovací řady byly připraveny ředěním kozího mléka kravským, přičemž detekce bylo dosaženo již při nejnižší aplikované 2% koncentraci. Hurley et al. (2004) ve své studii pomocí nepřímé kompetitivní ELISA metody detekoval přítomnost 0,1 % kravského mléka ve vzorcích za použití protilátky bovinního imunoglobulinu G (IgG). Nutno však podotknout, že tato a další analýzy založené na detekci syrovátkových bílkovin nejsou aplikovatelné pro vysoce tepelně ošetřená mléka, neboť při záhřevu dochází k jejich denaturaci. Proto se pro tepelně ošetřené mléko a výrobky využívají převážně metody analýzy kaseinů (Zachar et al. 2011).

#### 3.2.3.1.4 *Metody založené na detekci DNA - PCR*

Polymerázová řetězová reakce (PCR, angl. zkratka Polymerase Chain Reaction) spadá mezi metody analýzy deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a za účelem autentizace potravin je hojně využívána. Princip spočívá v replikaci DNA a amplifikaci úseků DNA umístěných mezi dvěma oblastmi známé sekvence (Borková & Snášelová 2005; Čížková et al. 2012). Výhodou této metody je vysoká specifita a citlivost, jež umožňuje detekovat i nepatrné množství přidaného kravského mléka. PCR je také aplikovatelná pro vysoce tepelně upravené mléko a zrající sýry, neboť molekuly DNA jsou relativně stabilní a odolné vůči vysokým teplotám (Borková & Snášelová 2005; Zachar et al. 2011). Možnostem uplatňování PCR v oblasti falšování kozího a ovčího mléka kravským se v jedné ze svých prací věnují López-Calleja et al. (2004), v níž sekvencí mitochondriálního genu docílili výsledku detekce přítomnosti 0,1% množství kravského mléka v syrovém, pasterizovaném a sterilovaném kozím a ovčím mléce. Odhalení přítomnosti kravského mléka spočívalo v identifikaci fragmentů DNA skotu, jež u koz a ovcí nejsou přítomny.

#### 3.2.3.1.5 *Spektroskopické metody*

Jako užitečné nástroje v oblasti odhalování falšování mléčných produktů se jeví spektroskopické metody, využívající k analýze různá spektra elektromagnetického záření. Hovoříme zde zejména o fluorescenční spektroskopii, blízké infračervené spektroskopii (NIR), střední infračervené spektroskopii (MIR) a Ramanově spektroskopii, vhodných pro použití v kombinaci s chemometrickými metodami umožňujícími identifikaci látek. Výhody spektroskopických technik spočívají v rychlosti, ekonomičnosti, nedestruktivnosti a schopnosti detekovat kontaminanty v potravinách s dobrou přesností (Kamal & Karoui 2015; Poonia et al. 2017). Jsou v praxi využívány pro ověřování autentičnosti, např. geografického původu mléka (Ntakatsane et al. 2011), krmného systému a genotypu dojených zvířat (Hammami et al. 2013), nebo k detekci přítomnosti melaminu, přídavku syrovátky, močoviny či peroxidu vodíku (Santos et al. 2013).

Do skupiny spektroskopických metod však řadíme ještě další techniky, jež mohou být považovány za významné, hovoříme-li konkrétně o možnostech detekování adulterace mléka mlékem jiného živočišného druhu. Poměrně nově se setkáváme s technologiemi vyvinutými

pro analýzu struktur mléčných bílkovin založených na metodách hmotnostní spektrometrie (MS) (Borková & Snášelová 2005). V praxi je MS využívána velmi často ve spojení se separačními metodami (Čížková et al. 2012). Princip MS spočívá v ionizaci molekul vzorku, jež se následně působením elektromagnetického pole separují a dále detekují na základě poměru jejich hmotnosti a náboje. Ionty poskytují informace o povaze a struktuře jejich prekurzorové molekuly (De Hoffmann 2000). Jako účinná metoda odhalování ředění mléka jiným druhem se prokázala MALDI-MS (z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry, tedy hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice). MALDI-MS je rychlá a jednoduchá technika bez potřeby složitých příprav vzorku sloužící jako účinný analytický nástroj k získání spolehlivého profilu mléčných bílkovin (Borková & Snášelová 2005). Potenciál MALDI-MS metody pro detekci ředění kozího a ovčího mléka kravským potvrdily prostřednictvím odlišnosti hmotnostních spekter sledovaných biomarkerů – syrovátkových a kaseinových bílkovin – studie Siciliano et al. (2000), Cozzolino et al. (2001) a Calvano et al. (2012). Další spektroskopickou metodou s potenciálem pro odhalování falšování mléka levnějšími ekvivalenty je nukleární magnetická rezonance.

### 3.3 Nukleární magnetická rezonance

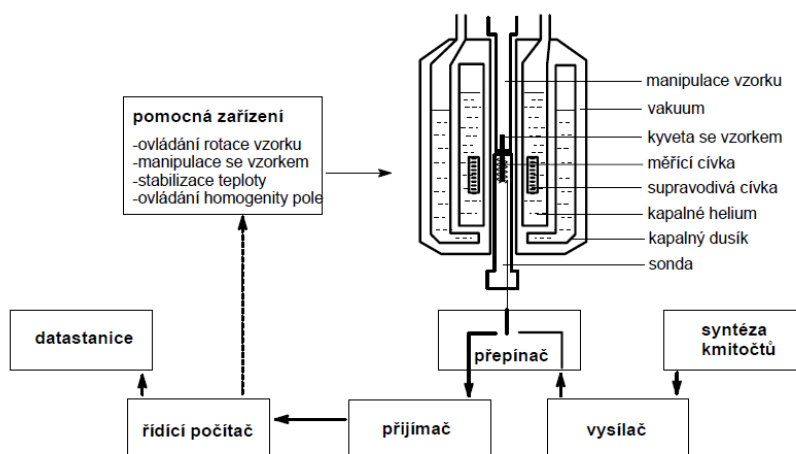
Nukleární magnetická rezonance (NMR, z angl. Nuclear Magnetic Resonance) patří v oboru analytické chemie mezi hlavní spektroskopické nástroje sloužící k objasnění chemické struktury látek. Objev tohoto fenoménu je datován do čtyřicátých let dvacátého století a připisován dvěma na sobě nezávislým skupinám fyziků z Harvardovy univerzity v čele s Edwardem M. Purcellem a z Kalifornské univerzity v Los Angeles v čele s Felixem Blochem, kteří za tento přínos vedoucí k založení nového odvětví vědy obdrželi v roce 1952 Nobelovu cenu za fyziku. Následný intenzivní výzkum metody přinesl další rozvoj, včetně objevů jevů a principů funkce NMR, prokázal vysoký potenciál magnetické rezonance pro využití k chemické analýze a vedl k získání dalších Nobelových cen. Dnes je k dispozici vyspělá spektrometrická metoda umožňující identifikaci látek, a dokonce i třídímenzionální (3D) zobrazovací technika hojně využívaná například ve zdravotnictví k pozorování měkkých tkání, známá pod pojmem magnetická rezonance (MRI, z angl. Magnetic Resonance Imaging) (Günther 2013). Technologický pokrok a digitalizace spektroskopie umožnily NMR uplatnění v laboratořích pro provádění rutinních analýz a ke snazší aplikovatelnosti metody v praxi také přispělo zdokonalení zpracování signálů, automatizace přípravy vzorků a zpracování výsledných spekter za využití statistické vícerozměrné analýzy dat (Kuballa et al. 2018).

NMR je výkonná analytická metoda, která může poskytnout kvantitativní informace o chemickém složení čistých látek a směsí anorganických i organických sloučenin a biomolekul, a to jak v kapalném, tak i pevném (ale rozpustném) skupenství. Identifikaci a ověření sloučenin lze provádět buď porovnáním s daty v dostupné literatuře nebo ve veřejných databázích NMR spektroskopie. Provedením složitějších NMR experimentů lze dokonce detekovat a identifikovat neznámé sloučeniny (Ralli et al. 2018; Lambert et al. 2019). Objev dvoudímenzionálních (2D) technik umožnil podání kompletní informace o skeletu molekuly a prostorovém uspořádání atomů. NMR spektroskopie díky své univerzálnosti dosáhla uplatnění také v oblasti kontroly pravosti potravin (Dračínský 2009; Kuballa et al. 2018). Autentizace pomocí NMR je využívána u mléčných produktů, ovocných šťáv, čajů, kávy, koření, medu, rýže, plodin organického zemědělství aj. (Hong et al. 2017)

#### 3.3.1 Instrumentace NMR

Pracovní techniku NMR spektrometru tvoří supravodivé cívky nabitě elektrickým proudem a ponořené v chladicím kapalném heliu, díky nimž vzniká magnetické pole. Magnetické pole musí být vysoce stabilní a homogenní. Pro dosažení maximální homogenity je systém doplňován několika dalšími různě prostorově orientovanými korekčními cívkami. Ty jsou společně s přijímacími a dalšími cívkami, určenými k vysílání dalších frekvencí pro jiná jádra, umístěny v sondě. U současných spektrometrů je obvykle pro vyslání pulzu i pro snímání signálů použita stejná cívka. Při manipulaci se spinovými systémy je k cívce připojen generátor frekvencí opatřený vysílačem, schopným vysílat krátké radiofrekvenční pulsy o přesné amplitudě, frekvenci a fázi. Při snímání detekovaných signálů je cívka přepnuta na

přijímač, který zachycený signál zesílí, detekuje a filtruje. Získaná spektra detekovaného signálu jsou následně v řídicím počítači po vícenásobném měření vzorku sčítána a podrobena Fourierově transformaci (Dračínský 2009). Schéma pracovní techniky NMR spektrometru je znázorněno na Obrázku 3. V současné době se výrobě NMR spektrometrů věnují společnosti Bruker Corporation, JEOL Ltd. a Agilent Technologies.



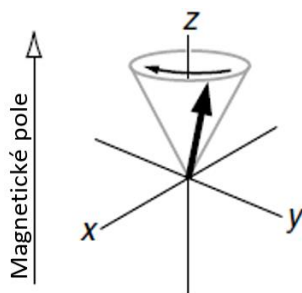
**Obrázek 3:** Schéma spektrometru (Dračínský 2009).

### 3.3.2 Princip NMR

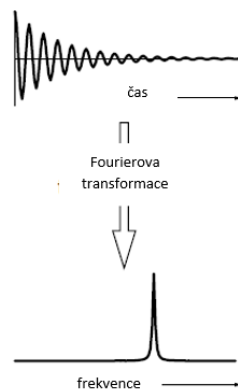
Principiálním podkladem pro NMR jsou magnetické vlastnosti atomových jader chemických prvků, díky nimž může docházet k interakci mezi jaderným magnetickým momentem daného atomu a externě působícím magnetickým polem (Günther 2013). Magnetické vlastnosti jádra jsou závislé na zastoupení nukleonů, tedy protonů a neutronů, které mají v rámci zákonů kvantové mechaniky svůj vnitřní moment hybnosti, neboli spin. Kombinace spinových vlastností protonů a neutronů definuje celkový spin jádra atomu a charakterizuje spinové kvantové číslo ( $I$ ). Pokud je atomové i nukleonové číslo atomu prvku sudé, spinové kvantové číslo nabývá nulové hodnoty (dochází ke spárování spinových částic), atom nedisponuje magnetickými vlastnostmi a není tudíž v NMR analýze měřitelný (například  $^{12}\text{C}$  nebo  $^{16}\text{O}$ ). Pro analýzu NMR jsou využívány izotopy prvků, jejichž atomové a/nebo nukleonové číslo je liché. Jádro těchto atomů je pozitivně nabit, generuje vlastní magnetické pole a má tzv. magnetický moment ( $\mu$ ) – vektorovou veličinu rovnoběžnou s vektorem spinu. Mezi nejlépe měřitelná jádra v NMR spektroskopii spadají izotopy s hodnotou spinového kvantového čísla  $I = \frac{1}{2}$  a jedná se nejčastěji o  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{29}\text{Si}$  nebo  $^{31}\text{P}$  (Lambert et al. 2019).

Dnes výhradně využívaná NMR technika je označována jako tzv. pulsní spektroskopie. V NMR experimentu je pozorován velmi vysoký počet jader, která jsou orientována náhodnými směry, díky čemuž se jednotlivé magnetické momenty jader vzájemně vrušují.

Dojde-li k aplikaci externího magnetického pole ( $B_0$ ), začnou magnetické momenty jader vykonávat precesní pohyb (Larmorova precese) na základě vychýlení z rovnovážného stavu, jádra změni svoji orientaci ve směru či protisměru magnetického pole a součtem magnetických momentů dochází k tzv. magnetizaci vzorku. Jádra rotují určitou úhlovou rychlostí o tzv. Larmorově frekvenci, dané gyromagnetickým poměrem jádra atomu a intenzitou  $B_0$ . Prostřednictvím NMR je měřena frekvence precese vektoru magnetizace, které se dosáhne následnou aplikací krátkého radiofrekvenčního pulsu potřebného pro vychýlení měřeného jádra z rovnovážného stavu do cívky. Aplikovaná pulsní frekvence musí být tedy shodná s precesí magnetického momentu jádra. Dojde zde ke vzniku tzv. rezonance, jež způsobí vychýlení  $B_0$  a precesi magnetizace (Obrázek 4) (Keeler 2006; Lambert et al. 2019). V důsledku vypnutí radiofrekvenčního pulsu dochází na základě zráty energie k návratu jádra do rovnovážného stavu, tzv. relaxaci, a postupnému zanikání signálu. Tento jev, známý jako volné doznívání indukce (FID, z angl. Free Induction Decay), je cílem detekce v NMR experimentu. FID indukuje na cívce elektrickou odezvu, jejíž intenzita v závislosti na postupu relaxace rovněž klesá. Výsledkem detekce na měřicí cívce je FID spektrum znázorňující závislost intenzity signálu na čase. Stěžejním prvkem NMR analýzy je následný proces matematické konverze FID spektra na spektrum závislosti intenzity signálu na frekvenci, známý jako Fourierova transformace (Obrázek 5) (Keeler 2006).



**Obrázek 4:** Vychýlení vektoru magnetizace a vznik precese (Keeler 2006).



**Obrázek 5:** Konverze časové domény do frekvenční (Keeler 2006).

Zásadním aspektem pro vznik interpretovatelných spekter v NMR experimentech je tzv. chemický posun. Měřená jádra atomů jsou od působícího magnetického pole stíněna elektrony, které svým pohybem v obalových vrstvách atomu vytvářejí magnetické pole opačného směru, než působí  $B_0$ . Jádra stejného izotopu, avšak s odlišným chemickým okolím a tím i rozložením elektronů ve svém okolí, se tedy od sebe liší rozdílnou intenzitou stínění. U těchto jader získáme odlišnou rezonanční frekvenci, díky níž můžeme ve spektrech sledovat a identifikovat jednotlivé sloučeniny. Ve výsledném spektru pak můžeme pozorovat jednu sloučeninu jako několik signálů, v závislosti na jejím chemickém okolí. Pro vyjádření frekvence radiofrekvenčního záření konkrétního jádra, tedy chemického posunu, byla zavedena stupnice s jednotkou ppm (= parts per milion; odpovídající miliontině frekvence vnějšího pole), jakožto univerzální jednotka pro všechny NMR spektrometry s odlišnými intenzitami  $B_0$ . Pro snazší stanovení počátku stupnice chemických posunů je často k analyzovaným vzorkům přidáván interní nebo externí standard NMR, při měření  $^1\text{H}$  spekter je využívána například 3-(trimethylsilyl)propionová kyselina (TSP) či tetramethylsilan (TMS), jehož chemická struktura s dvanácti ekvivalentními vodíky v molekule poskytuje singletový signál, ve výsledném spektru pozorovatelný nejčastěji nejvíce vpravo (Dračínský 2009).

Finální vyobrazení spektra je ovlivňováno mimo jiné i nepřímými magnetickými interakcemi mezi jednotlivými jádry atomů. Patří mezi ně spin-spinové interakce vazebných elektronů, které způsobují multiplicitu (štěpení) signálů. Velikost nepřímé spin-spinové interakce udává interakční konstanta  $J$  [Hz], která charakterizuje počet a geometrické uspořádání sousedících magneticky aktivních jader (Günther 2013).

### 3.3.2.1 $^1\text{H}$ NMR

Jak již bylo zmíněno, pro NMR analýzu je nutné měřit jádra prvků s nenulovým spinovým kvantovým číslem. Nejlépe měřitelná jádra jsou se spinem  $I = \frac{1}{2}$ , mezi která patří izotop vodíku  $^1\text{H}$  – nejběžněji měřené jádro v NMR. Jedná se o hojně se vyskytující izotop s vysokým biologickým zastoupením (99,9 %) a vysokou relativní citlivostí danou gyromagnetickým poměrem jádra. Druhé nejčastěji měřené jádro je izotop  $^{13}\text{C}$ , které má však oproti  $^1\text{H}$  velmi nízkou citlivost a především minoritní přírodní zastoupení (1,11 %) (Gerothanassis et al. 2002). Jednou z hlavních výhod  $^1\text{H}$  NMR metody je při náležitém výběru optimálních parametrů možnost jejího použití pro kvantitativní analýzu, ale také ji lze využít pro zajímavé aplikace, jako je například sledování degradace přírodních látek v závislosti na čase (Breton & Reynolds 2013).

### 3.3.3 Využití NMR v mlékařství

Využití NMR spektroskopie má v sektoru mlékařství značný potenciál. Technologie NMR se ukázala být účinným nástrojem ke kontrole kvality mléčných výrobků během zpracování a skladování, i k zajišťování autenticity různých druhů mlék. Kromě toho, že je NMR spektroskopie schopna detekovat falšování přísadkou cizorodých nežádoucích substancí, může být použita například k měření obsahu tuku, k ověřování zeměpisného původu, k pozorování mobility vody a jejího zadržování v mléčných produktech, jako jsou sýry, mléčné nápoje či zmrzlina. Dále může zhodnocovat fyzikálně-chemické a senzorické parametry produktů (Balthazar et al. 2021).

Analýze NMR je jako vhodnému analytickému nástroji v mlékařské praxi věnována čím dál větší pozornost a v současnosti je k dispozici řada studií se slibnými výsledky. Studie Segato et al. (2019) se například věnovala využití  $^1\text{H}$  NMR pro fingerprinting italských sýrů s chráněným označením původu (CHOP) a specifitou spočívající v pastevním systému chovu ve vysokohorské oblasti. Vzorky mléka z pastevního chovu a konvenčního chovu se od sebe zpravidla liší v závislosti na krmném systému, a to obsahem metabolitů, jako je například cholin, 2,3-butandiol, lysin či tyrosin. Zajímavostí je, že technika NMR se zde ukázala jako vhodná spíše pro sýry s krátkou dobou zrání, u dlouhozrajících sýrů analýzu značně komplikují probíhající chemické a biochemické pochody. Podobně využila i studie Marseglia et al. (2013)  $^1\text{H}$  NMR k ověření autentičnosti sýrů Parmigiano-Reggiano díky odhalení přítomnosti metabolitů zkrmované kukuřičné siláže. Ta v chovném systému typickém pro výrobu těchto sýrů s certifikací CHOP není povolena. Studie Santos et al. (2016) demonstrovala možnost aplikace  $^1\text{H}$  NMR pro detekci ředění kravského mléka vodou, syrovátkou, peroxidem vodíku, močovinou a syntetickým mlékem (preparát z emulgovaného rostlinného oleje s příslušným množstvím detergentu a močoviny). Hlavním ukazatelem zde byl nápadný nárůst hodnot relaxačních časů u vzorků falšovaných vyššími koncentracemi (30-50 %) výše zmíněných cizorodých matric. Haque et al. (2015) s použitím  $^{13}\text{C}$  NMR sledovali změny molekulárních struktur a dynamiky proteinových molekul v mléčných bílkovinných koncentrátech v závislosti na vlhkosti a době skladování, jež úzce souvisí s rozpustností těchto produktů a tím jejich využití v praxi. NMR nachází uplatnění také ve studiu metabolomiky mléka, což demonstroval například Zhu et al. (2020) aplikací  $^1\text{H}$  NMR analýzy na sledování změn zastoupení mléčných metabolitů v závislosti na stádiu laktace dojnice.

Co se týče využití NMR metody přímo v oblasti demaskování falsifikace kozího a ovčího mléka mlékem kravským, není toho doposud ve vědecké literatuře příliš k dispozici. Jak již bylo řečeno, spolehlivé odhalení nastavování mléka mlékem jiného živočišného druhu je velmi obtížné a doposud byla pozornost orientována k jiným analytickým metodám. Jedním z dostupných zdrojů je studie publikovaná Lamannem et al. (2011) zaměřující se na identifikaci směsí kravského a ovčího mléka na základě odlišnosti získaných vodíkových spekter. Zatímco laktóza byla v obou případech podobně zastoupena v množství i shodném intervalu chemického posunu, ve zbývajících částech spektra byly zaznamenány významné rozdíly v obsahu citrátu, laktátu a proteinů. Výsledky statistické analýzy zde pak potvrdily mléčné



bílkoviny, citrát a zastoupené aminokyseliny jako metabolity zodpovědné za druhovou variabilitu. Tato studie také poukazuje na potenciál kombinace profilování druhů mlék s multilineární regresi za účelem kvantifikace poměrů namíchaných směsí mlék. Relativně nízká výsledná spolehlivost (10 %) je připisována genetické variabilitě zvířat a dalším faktorům zmíněným v předchozích kapitolách. Další podobnou studii provedl Li et al. (2017), kteří se zaměřili na jednodimenzionální (1D) a 2D NMR analýzu  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spekter sójového nápoje, kozího a kravského mléka. Cílem experimentu bylo rozlišení těchto druhů mlék na základě určení jejich typických metabolitů a stanovení limitu kvantifikace falšování. Bylo nalezeno několik charakteristických identifikujících metabolitů a limitem detekce v případě falšovaného kozího mléka kravským bylo 5% naředění. Kravské mléko obsahovalo větší množství citrátu, lecitinu, ethanolaminu a aminocukrů než kozí mléko, u kozího mléka byly významně vyšší koncentrace acetátu, karnitinu a kreatinu.

### 3.3.4 Výhody a limitace NMR analýzy

Stejně jako kterákoli analytická metoda, má i NMR řadu svých výhod a nevýhod. Výběr vhodné metody závisí zejména na zaměření studie a povaze analyzovaných vzorků a odvíjí také dle ekonomických nákladů, dostupnosti a míry odborných znalostí pracovníků (Emwas et al. 2019). NMR metoda se ujímá stále významnější role v oboru metabolomiky a nachází podobné uplatnění jako hmotnostní spektroskopie, proto jsou právě tyto dvě metody vzájemně porovnávány v Tabulce 9 (Emwas 2015).

**Tabulka 9:** Porovnání výhod a limitací NMR a MS analýzy.

Validační parametr	NMR	MS
Citlivost	Nízká, lze zlepšit navýšením intenzity magnetického pole	Velmi vysoká, limit detekce v řádech nanomolů
Selektivita	Zpravidla neselektivní	Lze použít pro selektivní i neselektivní (cílené a necílené) analýzy
Měření vzorku	V jednom měření lze detekovat všechny metabolity s hladinou koncentrace NMR	Zpravidla je třeba odlišných chromatografických metod pro různé typy metabolitů
Reprodukovatelnost	Velmi vysoká	Průměrná
Zotavení vzorku	Nedestruktivní, vzorek lze opakovaně analyzovat a dlouhodobě skladovat	Destruktivní, ale je potřeba jen velmi malého množství vzorku
Příprava vzorku	Minimální příprava vzorku	Náročnější; je potřeba různých kolon a optimalizace ionizačních podmínek
Možnost cílené analýzy	Méně vhodná pro cílenou analýzu	Velmi vhodná pro cílenou analýzu

Zdroj: Emwas (2015); upraveno autorem.

Mezi výhody NMR patří možnost využití jak pro cílené, tak necílené analýzy. Aplikace NMR není omezena pouze na kapalné vzorky, ale lze ji aplikovat i na pevné a plynné matrice či vzorky tkání (lékařství). Kromě hlavního využití pro molekulární identifikaci a strukturálního objasňování lze NMR také použít ke studiu fyzikálních a chemických vlastností molekul, jako je elektronová hustota a molekulární dynamika (Emwas 2015). Jde o jednoduchou a rychlou analytickou metodu relativně šetrnou k životnímu prostředí. Má vysokou instrumentální stabilitu a je schopna zpracovat velká množství vzorků. NMR patří mezi nedestruktivní techniky, není zde nutná složitá příprava vzorku ani separace rozpouštědla (Emwas 2015; Kamal & Karoui 2015; Sobolev et al. 2019; Balthazar et al. 2021). Kombinací s chemometrií lze realizovat zpracování velkých objemů dat a zvýraznění rozdílů či podobností mezi jednotlivými vzorky (Balthazar et al. 2020).

Z opačného hlediska existují také určité nevýhody, které je nutno brát na zřetel a které zatím v potravinářském průmyslu brání použití NMR pro rutinní analýzy. Jsou jimi například vysoké pořizovací a údržbové náklady (Balthazar et al. 2020). Instrumentace NMR vyžaduje také nemalý prostor pro vlastní vybavení a obsluhu vysoce kvalifikovaným a školeným personálem (Emwas 2015). Problematické pro provedení NMR analýzy mohou být také určité matrice. Zatímco některé tekuté potraviny, jako jsou například nápoje, oleje či snadno rozpustný med, je možno jednoduše podrobit analýze pomocí  $^1\text{H}$  NMR bez zvláštních úprav vzorků, nehomogenní tekuté potraviny, mezi něž patří například mléko, obvykle nejsou schopny poskytnout dostatečně rozlišená NMR spektra. Mléko je emulgovaný koloid skládající se z tukových kuliček a bílkovin suspendovaných ve vodě. Díky své povaze lze mléko považovat za jednu z nejsložitějších potravin ke studiu. Proto je často zapotřebí dalších extrakčních postupů k umožnění studia jeho složek. Další komplikací pro analýzu může představovat přítomnost paramagnetických kovů ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) v potravinách, například v koření, obilovinách či mase, kde během extrakčního postupu mohou být tyto kationty extrahovány spolu s analyty a způsobit tak snížené rozlišení signálů  $^1\text{H}$  metabolitů ve spektru (Sobolev et al. 2019).

## 4 Materiály a metodika

### 4.1 Úvod do experimentu

NMR experiment byl realizován na sadách vzorků kravského, kozího a ovčího mléka. Testovány byly sady čistého mléka. Analýze byly podrobeny a navzájem mezi sebou porovnány samostatné sady kozího mléka s kravským a také sady ovčího mléka s kravským. Z technologických důvodů (mléko určeno pro výrobu sýrů) byla testovaná mléka ošetřena šetrnou pasterací. Následovala příprava vzorků pro účel NMR experimentu. Po NMR analýze a softwarové úpravě a zpracování získaných dat bylo provedeno statistické šetření a identifikace detekovaných metabolitů mléka, které nesou odpovědnost za druhovou variabilitu a mají potenciál sloužit jako indikátory falšování kozího či ovčího mléka mlékem kravským.

### 4.2 Analyzované vzorky mléka

Byly analyzovány a následně porovnávány sady kravského, kozího a ovčího mléka (sada kravské – kozí: 24 vzorků kravského, 24 vzorků kozího a sada kravské – ovčí: 22 vzorků kravského, 22 vzorků ovčího mléka). Zastoupení hlavních mléčných komponent vzorků je shrnuto v Tabulce 10. Vzorky byly odebrány z několika farem v ČR, konkrétně v Olomouckém, Moravskoslezském a Zlínském kraji. Vzorkování zohledňovalo termíny odstavu mláďat u malých přežvýkavců, fyziologický fakt změny složení mléka v průběhu laktace a také skutečnost poklesu dojivosti u malých přežvýkavců koncem léta. Především stáda malých přežvýkavců nebyla jednotná z hlediska plemene, nežádka zahrnovala zvířata i tří plemen, a dokonce i meziplenných kříženců ve stádech.

Testovaná plemena:

Krávy: holštýn a české strakaté;

Ovce: lacaune, cighája, východofríská ovce;

Kozy: bílá krátkosrstá koza, hnědá krátkosrstá koza, anglonúbijská koza.

Bazénové vzorky syrového mléka byly odebrány z chladicích tanků na farmách při teplotě pod 8 °C a dále do 24 hodin transportovány do laboratoře Výzkumného ústavu mlékárenského (pracoviště Šumperk) v termoboxech s chladicími vložkami. Následně bylo 250 ml každého vzorku mléka ošetřeno šetrnou pasterací (72 °C po dobu 15 s) vsádkovým způsobem ve vodní lázni. Vzorky byly poté ochlazeny na 25 °C po dobu 12 minut, uloženy při teplotě 5 °C a transportovány v chladicích boxech do laboratoře České zemědělské univerzity v Praze k analýzám.

**Tabulka 10:** Průměrné zastoupení hlavních složek a pH analyzovaných vzorků.

<b>Kravné mléko (n=24)</b>							
	<b>CPM</b>	<b>SB</b>	<b>tuk %</b>	<b>bílkoviny %</b>	<b>laktóza %</b>	<b>celk. sušina %</b>	<b>pH</b>
<b>x</b>	9 292	195	4,29	3,34	5,05	13,18	6,7
<b>min. hodnota</b>	1 000	53	3,67	2,9	4,9	12,6	6,63
<b>max. hodnota</b>	38 000	412	5,14	3,76	5,27	14,1	6,76
<b>sd</b>	9 085	73	0,423	0,209	0,098	0,4	0,039

<b>Kozí mléko (n=24)</b>							
	<b>CPM</b>	<b>SB</b>	<b>tuk %</b>	<b>bílkoviny %</b>	<b>laktóza %</b>	<b>celk. sušina %</b>	<b>pH</b>
<b>x</b>	646 583	1062	3,35	2,96	4,54	11,65	6,57
<b>min. hodnota</b>	1 000	145	1,82	2,56	4,32	9,72	5,4
<b>max. hodnota</b>	7 900000	3015	4,6	3,35	4,82	13,03	6,79
<b>sd</b>	1 655 445	831	0,589	0,23	0,119	0,753	0,254

<b>Ovčí mléko (n=22)</b>							
	<b>CPM</b>	<b>SB</b>	<b>tuk %</b>	<b>bílkoviny %</b>	<b>laktóza %</b>	<b>celk. sušina %</b>	<b>pH</b>
<b>x</b>	458 917	755	6,74	5,9	4,73	18,21	6,64
<b>min. hodnota</b>	1 000	50	3,89	4,49	4,15	14,74	6,34
<b>max. hodnota</b>	4 800 000	2237	8,76	6,61	5,36	20,27	6,75
<b>sd</b>	1 043 534	475	1,357	0,549	0,326	1,504	0,103

n= počet vzorků

x= aritmetický průměr

sd= směrodatná odchylka

CPM= celkový počet mikroorganismů (KTJ/1 ml)

SB= počet somatických buněk na 1 ml

### 4.3 Použité chemikálie

- $\text{CHCl}_3$  stabilizovaný ~ 1 % ethanolu p.a.; Penta s.r.o.
- Pufr - pH 7,4; 0,2 %  $\text{NaN}_3$ , 1,5 M fosfátový pufr, 5mM 3-(trimethylsilyl)propionová kyselina (TSP); Sigma Aldrich

### 4.4 Přístroje a vybavení

- IKA® VORTEX 3; IKA® - Werke GmbH & Co. KG, Německo
- Centrifuga Rotanta 460 R; Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Německo
- NMR spektrometr: Bruker AVANCE III HD 500 MHz NMR Spectrometer vybavený širokopásmovou sondou (5 mm BBFO SmartProbe); Bruker BioSpin, Rheinstetten, Německo
- Pipety 100-1000  $\mu\text{l}$  a 500-5000  $\mu\text{l}$ ; VWR International s.r.o., ČR
- Centrifugační zkumavky (kónická, PP, 15 ml, plastové šroubovací víčko); VWR International s.r.o., ČR
- Mikrozkušavky EASY-LOCK® MICROTUBE (kónická, PP, 1,5 ml); FL Medical s.r.l., Itálie
- NMR kyvety (5 mm, Norell ST500); Norell Inc., Morangton, NC, USA

### 4.5 Software

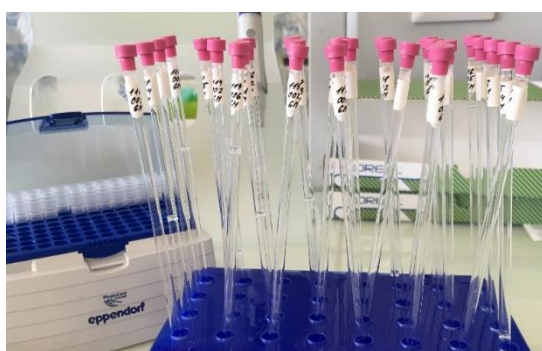
- Topspin (3.57; Bruker BioSpin); Rheinstetten, Německo
- MestReNova 14.0.1 Software (Mestrelab Research); Santiago de Compostela, Španělsko
- Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA)
- Online software MetaboAnalyst 5.0 (metaboanalyst.ca) (Chong et al. 2019)
- Online metabolomická databáze (hmdb.ca)

## 4.6 Příprava vzorků pro $^1\text{H}$ NMR analýzu

Z každého vzorku mléka byly odpipetovány 2 ml do centrifugační zkumavky, k nimž bylo za účelem oddělení tukové frakce přidáno 2 ml  $\text{CHCl}_3$ . Obsah se řádně zvertexoval a následně zcentrifugoval po dobu 15 minut (11 500 otáček za minutu při 4 °C) v laboratorní odstředivce. Ovčí mléko bylo centrifugováno 20 minut. Po ukončení centrifugace (Obrázek 6) bylo odebráno 720  $\mu\text{l}$  mléčné plazmy do mikrozukavky, do níž se následně aplikovalo 80  $\mu\text{l}$  pufru. Mikrozukavky se opět řádně promíchaly a odstředily na 15 minut (14 500 otáček za minutu při 4 °C). Tím došlo k separaci proteinové frakce a její sedimentaci na dno mikrozukavky. Čistý supernatant byl z mikrozukavky odpipetován v objemu 600  $\mu\text{l}$  do NMR zkumavky. Takto byl vzorek připraven k analýze (Obrázek 7).



Obrázek 6: Vzorek mléka s  $\text{CHCl}_3$  po centrifugaci.



Obrázek 7: Vzorky připravené pro NMR analýzu.

## 4.7 Provedení a parametry analýzy $^1\text{H}$ NMR

Analýza vzorků byla realizována provedením základního 1D experimentu s použitím „*noesypr1d*” pulsní sekvence na spektrometru Bruker AVANCE III HD NMR Spectrometer s operační  $^1\text{H}$  frekvencí 500,23 MHz, při teplotě 298 K. Snímání spekter proběhlo s následujícími parametry: 128 skenů (NS), 32k datových bodů (TD), šířka spektra (SW) 16 ppm, akviziční čas (AQ) 4,00 s. Suprese signálu vody bylo dosaženo v průběhu relaxační prodlevy 1 s a směšovacího času 100 ms aplikací 25 Hz saturačního pulsu umístěného do středu signálu vody. Spektra vzorků kravského a kozího mléka byla referencována na vnitřní standard TSP s pozicí 0,00 ppm. V případě sady, kde byla porovnávána ovčí a kravská mléka, bylo referencování základní linie mléka provedeno na celé spektrum. Následovala Fourierova transformace, manuální úprava a zpracování spekter v programech Topspin (3.57, Bruker BioSpin, Rheinstetten, Německo) a MestReNova 14.0.1 Software (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko).

#### 4.7.1 Statistické zpracování a vyhodnocení dat

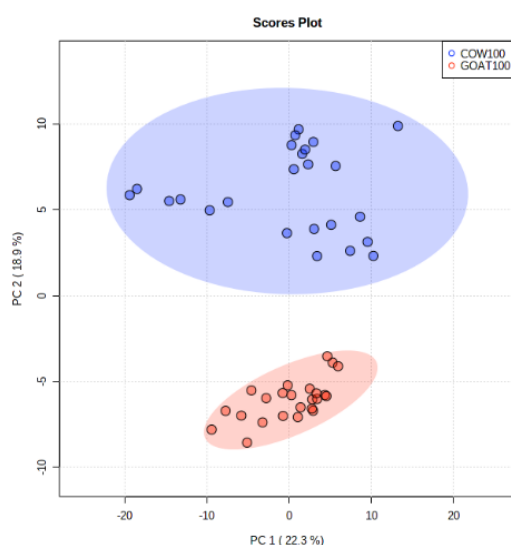
NMR analýza mléka poskytuje objemné datové soubory tvořené velkým množstvím vzorků a proměnných. K vizualizaci dat a zpřehlednění rozsáhlých datových sad je proto nutné využít pokročilé statistické nástroje. Za tímto účelem se používá vícerozměrná analýza dat, jež analyzuje systematické variace v datové matici a umožňuje identifikaci základních proměnných, které zapříčiňují rozdílnost vzorků (Sundekilde et al. 2013). Pro snížení dimenzionality a potlačení nepatrné variability dat byl proveden tzv. binning, spočívající v rozčlenění spektra do úseků – binů – širokých 0,04 ppm, čímž dojde k redukci počtu proměnných. Ke statistickému vyhodnocení byla na soubor získaných dat aplikována nesupervizovaná analýza hlavních komponent (PCA, Principal Component Analysis) za účelem prozkoumání celkového uspořádání dvou testovaných tříd. PCA poskytuje prostřednictvím lineární transformace původních proměnných měřených ve vzorcích značně zredukovaný soubor nekorelovaných proměnných, tedy hlavních komponent, které usnadňují interpretaci dat.

Pro identifikaci odlišností mezi skupinami byla použita supervizovaná ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců (OPLS-DA; Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis), která slouží jako nástroj pro odlišení dvou skupin vzorků a umožnění identifikace statisticky významných proměnných (Sundekilde et al. 2013). Pro ověření modelu bylo také využito křížové validace pomocí permutačních testů při 1000 permutacích. Vizualizace významně odlišných metabolitů byla uskutečněna pomocí zátěžového grafu, jenž charakterizuje míru projevu jednotlivých binů, tedy signálů, k dané hlavní komponentě. PCA a OPLS-DA byla zpracována v online softwaru MetaboAnalyst 5.0 (metaboanalyst.ca). Zátěžový graf byl sestaven v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA) pomocí hodnoty  $p(\text{corr})$ , která byla násobena směrodatnou odchylkou jednotlivých binů. Zdrojem hodnoty  $p(\text{corr})$  byla OPLS-DA analýza. Na základě získaných významných binů  $^1\text{H}$  NMR spektra byly určeny chemické posuny statisticky signifikantních látek, následovala jejich identifikace prostřednictvím vědecké literatury a ověření správnosti identifikace v metabolomické databázi (hmdb.ca). Párový t-test byl použit ke zjištění hladiny významnosti mezi biny v kravském a kozím/ovčím mléku. Identifikaci byly podrobeny pouze pozice, které měly hladinu významnosti  $<0,05$ . Rovněž jako zátěžový graf byl i párový t-test sestaven v Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA).

## 5 Výsledky

### 5.1 Kozí a kravské mléko

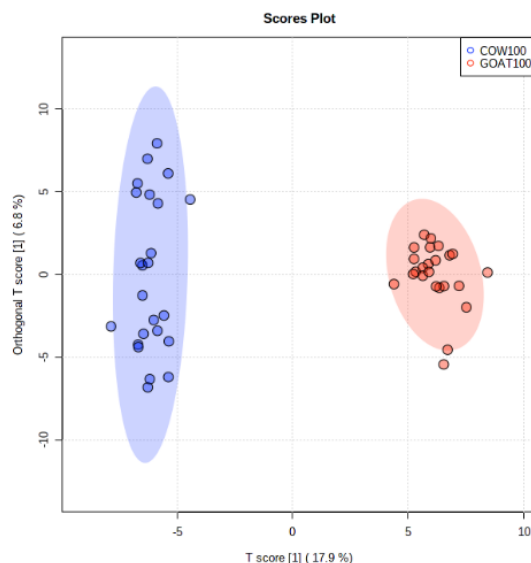
Výsledky PCA analýzy dat ze vzorků kozího a kravského mléka jsou zobrazeny v rozptylovém grafu komponentních skóre (Obrázek 8). PCA zde vytvořila na základě získaných dat dvě skupiny a byla schopna zřetelně oddělit kravské mléko od kozího. Hlavní komponenta PC 1 se podílela na variabilitě tříd z 22,3 %. PC 2 komponenta přispěla k variabilitě tříd z 18,9 %. Z grafu je zřejmé, že kozí mléko vykazuje větší homogenitu uvnitř skupiny než kravské, u kterého lze sledovat mezi jednotlivými proměnnými nižší míru korelace.



**Obrázek 8:** Rozptylový graf komponentních skóre (scores plot) PC 1 a PC 2 PCA analýzy kravského (n=24) a kozího mléka (n=24).

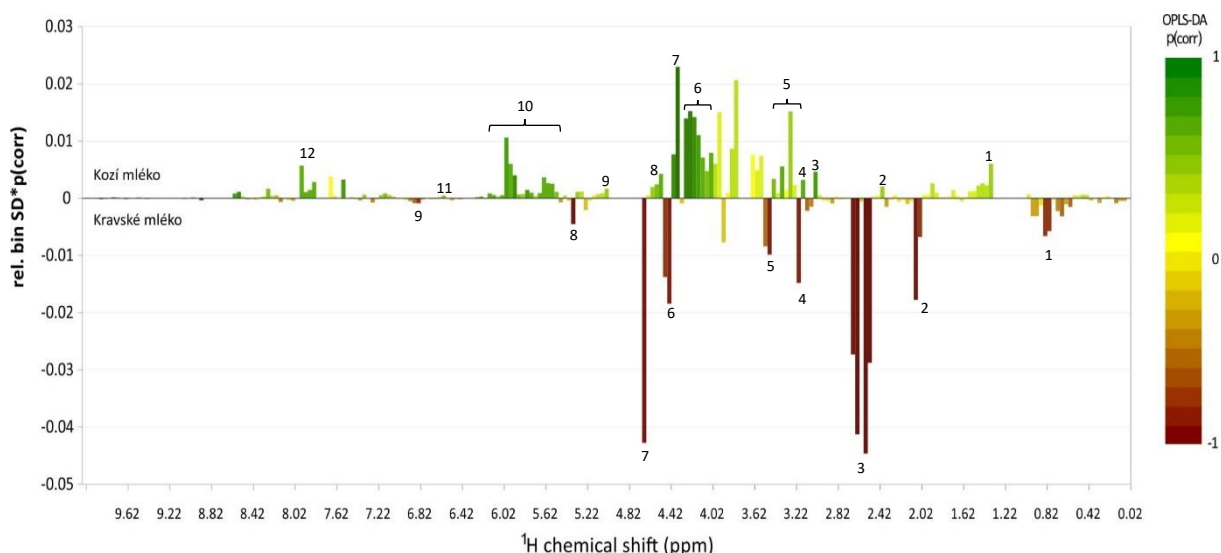
Následná OPLS-DA analýza umožnila zaměřit se na proměnné vedoucí k oddělení dvou skupin analyzovaných vzorků. Vertikální dimenze rozptylového diagramu (Obrázek 9) charakterizuje variability uvnitř skupin, horizontální dimenze poukazuje na variace mezi dvěma skupinami. OPLS-DA analýza potvrdila závěry vyvozené z analýzy PCA, nepatrně lépe oddělila vzorky kozího a kravského mléka a lze sledovat větší míru variability dat uvnitř skupiny kravského mléka. Ke zhodnocení, zda je separace dvou skupin vzorků statisticky významná, bylo využito křížové validace. Pomocí permutačních testů při 1000 permutacích byl model vyhodnocen jako validní, při čemž  $Q^2=0,971$  ( $p<0,001$ ) a  $R^2Y=0,987$  ( $p<0,001$ ).





**Obrázek 9:** Rozptylový graf komponentních skóre (scores plot) OPLS-DA analýzy kravského (n=24) a kozího mléka (n=24); křížová validace při 1000 permutacích  $Q^2=0,971$  ( $p<0,001$ ) a  $R^2Y=0,987$  ( $p<0,001$ ).

Grafická vizualizace pro identifikaci binů byla provedena prostřednictvím grafu zatížení, viz. Obrázek 10. Graf zatížení je barevně kodován dle hodnoty  $p(\text{corr})$  získané z OPLS-DA analýzy. Směr barevně zvýrazněných posunů vyjadřuje sílu binu na daném ppm sloužící k rozlišení kravského (hnědé biny) nebo kozího mléka (zelené biny) a poukazuje tak na statisticky významné rozdíly mezi těmito maticemi. Výrazně zabarvené biny byly následně identifikovány jako statisticky významné signály metabolitů. Biny odpovědné za separaci tříd jsou označeny v grafu zatížení a popsány a identifikovány v Tabulce 11 a 12.



**Obrázek 10:** Graf zatížení barevně kodovaný dle hodnoty  $p(\text{corr})$  pro čisté kozí (n=24) a čisté kravské mléko (n=24).

**Tabulka 11:** Identifikace metabolitů kravského mléka na základě ppm významných binů.**Kravské mléko**

Oblast spektra (č.)	Rozmezí ppm	Identifikovaný metabolit	Hodnota ppm v literatuře	Reference	Ověřeno v NMR databázi
1	0,78-0,86	butyrát <sup>4</sup>	0,78	Hu et al. (2004)	✓
2	2,02-2,10	aminosacharidy <sup>4</sup>	2,05	Klein et al. (2010)	
3	2,50-2,70	citrát <sup>4</sup>	2,69; 2,54; 2,58	Li et al. (2017)	✓
		methionin <sup>4</sup>	2,65	Zhao et al. (2017)	✓
4	3,18-3,22	cholin <sup>4</sup>	3,18	Klein et al. (2010)	✓
		karnitin <sup>4</sup>	3,21	Klein et al. (2010)	✓
5	3,46-3,54	cholin <sup>3</sup>	3,51	Klein et al. (2010)	✓
		galaktóza <sup>3</sup>	3,49	Klein et al. (2010)	✓
6	4,42-4,50	laktóza <sup>4</sup>	4,45	Klein et al. (2010)	✓
7	4,66-4,70	laktóza <sup>4</sup>	4,67	Klein et al. (2010)	neshoda ppm
8	5,34-5,38	galaktóza-1-fosfát <sup>4</sup>	5,38	Buitenhuis et al. (2013)	neshoda ppm
9	6,78-6,90	tyrosin <sup>2</sup>	6,90	Zhao et al. (2017)	✓

p-hodnoty jednotlivých metabolitů významných pro rozlišení druhů mléka:

1: 0,05-0,001

2: 0,001-0,0001

3: 0,0001-0,00001

4: <0,00001

**Tabulka 12:** Identifikace metabolitů kozího mléka na základě ppm významných binů.**Kozí mléko**

Oblast spektra (č.)	Rozmezí ppm	Identifikovaný metabolit	Hodnota ppm v literatuře	Reference	Ověřeno v NMR databázi
1	1,34-1,58	alanin <sup>2</sup>	1,48	Sanchez et al. (2021)	✓
2	2,38-2,42	pyruvát <sup>2</sup>	2,38	Sanchez et al. (2021)	neshoda ppm
3	3,02-3,06	kreatin <sup>4</sup>	3,04	Sanchez et al. (2021)	✓
		fosfokreatin <sup>4</sup>	3,05	Sanchez et al. (2021)	✓
		kreatinin <sup>4</sup>	3,05	Sanchez et al. (2021)	✓
4	3,14-3,18	ethanolamin <sup>2</sup>	3,15	Sanchez et al. (2021)	✓
5	3,22-3,46	karnitin <sup>4;3</sup>	3,21 3,43	Sanchez et al. (2021)	✓
		taurin <sup>3</sup>	3,27; 3,42	Zhao et al. (2017)	✓
6	4,02-4,30	galaktóza <sup>4</sup>	4,06	Sanchez et al. (2021)	✓
		kreatinin <sup>4</sup>	4,06	Sundekilde et al. (2013)	✓
		myo-inositol <sup>3</sup>	4,07	Zhao et al. (2017)	✓
		oligofruktóza <sup>1;4</sup>	4,11; 4,18	Zhao et al. (2017)	
		glycerová kys. <sup>1</sup>	4,12	Sanchez et al. (2021)	✓
		fosfocholin <sup>4</sup>	4,18	Sanchez et al. (2021)	
7	4,38-4,42	neidentifikováno <sup>4</sup>			
8	4,50-4,66	askorbát <sup>4</sup>	4,51	Zhao et al. (2017)	
9	5,10-5,14	neidentifikováno <sup>1</sup>			
10	5,50-6,18	glukóza-1-fosfát <sup>2</sup>	5,51	Sundekilde et al. (2013)	neshoda ppm
		močovina <sup>3</sup>	5,79	Sundekilde et al. (2013)	✓
		uridin <sup>3</sup>	5,89; 5,90	Garwolińska et al. (2020)	✓
11	6,58-6,62	fumarát <sup>4</sup>	6,52	Sundekilde et al. (2013)	✓
12	7,70-7,86	hippurát <sup>4</sup>	7,84	Sundekilde et al. (2013)	✓
		uridin <sup>4</sup>	7,86	Garwolińska et al. (2020)	✓

p-hodnoty jednotlivých metabolitů významných pro rozlišení druhů mléka:

1: 0,05-0,001

2: 0,001-0,0001

3: 0,0001-0,00001

4: <0,00001

Pro snazší orientaci v široké škále identifikovaných druhově specifických metabolitů byly výsledky analýzy kravského a kozího mléka shrnuty do Vennova diagramu (Obrázek 11), který zpřehledňuje relaci mezi porovnávanými maticemi.

Za druhovou variabilitu kravského mléka zde byly identifikovány jako zodpovědné látky butyrát, aminosacharidy, citrát, methionin, cholin, laktóza, galaktóza-1-fosfát a tyrosin. V případě aminosacharidů nebylo možné potvrdit správnost identifikace na základě chemického posunu v metabolomické databázi, neboť se jedná o skupinu několika látek, které v dostupné vědecké literatuře nebyly dále specifikovány. Laktóza identifikovaná v rozmezí ppm 4,66-4,70 a galaktóza-1-fosfát byly sice v literatuře nalezeny, ale jejich chemický posun se neshodoval ppm polohami v metabolomické databázi. S výjimkou tyrosinu se všechny výše zmíněné metabolity vyznačují významnou statistickou signifikancí.

U kozího mléka lze pozorovat větší množství specifických látek, konkrétně alanin, pyruvát, kreatin, fosfokreatin, kreatinin, ethanolamin, taurin, myo-inositol, oligofruktózu, glycerovou kyselinu, fosfocholin, askorbát, glukózu-1-fosfát, močovinu a fumarát. Pyruvát a glukóza-1-fosfát se s chemickými posuny v literatuře neshodovaly s hodnotami v metabolické databázi. Rovněž nebylo možné potvrdit správnost identifikace oligofruktózy, fosfocholinu a askorbátu. Jako statisticky nejvíce signifikantní se zde jeví kreatin, fosfokreatin, askorbát, fosfocholin, uridin, fumarát a hippurát. Metabolity v oblasti spektra 4,38-4,42 ppm (p-hodnota <0,00001) a 5,10-5,14 ppm nebyly v literárních zdrojích nalezeny.

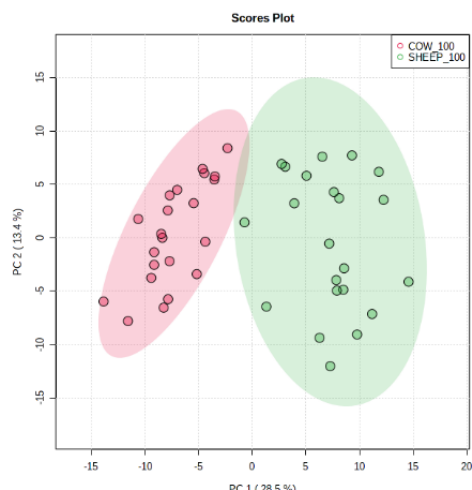
Karnitin a galaktóza byly identifikovány v obou maticích.



**Obrázek 11:** Vennův diagram metabolitů kravského a kozího mléka.

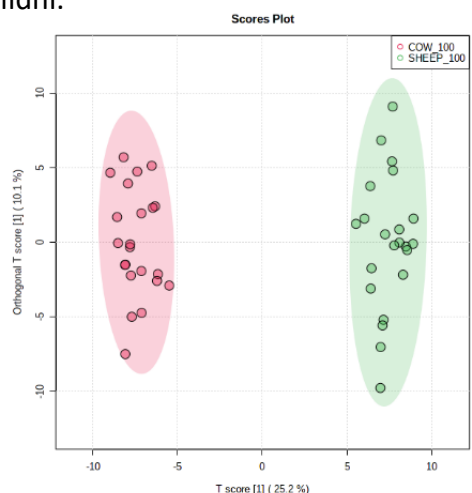
## 5.2 Ovčí a kravské mléko

Výsledný výstup statistického šetření PCA analýzou je znázorněn v rozptylovém grafu komponentních skóre (viz Obrázek 12). I v případě kravského a ovčího mléka PCA analýza prokázala schopnost získaných dat tvořit skupiny a oddělit je na základě odlišného živočišného původu, avšak při porovnání rozptylových grafů PCA analýzy je zřejmé nepatrně méně výraznější oddělení skupin dat ovčího a kravského mléka než u dat kozího a kravského mléka. Hlavní komponenta PC 1 se na variabilitě dat podílela z 28,5 % a PC 2 z 13,4 %. Ovčí mléko vykazuje nižší homogenitu dat a nižší míru korelace proměnných v rámci své skupiny.



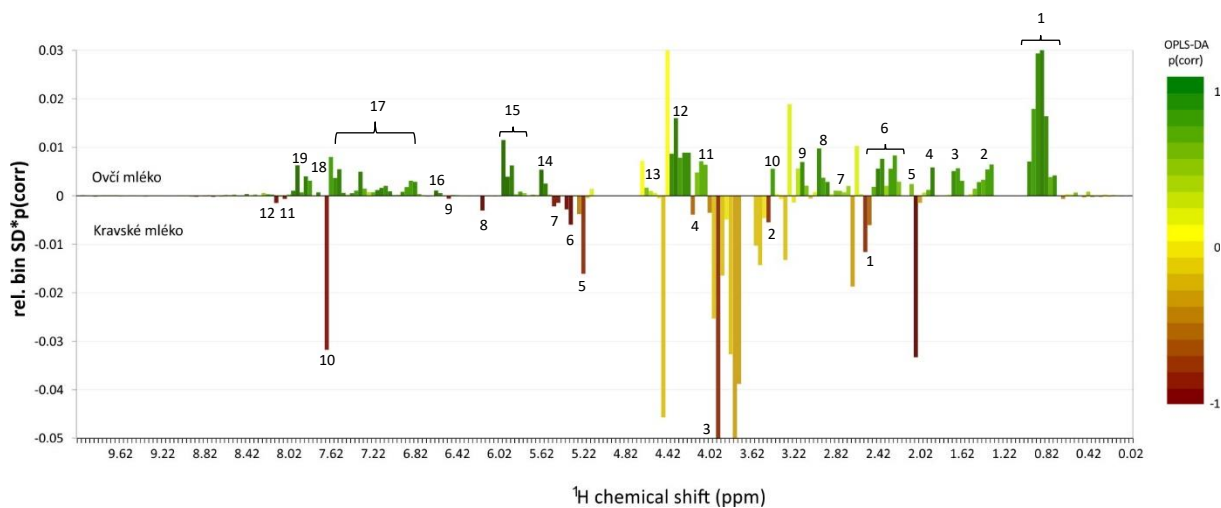
**Obrázek 12:** Rozptylový graf komponentních skóre (scores plot) PC 1 a PC 2 PCA analýzy kravského (n=22) a ovčího mléka (n=22).

Podrobením dat OPLS-DA analýze byly opět potvrzeny závěry z PCA analýzy. Navíc zde výrazněji došlo k lepšímu oddělení skupin ovčího a kravského mléka, přičemž opět horizontální komponenta oddělila skupiny a vertikální komponenta v rámci charakteristiky rozdílů ve skupině poukázala na větší míru variability dat u ovčího mléka (viz Obrázek 13). Provedením křížové validace modelu při 1000 permutacích, kdy  $Q^2=0,969$  ( $p<0,001$ ) a  $R^2Y=0,986$  ( $p<0,001$ ), byl model shledán jako validní.



**Obrázek 13:** Rozptylový graf komponentních skóre (scores plot) OPLS-DA analýzy kravského (n=22) a ovčího mléka (n=22); křížová validace modelu při 1000 permutacích:  $Q^2=0,969$  ( $p<0,001$ ) a  $R^2Y=0,986$  ( $p<0,001$ ).

Graf zatížení (Obrázek 14) je opět použit k vizualizaci dat na základě hodnoty  $p(\text{corr})$  získané z OPLS-DA analýzy. Směr barevně odlišných posunů charakterizuje výraznější zastoupení v kravském (hnědé zbarvení) nebo ovčím mléce (zelené biny), díky čemuž můžeme sledovat statisticky významné rozdíly mezi těmito druhy mlék. Tmavě zbarvené biny označené v grafu zatížení opět umožnily identifikaci významných metabolitů vyhledaných a identifikovaných ve vědecké literatuře a NMR metabolické databázi (Tabulka 13 a 14).



**Obrázek 14:** Graf zatížení barevně kodovaný dle hodnoty  $p(\text{corr})$  pro čisté ovčí ( $n=22$ ) a čisté kravské mléko ( $n=22$ ).

**Tabulka 13:** Identifikace metabolitů kravského mléka na základě ppm významných binů.**Kravské mléko**

Oblast spektra (č.)	Rozmezí ppm	Identifikovaný metabolit	Hodnota ppm v literatuře	Reference	Ověřeno v NMR databázi
1	2,50-2,58	citrát <sup>3</sup>	2,54; 2,58	Li et al. (2017)	✓
2	3,46-3,50	galaktóza <sup>1</sup>	3,49	Klein et al. (2010)	✓
3	3,94-3,98	3-methylhistidin <sup>2</sup>	3,97	Klein et al. (2010)	✓
		laktóza <sup>2</sup>	3,94; 3,96	Klein et al. (2010)	✓
4	4,18-4,22	fosfocholin <sup>1</sup>	4,18	Sanchez et al. (2021)	
		oligofruktóza <sup>1</sup>	4,18	Zhao et al. (2017)	
		lecithin <sup>1</sup>	4,18; 4,22	Hu et al. (2004)	
5	5,22-5,26	galaktóza <sup>3</sup>	5,25	Scano et al. (2019)	✓
6	5,34-5,42	galaktóza-1-fosfát <sup>4</sup>	5,38	Buitenhuis et al. (2013)	neshoda ppm
7	5,46-5,54	galaktóza-1-fosfát <sup>4</sup>	5,51	Buitenhuis et al. (2013)	✓
8	6,18-6,22	orotát <sup>4</sup>	6,20	Sundekilde et al. (2013)	✓
9	6,50-6,54	fumarát <sup>4</sup>	6,52	Sundekilde et al. (2013)	✓
10	7,66-7,70	pyridoxin <sup>1</sup>	7,66	Zhao et al. (2017)	✓
11	8,06-8,10	3-methylhistidin <sup>4</sup>	8,09	Klein et al. (2010)	neshoda ppm
		6-methyladenin <sup>4</sup>	8,07	Zhao et al. (2017)	✓
12	8,14-8,18	neidentifikováno <sup>4</sup>			

p-hodnoty jednotlivých metabolitů významných pro rozlišení druhů mléka:

1: 0,05-0,001

2: 0,001-0,0001

3: 0,0001-0,00001

4: <0,00001

**Tabulka 14:** Identifikace metabolitů ovčího mléka na základě ppm významných binů.

**Ovčí mléko**

Oblast spektra (č.)	Rozmezí ppm	Identifikovaný metabolit	Hodnota ppm v literatuře	Reference	Ověřeno v NMR databázi
1	0,74-1,02	butyrát <sup>4</sup>	0,90	Sundekilde et al. (2013)	✓
		leucin <sup>4</sup>	0,96	Scano et al. (2019)	✓
		isoleucin <sup>4</sup>	0,93	Sundekilde et al. (2013)	✓
2	1,34-1,54	alanin <sup>4</sup>	1,48	Sundekilde et al. (2013)	✓
3	1,62-1,74	leucin <sup>4</sup>	1,70	Scano et al. (2019)	✓
		lysin <sup>4</sup>	1,70	Scano et al. (2019)	✓
4	1,90-2,02	acetát <sup>4</sup>	1,92	Klein et al. (2010)	✓
		lysin <sup>4</sup>	1,91	Scano et al. (2019)	✓
5	2,10-2,14	methionin <sup>2</sup>	2,13	Scano et al. (2019)	✓
6	2,22-2,50	aceton <sup>3</sup>	2,24	Klein et al. (2010)	✓
		glutamát <sup>1</sup>	2,36	Buitenhuis et al. (2013)	✓
		pyruvát <sup>4</sup>	2,46	Scano et al. (2019)	✓
		karntitin <sup>4</sup>	2,44	Klein et al. (2010)	✓
7	2,70-2,86	neidentifikováno <sup>2</sup>			
		lysin <sup>4</sup>	3,00	Scano et al. (2019)	✓
9	3,10-3,22	tyrosin <sup>4</sup>	3,15	Scano et al. (2019)	✓
		ethanolamin <sup>4</sup>	3,15	Li et al. (2017)	✓
		cholin <sup>4</sup>	3,18	Klein et al. (2010)	✓
		fosfocholin <sup>4</sup>	3,18	Klein et al. (2010)	
		taurin <sup>4</sup>	3,42	Zhao et al. (2017)	✓
		karnitin <sup>4</sup>	3,43	Li et al. (2017)	✓
11	4,06-4,18	cholin <sup>2</sup>	4,06	Klein et al. (2010)	✓
		kreatinin <sup>2</sup>	4,06	Klein et al. (2010)	neshoda ppm
		galaktóza <sup>2</sup>	4,07	Klein et al. (2010)	✓
		laktát <sup>3</sup>	4,11	Li et al. (2017)	✓
12	4,22-4,42	fosfocholin <sup>3</sup>	4,16	Klein et al. (2010)	
		laktát <sup>4</sup>	4,23	Scano et al. (2019)	neshoda ppm
		lecithin <sup>4</sup>	4,22	Hu et al. (2004)	
13	4,62-4,66	glukóza-6-fosfát <sup>2</sup>	4,63	Zhao et al. (2017)	✓
14	5,58-5,66	neidentifikováno <sup>4</sup>			
15	5,78-6,02	močovina <sup>4</sup>	5,79	Buitenhuis et al. (2013)	✓
		uridin <sup>3</sup>	5,90	Zhao et al. (2017)	✓
16	6,58-6,66	neidentifikováno <sup>3,4</sup>			
17	6,78-7,66	tyrosin <sup>3</sup>	6,90; 7,20	Zhao et al. (2017)	✓
		histidin <sup>3</sup>	7,31	Scano et al. (2019)	✓
		hippurát <sup>4,3</sup>	7,54; 7,64	Sundekilde et al. (2013)	✓
		pyridoxin <sup>3</sup>	7,66	Zhao et al. (2017)	✓
18	7,74-7,78	hippurát <sup>4</sup>	7,84	Sundekilde et al. (2013)	✓
19	7,82-7,94	neidentifikováno <sup>4</sup>			

p-hodnoty jednotlivých metabolitů významných pro rozlišení druhů mléka:

1: 0,05-0,001

2: 0,001-0,0001

3: 0,0001-0,00001

4: <0,00001

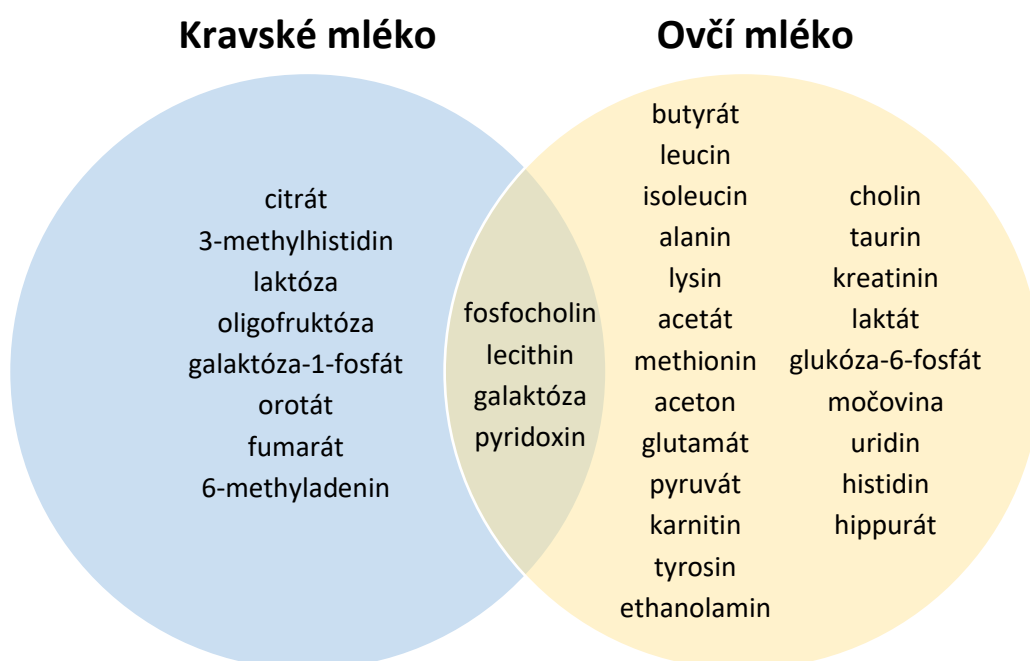


I v případě analýzy kravského a ovčího mléka byly výsledky statistického šetření a následné identifikace shrnuty do Vennova diagramu (Obrázek 15).

V kravském mléce byly v tomto případě stejně jako u testovaných sad kravského a kozího mléka identifikovány druhově specifické metabolity citrát, laktóza a galaktóza-1-fosfát. Dále zde byly identifikovány 3-methylhistin, oligofruktóza, orotát, fumarát a 6-methyladenin. Citrát, galaktóza-1-fosfát, orotát, fumarát, 3-methylhistidin a 6-methyladenin se vyznačují nízkými hladinami p-hodnoty. Metabolit vyhodnocený rovněž jako statisticky velmi významný v poloze 8,10-8,14 ppm nebyl na základě dostupných dat identifikován. Správnost identifikace fosfocholinu, lecithinu (přítomny i v ovčím mléce) a oligofruktózy nebylo umožněno v metabolomické databázi potvrdit. 3-methylhistin a galaktóza-1-fosfát se neshodovaly ve vědecké literatuře s ppm polohami v metabolomické databázi.

Výsledky identifikace významných látek ovčího mléka poukazují na vysokou specifitu ovčího mléka z hlediska obsahu řady aminokyselin. Jedná se zde o leucin, isoleucin, alanin, lysin, methionin, glutamát, tyrosin, taurin, histidin či derivát karnitin, dále uridin, kreatinin, cholin, pyruvát, aceton, acetát, hippurát, glukóza-6-fosfát, ethanolamin, butyrát, laktát a močovina. Všechny zmíněné aminokyseliny, s výjimkou methioninu a glutamátu, a dále butyrát, acetát, ethanolamin, močovina a hippurát se vyznačují nejnižšími definovanými hodnotami v rámci sledování signifikance. Také chemické posuny laktátu a kreatininu se neshodovaly ve vědecké literatuře s polohami ppm v metabolomické databázi.

Fosfocholin, lecithin, galaktóza a pyridoxin byly identifikovány u obou matric.



**Obrázek 15:** Vennův diagram metabolitů kravského a ovčího mléka.

## 6 Diskuze

Téma falšování potravin má ve společnosti velmi dlouhou historii a této problematice se nevyhnulo ani mléko a mléčné produkty. Kromě etického hlediska, kdy nekalé praktiky výrobců poškozují nejen zájmy spotřebitele, může falšování mléka přinášet konzumentům také závažné zdravotní komplikace. Proto je věnována pozornost vývoji snadných a rychlých analytických metod, které jsou schopny spolehlivě identifikovat falšované potraviny. Cílem této diplomové práce bylo otestovat metodu  $^1\text{H}$  NMR, jakožto nového účinného nástroje pro odhalení falsifikace kozího a ovčího mléka kravským mlékem. Kozí a ovčí mléko se v současnosti díky možnosti přínosu zdravotních benefitů a atraktivním sensorickým vlastnostem těší mezi spotřebiteli vzrůstající oblibě, avšak produkce těchto druhů mléka je značně limitována. Vzniká zde proto značné riziko jejich falšování prostřednictvím naředění levnějším a dostupnějším kravským mlékem. Metoda NMR se již prokázala jako účinná pro autentizaci a odhalování falšování několika druhů potravin. Proto je nasnadě dále rozvíjet potenciál metody i v dalších oblastech, a pro tento případ se nabízí i problematika falšování mléka mlékem jiného druhu.

Doposud se NMR osvědčila jako metoda vhodná například pro odhalování falšování medu přidavkem cukerných sirupů (Bertelli et al. 2010) nebo jako vhodný nástroj pro rozlišení botanického původu medu (Ohmenhaeuser et al. 2013). Velmi uspokojivých výsledků bylo dosaženo také v případě odhalení adulterace šafránu. Například Petrakis et al. (2015) potvrdili schopnost metody spolehlivě detekovat 20% podíl příměsi kurkumy, světlice barvířské a gardénie, které jsou pro falšování šafránu často zneužívané. Další komoditou, u které se NMR prokázala jako vhodná metoda pro odhalování falsifikace, je káva, velmi často falšovaná přidavkem sóji, slupek z kávových zrn či ječmene (de Moura Ribeiro et al. 2017). Také lze NMR využít pro rozlišení botanického původu kávy. Káva získávaná z *Coffea arabica* (známá pod komerčním názvem Arabica) je obecně dražší a považována za sensoricky atraktivnější než káva s původem z *Coffea canephora* (s komerčním názvem Robusta). Studie Monakhova et al. (2015) prokázala schopnost NMR detekovat příměs Robusty v komerčně dostupných vzorcích kávy Arabica, a to v množství 1-3 %.

V experimentální části této práce byly metodě  $^1\text{H}$  NMR podrobeny vzorky šetrně pasterovaného kozího, ovčího a kravského mléka, jejichž příprava k analýze zahrnovala také eliminaci tukové a proteinové frakce - NMR analýza byla tedy zaměřena na molekulární fázi disperzního systému mléka. Provedením NMR analýzy byla získána NMR spektra jednotlivých druhů mlék. Data byla následně mezi sebou porovnána (kravské s kozím a kravské s ovčím) prostřednictvím provedení statistických analýz PCA a OPLS-DA. Výsledkem statistického šetření je řada metabolitů zodpovědných za druhovou variabilitu, tedy látek specifických pro jednotlivé druhy mléka, jejichž přítomnost může být předmětem důkazu falsifikace. Statisticky významné metabolity mléka byly na základě chemických posunů identifikovány dle dostupné odborné literatury.

Na základě získaných výsledků jsou za druhovou specifitu kravského mléka v případě analýzy kravského mléka s kozím zodpovědné látky butyrát, aminosacharidy, citrát,

methionin, cholin, laktóza, galaktóza-1-fosfát a tyrosin. Pro kozí mléko jsou druhově specifickými metabolity alanin, pyruvát, kreatin, fosfokreatin, kreatinin, ethanolamin, taurin, myo-inositol, oligofruktóza, glycerová kyselina, fosfocholin, askorbát, glukóza-1-fosfát, močovina a fumarát.

Analýzou sady kravského a ovčího mléka byly jako významné metabolity pro mléko kravské vyhodnoceny citrát, laktóza a galaktóza-1-fosfát, 3-methylhistin, oligofruktóza, orotát, fumarát a 6-methyladenin. V případě ovčího mléka výsledky této práce poukazují na specifitu výskytu leucinu, isoleucinu, alaninu, lysinu, methioninu, glutamátu, tyrosinu, taurinu, histidinu či karnitinu, dále uridinu, kreatininu, cholinu, pyruvátu, acetonu, acetátu, hippurátu, glukózy-6-fosfát, ethanolaminu, butyrátu, laktátu a močoviny.

Jak naznačují výsledky, nelze zcela generalizovat, které metabolity kravského mléka jsou obecně zodpovědné za druhovou specifitu, ale závisí to také druhu mléka, s nímž byly vzorky kravského mléka porovnávány. Společnými specifickými metabolity kravského mléka v případě porovnávání s kozími i ovčími vzorky jsou zde citrát, laktóza a galaktóza-1-fosfát. Stejně tak alanin, pyruvát, taurin, kreatinin, ethanolamin, močovina, hippurát, uridin byly identifikovány jako společné specifické látky pro matrice jak kozího, tak i ovčího mléka.

Pro účel odhalení adulterace kozího a ovčího mléka kravským mlékem mohou být jako nejzásadnější považovány zejména metabolity kravského mléka. Látky specifické pro ovčí a kozí mléko by zde však mohly potenciálně sloužit například jako indikátory falšování v rámci kvantitativních analýz.

Za zmínku stojí mimo jiné i metabolity, které byly současně identifikovány jak v kravském, tak kozím nebo ovčím mléce. Jedná se o karnitin a galaktózu v sadách kravského a kozího mléka, a o fosfocholin, lecithin, pyridoxin a galaktózu v případě šetření kravských a ovčích vzorků. Vzhledem ke skutečnosti, že statistická analýza měla za cíl eliminovat látky, které nejsou signifikantně odlišné a specifické pro daný druh mléka, je zde vysoká pravděpodobnost, že se v těchto případech nepodařilo metabolity správně identifikovat, což vytváří prostor pro další výzkum. Za značnou limitaci této práce lze považovat fakt, že mléko je matrice s pestrým zastoupením široké škály látek, z nichž řada doposud nebyla ve vědeckých studiích identifikována a jejichž signály se v NMR spektru také mohou navzájem překrývat, což značně komplikuje vyhodnocování. Identifikace látek pouze na základě odborné literatury tak nemusí být vždy správná. Rovněž vzbuzuje ve výsledcích vážné podezření laktóza, identifikovaná v oblastech 3,94 ppm, 3,96 ppm, 4,45 ppm a 4,67 ppm jako signifikantní metabolit kravského mléka. Laktóza se vyskytuje ve všech třech druzích mléka a v NMR spektru zpravidla dominuje oblasti 3,2-5,3 ppm (Lamanna et al. 2011). Je tedy nepravděpodobné, že se tento sacharid bude významně podílet právě na druhové specifitě kravského mléka a tuto teorii potvrzuje svými výsledky také Lamanna et al. (2011), který porovnával kravské mléko s ovčím. Laktóza byla v obou druzích mlék dle studie Lamanna et al. (2011) podobně zastoupena v množství i se shodným intervalem chemického posunu. V této práci budou tedy možná vyhodnocené významné spektrální oblasti 3,94-3,98 ppm, 4,42-4,50 ppm a 4,66-4,70 ppm skrývat jiné, doposud neidentifikované metabolity s vysokou

signifikancí, na které je žádoucí se v budoucnu zaměřit. Lze diskutovat například o jiných sacharidech, vznikajících vlivem tepleného záhřevu při pasteraci.

Výsledné výstupy této práce byly v některých případech potvrzeny studii zaměřenými na obdobnou tematiku. Výsledky studie Li et al. (2017), jež porovnávala kozí mléko s kravským, se v této práci shodují v případě citrátu a aminosacharidů jako metabolitů specifických pro kravské mléko, a rovněž souhlasí s kreatinem jako látkou specifickou pro kozí mléko. Studie Li et al. (2017) dále identifikovala lecithin a ethanolamin jako významné metabolity pro kravské mléko, což v případě této práce není možno potvrdit, neboť lecithin byl identifikován pouze v sadě kravské - ovčí mléko (a to v obou maticích) a ethanolamin byl identifikován jako signifikantní naopak pouze v kozím mléce. Rovněž se s výsledky neshodují ani acetát a karnitin, které dle Li et al. (2017) dominují v kozím mléce, avšak v případě výsledků této práce byly identifikovány jako látky specifické pro mléko ovčí. Vzniká zde ale prostor pro polemiku ohledně správnosti určení karnitinu v této práci, neboť karnitin byl identifikován v sadě mléka kravské – kozí v obou maticích. Je tedy možné, že v případě karnitinu u kravského mléka nedošlo ke správné identifikaci a karnitin specifickou látkou pro kozí mléko skutečně je. Proto by se karnitinu měla nadále věnovat pozornost, primárně je však nutné provést identifikaci ve specializovaném softwaru či využít ověření pomocí standardů. Také studie Yang et al. (2016) se věnovala identifikaci druhově specifických metabolitů za využití hmotnostní spektrometrie a NMR v několika druzích mléka, včetně kravského a kozího. Podle výsledků vysledovali vyšší koncentraci valinu, kapronové kyseliny, jantarové kyseliny, karnitinu, 3-(uracil-1-yl)-L-alaninu, a uridinu v kozím mléce v porovnání s kravským. Naopak leucin, valin a pyruvát převažovaly v kravském mléce. Karnitin se v tomto případě jako specifická látka pro kozí mléko shoduje s výsledky Li et al. (2017) a ke shodě došlo i v případě této práce u nukleosidu uridinu.

Výsledky analýzy ovčího mléka se z části také shodují se studií Lamanna et al. (2011), která se zabývala stejně jako v případě této práce falšováním ovčího mléka kravským. Shodu ve výsledcích je zde možné sledovat v případě zmíněných aminokyselin, citrátu a laktátu. Další rozdíly mezi kravskou a ovčí maticí byly ve studii detekovány v proteinové frakci, což zde nelze hodnotit, neboť v této práci se pracovalo se vzorky bez bílkovinné a tukové složky.

Výše zmíněné studie také svými výstupy poukazují na známou limitaci NMR, kterou je nízká citlivost metody. Lamanna et al. (2011) svými výsledky kvantifikační analýzy upozornil na nízkou spolehlivost metody pro kvantifikaci (10 %), která je přisuzována zejména genetické variabilitě a dalším faktorům ovlivňujícím složení mléka. Ve studii Li et al. (2017) bylo docíleno detekce 5% naředění kozího mléka kravským, což je oproti jiným analytickým metodám se stejným experimentálním zaměřením nízká hodnota. Například analýza PCR (Hurley et al. 2004) či imunologické metody (López-Calleja et al. 2007) jsou schopny identifikovat 0,1% koncentraci kravského mléka v kozím i ovčím. Srovnatelné výsledky s NMR ohledně meze detekce jsou například u HPLC analýzy. Například Ferreira & Caçote (2003) na základě odlišných retenčních časů  $\beta$ -laktoglobulinů docílili 2% detekčního limitu při přidavku kravského mléka do kozího i ovčího mléka. Veloso et al. (2002) rovněž pomocí RP-HPLC prokázali možnost detekce od 5% zředění kozího mléka kravským dle přítomnosti  $\alpha$ -kaseinu.

V případě výše zmíněných studií založených na testování jiných metod než NMR je však nutné vyzdvihnout fakt, že se zaměřovaly na analýzu bílkovinné frakce, zatímco v této práci byla bílkovinná frakce eliminována a pozornost zde byla zaměřena na detekci jiných metabolitů mléka. V případě analýzy syrovátkových bílkovin navíc nejsou tyto metody aplikovatelné na mléko ošetřené vysokým záhřevem. Ohledně nízké citlivosti NMR metody vyvstává ale také otázka, zda je velmi vysoká citlivost metod v případě odhalování adulterace kozího a ovčího mléka kravským mlékem opravdu nutností. Vědomé falšování kozího a ovčího mléka je totiž primárně motivováno vidinou ekonomického zisku pro výrobce a použití příliš nízkých koncentrací kravského mléka by tak pravděpodobně nepřinášelo kýžený benefit.

V rámci hodnocení výstupů experimentální části této práce je také důležité zmínit oblasti spektra vyhodnocená jako nejvíce statisticky signifikantní, tzn. metabolity v těchto oblastech na základě statistického šetření vykazují nejvýraznější specifitu pro dané druhy mléka. Pro kravské mléko v sadě kravských a kozích analyzovaných matric se jedná téměř o všechny identifikované oblasti chemických posunů, včetně citrátu, aminosacharidů, butyrátu, galaktózy-1-fosfát aj. Pro kozí jsou to například kreatin, fosfokreatin, kreatinin, fosfocholin, askorbát, a také neidentifikovaná oblast spektra 4,38-4,42 ppm. V sadě vzorků kravského a ovčího mléka jde u kravské matrice opět o galaktózu-1-fosfát, 3-methylhistidin, 6-methyladenin či orotát a fumarát, aj. Rovněž neidentifikovaný metabolit v oblasti 8,14-8,18 ppm vykazuje výraznou signifikanci v matrici. V případě ovčího mléka vysoká signifikance odpovídá zejména výše zmíněným aminokyselinám, pyruvátu, karnitinu či hippurátu, taurinu aj. Metabolity ovčího mléka ve spektrální oblasti 5,58-5,66 ppm a 6,58-6,55 ppm byly rovněž generovány s hodnotami výrazné statistické signifikance. Všechny tyto látky se zdají být pro účely odhalování adulterace mléka potenciálně velmi atraktivní a mohly by být inspirací pro další experimenty zabývající se stejnou tematikou. Neidentifikované metabolity ve zmíněných spektrálních oblastech opět vytváří značný prostor pro další zaměření a měla by se jim v budoucnu věnovat pozornost.

Výsledky této práce nastínily existenci řady metabolitů, které jsou pravděpodobně zodpovědné za druhovou specifitu jednotlivých druhů mléka a které by mohly sloužit jako indikátory falšování kozího a ovčího mléka kravským. Na základě úspěšné identifikace těchto látek a shody některých výsledků této práce s dalšími studiemi lze zkonstatovat, že NMR je vhodnou metodou pro definování druhové specifiity, jež je pro odhalení falšování mléka mlékem jiného živočišného druhu zcela zásadní. Dalším nezbytným krokem pro dosažení úspěchu ve výzkumu zabírajícím se touto problematikou je cílená analýza, která mimo jiné také potvrdí či vyvrátí dosavadní výsledky. Metoda  $^1\text{H}$  NMR by mohla být v budoucnu využívána jako rutinní analýza, je rychlá a schopná zpracovávat velká množství vzorků, které nevyžadují složitou přípravu pro analýzu.

## 7 Závěr

Tato práce byla věnována výzkumu metody  $^1\text{H}$  NMR s účelem otestování vhodnosti této metody k odhalování falšování kozího a ovčího mléka kravským mlékem. Analýze NMR byly podrobeny sady vzorků šetrně pasterovaného čistého kravského, kozího a ovčího mléka a následně bylo vzájemně porovnáváno kravské mléko s kozím a kravské mléko s ovčím.

Výsledkem analýzy, statistického šetření a identifikace statisticky významných látek na základě dostupných vědeckých zdrojů byla řada metabolitů odpovědných za druhovou specifitu jednotlivých druhů mlék. V případě sady kravského a kozího mléka zde za specifitu kravského mléka odpovídají látky butyrát, aminosacharidy, citrát, methionin, cholin, laktóza, galaktóza-1-fosfát a tyrosin. Specifickými látkami pro kozí mléko jsou alanin, pyruvát, kreatin, fosfokreatin, kreatinin, ethanolamin, taurin, myo-inositol, oligofruktóza, glycerová kyselina, fosfocholin, askorbát, glukóza-1-fosfát, močovina a fumarát. V případě vzorků kravského a ovčího mléka byly pro kravské mléko identifikovány látky citrát, laktóza a galaktóza-1-fosfát, 3-methylhistin, oligofruktóza, orotát, fumarát a 6-methyladenin. Výsledky analýzy ovčího mléka poukazují na specifitu výskytu leucinu, isoleucinu, alaninu, lysinu, methioninu, glutamátu, tyrosinu, taurinu, histidinu či karnitinu, dále uridinu, kreatininu, cholinu, pyruvátu, acetonu, acetátu, hippurátu, glukózy-6-fosfát, ethanolaminu, butyrátu, laktátu a močoviny. Několik metabolitů se z dostupných vědeckých zdrojů nepodařilo identifikovat.

Na základě zhodnocení dat lze potvrdit, že  $^1\text{H}$  NMR je metoda vhodná pro účel odhalování adulterace kozího a ovčího mléka kravským, do budoucna je však zapotřebí dalšího testování a cílených analýz. Pozornost by měla být věnována zejména metabolitům vykazujícím vysokou signifikanci druhové specifiky a také doposud neidentifikovaným statisticky významným metabolitům.

## 8 Literatura

- Albenzio M, Santillo A, Avondo M, Nudda A, Chessa S, Pirisi A, Banni S. 2016. Nutritional properties of small ruminant food products and their role on human health. *Small Ruminant Research* **135**:3–12. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.016>.
- Anderson PH, Lam NN, Turner AG, Davey RA, Kogawa M, Atkins GJ, Morris HA. 2013. The pleiotropic effects of vitamin D in bone. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **136**:190–194. Elsevier.
- Arsić A, Prekajski N, Vučić V, Tepšić J, Popović T, Vrvic M, Glibetić M. 2009. Milk in human nutrition: Comparison of fatty acid profiles. *Acta Veterinaria* **59**:569–578.
- Azad T, Ahmed S. 2016. Common milk adulteration and their detection techniques. *International Journal of Food Contamination* **3**. *International Journal of Food Contamination*. Available from <http://dx.doi.org/10.1186/s40550-016-0045-3>.
- Ballabio C, Chessa S, Rignanese D, Gigliotti C, Pagnacco G, Terracciano L, Fiocchi A, Restani P, Caroli AM. 2011. Goat milk allergenicity as a function of  $\alpha$ S1-casein genetic polymorphism. *Journal of Dairy Science* **94**:998–1004. Elsevier. Available from <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3545>.
- Balthazar CF et al. 2017. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **16**:247–262.
- Balthazar CF et al. 2021. Trends in Food Science & Technology Nuclear magnetic resonance as an analytical tool for monitoring the quality and authenticity of dairy foods **108**:84–91.
- Balthazar CF, Guimarães JT, Rocha RS, Pimentel TC, Neto RPC, Tavares MIB, Graça JS, Alves Filho EG, Freitas MQ, Esmerino EA. 2020. Nuclear magnetic resonance as an analytical tool for monitoring the quality and authenticity of dairy foods. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier.
- Bansal S, Singh A, Mangal M, Mangal AK, Kumar S. 2017. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**:1174–1189. Taylor & Francis. Available from <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2014.967834>.
- Barlowska J, Szwajkowska M, Litwińczuk Z, Król J. 2011. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **10**:291–302.
- Bertelli D, Lolli M, Papotti G, Bortolotti L, Serra G, Plessi M. 2010. Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**:8495–8501. ACS Publications.
- Bode L. 2015. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development* **91**:619–622. Elsevier Ireland Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>.

- Borková M, Snášelová J. 2005. Possibilities of Different Animal Milk Detection in Milk. *Czech Journal of Food Sciences* **23**:41–50.
- Bramanti E, Sortino C, Onor M, Beni F, Raspi G. 2003. Separation and determination of denatured  $\alpha$ s1-,  $\alpha$ s2-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. *Journal of Chromatography A* **994**:59–74. Elsevier.
- Breton RC, Reynolds WF. 2013. Using NMR to identify and characterize natural products. *Natural Product Reports* **30**:501–524.
- Brincat M, Gambin J, Brincat M, Calleja-Agius J. 2015. The role of vitamin D in osteoporosis. *Maturitas* **80**:329–332. Elsevier.
- Buitenhuis AJ, Sundekilde UK, Poulsen NA, Bertram HC, Larsen LB, Sørensen P. 2013. Estimation of genetic parameters and detection of quantitative trait loci for metabolites in Danish Holstein milk. *Journal of Dairy Science* **96**:3285–3295. Elsevier. Available from <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5914>.
- Calvano CD, De Ceglie C, Monopoli A, Zambonin CG. 2012. Detection of sheep and goat milk adulterations by direct MALDI-TOF MS analysis of milk tryptic digests. *Journal of Mass Spectrometry* **47**:1141–1149.
- Chan E, Griffiths SM, Chan CW. 2008. Public-health risks of melamine in milk products. *The Lancet* **372**:1444–1445.
- Chong J, Yamamoto M, Xia J. 2019. *MetaboAnalystR 2.0: From Raw Spectra to Biological Insights*.
- Čížková H, Ševčík R, Rajchl A, Pivoňka J, Voldřich M. 2012. Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemické Listy* **106**:903–910.
- Cozzolino R, Passalacqua S, Salemi S, Malvagna P, Spina E, Garozzo D. 2001. Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **36**:1031–1037.
- Crowther JR. 2000. *The ELISA guidebook*. Page Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).
- De Hoffmann E. 2000. Mass spectrometry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley Online Library.
- de Moura Ribeiro MV, Borallo N, Pezza HR, Pezza L, Toci AT. 2017. Authenticity of roasted coffee using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis* **57**:24–30. Elsevier.
- Emwas A-H, Roy R, McKay RT, Tenori L, Saccenti E, Gowda GA, Raftery D, Alahmari F, Jaremko L, Jaremko M. 2019. NMR spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites* **9**:123. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Emwas AHM. 2015. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Page Methods in Molecular Biology*.
- Eurostat. 2019. Milk and milk product statistics. Available from [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk\\_and\\_milk\\_product\\_statistics#Milk\\_production](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk_and_milk_product_statistics#Milk_production).



- 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.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020a. Dairy animals. Available from <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/en/>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020b. Dairy Market Review - March 2020. Available from <http://www.fao.org/3/ca8341en/CA8341EN.pdf>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020c. Small ruminants. Available from <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/small-ruminants/en/>.
- Garwolińska D, Hewelt-Belka W, Kot-Wasik A, Sundekilde UK. 2020. Nuclear magnetic resonance metabolomics reveals qualitative and quantitative differences in the composition of human breast milk and milk formulas. *Nutrients* **12**.
- Gaucheron F. 2005. The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development* **45**:473–483. EDP Sciences.
- Gerothanassis IP, Troganis A, Exarchou V, Barbarossou K. 2002. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy: Basic Principles and Phenomena, and Their Applications To Chemistry, Biology and Medicine. *Chem. Educ. Res. Pract.* **3**:229–252.
- Günther H. 2013. *NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry*. John Wiley & Sons.
- Gupta UC, Gupta SC. 2014. Sources and deficiency diseases of mineral nutrients in human health and nutrition: a review. *Pedosphere* **24**:13–38. Elsevier.
- Ha E, Zemel MB. 2003. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *The Journal of Nutritional Biochemistry* **14**:251–258. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286303000305>.
- Hadjipanayiotou M. 1995. Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum of ewes and goats. *Small Ruminant Research* **18**:255–262.
- Hammami M, Dridi S, Zaïdi F, Maâmouri O, Rouissi H, Blecker C, Karoui R. 2013. Use of front-face fluorescence spectroscopy to differentiate sheep milks from different genotypes and feeding systems. *International Journal of Food Properties* **16**:1322–1338. Taylor & Francis.
- Haque E, Bhandari BR, Gidley MJ, Deeth HC, Whittaker AK. 2015. Change in molecular structure and dynamics of protein in milk protein concentrate powder upon ageing by solid-state carbon NMR. *Food Hydrocolloids* **44**:66–70.
- Hepner G, Fried R, St Jeor S, Fusetti L, Morin R. 1979. Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *The American journal of clinical nutrition* **32**:19–24. Oxford University Press.
- Hernández ER, Jácome MM, Lee RG, Nakano T, Ozimek L, Guzman IV. 2007. High conjugated linoleic acid (CLA) content in milk and dairy products using a dietary supplementation of sunflower seed in cows. *Thrombogenic/atherogenic risk issues. Archivos latinoamericanos de nutricion* **57**:173–178.

- Hong E, Lee SY, Jeong JY, Park JM, Kim BH, Kwon K, Chun HS. 2017. Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97**:3877–3896. Wiley Online Library.
- Hu F, Furihata K, Ito-Ishida M, Kaminogawa S, Tanokura M. 2004. Nondestructive observation of bovine milk by NMR spectroscopy: Analysis of existing states of compounds and detection of new compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:4969–4974.
- Hur SJ, Kim HS, Bahk YY, Park Y. 2017. Overview of conjugated linoleic acid formation and accumulation in animal products. *Livestock Science* **195**:105–111. Elsevier.
- Hurley IP, Coleman RC, Ireland HE, Williams JHH. 2004. Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. *Journal of Dairy Science* **87**:543–549. Elsevier. Available from [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73195-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73195-1).
- Jandal JM. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **22**:177–185.
- Kamal M, Karoui R. 2015. Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends in Food Science and Technology* **46**:27–48. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.007>.
- Kandpal SD, Srivastava AK, Negi KS. 2012. Estimation of quality of raw milk (Open & branded) by milk adulteration testing kit.
- Kazakevich Y V, Lobrutto R. 2007. HPLC for pharmaceutical scientists. John Wiley & Sons.
- Keeler J. 2006. Understanding NMR spectroscopy. *Choice Reviews Online* **43**:43-5896-43-5896.
- Klein MS, Almstetter MF, Schlamberger G, Nürnberger N, Dettmer K, Oefner PJ, Meyer HHD, Wiedemann S, Gronwald W. 2010. Nuclear magnetic resonance and mass spectrometry-based milk metabolomics in dairy cows during early and late lactation. *Journal of Dairy Science* **93**:1539–1550. Elsevier. Available from <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2563>.
- Korhonen H, Pihlanto-Leppälä A, Rantamäki P, Tupasela T. 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and Technology* **9**:307–319.
- Korhonen H, Pihlanto A. 2003. Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design* **9**:1297–1308.
- Kuballa T, Brunner TS, Thongpanchang T, Walch SG, Lachenmeier DW. 2018. Application of NMR for authentication of honey, beer and spices. *Current Opinion in Food Science* **19**:57–62. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.007>.
- Kuchtík J, Šustová K, Milerský M. 2011. Ovčí mléko – minoritní, ale zajímavý produkt. *Výživa a potraviny* **66**:46–49.
- Kumar S, Kumar B, Kumar R, Kumar S, Khatkar SK, Kanawjia SK. 2012. Nutritional Features of Goat Milk — A Review. *Indian Journal of Dairy Science* **65**:266–273. Available from <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IJDS/article/view/25762>.

- Laben RL, Shanks R, Berger PJ, Freeman AE. 1982. Factors Affecting Milk Yield and Reproductive Performance. *Journal of Dairy Science* **65**:1004–1015.
- Lamanna R, Braca A, Di Paolo E, Imperato G. 2011. Identification of milk mixtures by <sup>1</sup>H NMR profiling. *Magnetic Resonance in Chemistry* **49**.
- Lambert JB, Mazzola EP, Ridge CD. 2019. Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods. John Wiley & Sons.
- Lara-Villoslada F, Olivares M, Xaus J. 2005. The balance between caseins and whey proteins in cow's milk determines its allergenicity. *Journal of Dairy Science* **88**:1654–1660. Elsevier. Available from [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72837-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72837-X).
- Law AJR. 1995. Heat denaturation of bovine, caprine and ovine whey proteins. *Milchwissenschaft (Germany)*.
- 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.
- Löffler M, Carrey EA, Zameitat E. 2015. Orotic Acid, More Than Just an Intermediate of Pyrimidine de novo Synthesis. *Journal of Genetics and Genomics* **42**:207–219.
- López-Aliaga I, Diaz-Castro J, Alférez MJM, Barrionuevo M, Campos MS. 2010. A review of the nutritional and health aspects of goat milk in cases of intestinal resection. *Dairy Science and Technology* **90**:611–622.
- López-Calleja I, González I, Fajardo V, Rodríguez MA, Hernández PE, García T, Martín R. 2004. Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. *Journal of Dairy Science* **87**:2839–2845.
- Manso MA, López-Fandiño R. 2004. K-Casein macropeptides from cheese whey: Physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International* **20**:329–355.
- Marseglia A, Caligiani A, Comino L, Righi F, Quarantelli A, Palla G. 2013. Cyclopropyl and  $\omega$ -cyclohexyl fatty acids as quality markers of cow milk and cheese. *Food Chemistry* **140**:711–716. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613000514>.
- Martin P, Ferranti P, Leroux C, Addeo F. 2003. NON-BOVINE CASEINS: QUANTITATIVE VARIABILITY AND MOLECULAR DIVERSITY **1**.
- Marventano S, Kolacz P, Castellano S, Galvano F, Buscemi S, Mistretta A, Grosso G. 2015. A review of recent evidence in human studies of n-3 and n-6 PUFA intake on cardiovascular disease, cancer, and depressive disorders: does the ratio really matter? *International journal of food sciences and nutrition* **66**:611–622. Taylor & Francis.
- Mills S, Ross RP, Hill C, Fitzgerald GF, Stanton C. 2011. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *International Dairy Journal* **21**:377–401. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.12.011>.
- Ministerstvo zemědělství České republiky. 2018. Situační a výhledová zpráva. Available from [http://eagri.cz/public/web/file/590782/Ovce\\_kozy\\_2018\\_Web.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/590782/Ovce_kozy_2018_Web.pdf).

- Mir Z, Goonewardene LA, Okine E, Jaegar S, Scheer HD. 1999. Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain fatty acids in goats milk. *Small Ruminant Research* **33**:137–143.
- Monakhova YB, Ruge W, Kuballa T, Ilse M, Winkelmann O, Diehl B, Thomas F, Lachenmeier DW. 2015. Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Food Chemistry* **182**:178–184. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615003350>.
- Nascimento CF, Santos PM, Pereira-Filho ER, Rocha FRP. 2017. Recent advances on determination of milk adulterants. *Food Chemistry* **221**:1232–1244. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.034>.
- Ntakatsane MP, Yang XQ, Lin M, Liu XM, Zhou P. 2011. Suitability of fluorescence spectroscopy for characterization of commercial milk of different composition and origin. *Journal of dairy science* **94**:5375–5380. Elsevier.
- Ohmenhaeuser M, Monakhova YB, Kuballa T, Lachenmeier DW. 2013. Qualitative and quantitative control of honeys using NMR spectroscopy and chemometrics. *International Scholarly Research Notices* **2013**. Hindawi.
- Osman AA, Aradaib IE, Musa OA. 2013. Detection of caprine-specific nucleic acid sequences in goat milk using polymerase chain reaction. *Materia socio-medica* **25**:105. The Academy of Medical Sciences of Bosnia and Herzegovina.
- Park Y. 2017. Goat Milk – Chemistry and Nutrition - Nutritional and Chemical Composition of Goat Milk. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals, Second Edition*:34–58.
- Park YW, Haenlein GFW. 2007. Goat milk, its products and nutrition. *Handbook of food products manufacturing* **2**:449–488. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- Park YW, Haenlein GFW, Wendorff WL. 2006. *Handbook of milk of non-bovine mammals*. Wiley Online Library.
- 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. Elsevier. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>.
- 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. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.045>.
- Petrakis EA, Cagliani LR, Polissiou MG, Consonni R. 2015. Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by <sup>1</sup>H NMR metabolite fingerprinting. *Food Chemistry* **173**:890–896. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614016707>.
- Pludowski P, Holick MF, Grant WB, Konstantynowicz J, Mascarenhas MR, Haq A, Povoroznyuk V, Balatska N, Barbosa AP, Karonova T. 2018. Vitamin D supplementation guidelines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **175**:125–135. Elsevier.
- 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.

- Potraviný Info. 2019. Konsolidované znění nařízení (ES) č. 178/2002. Available from <https://www.potravinynfo.cz/33/178-2002-narizeni-evropskeho-parlamentu-a-rady-es-kterym-se-stanovi-obecne-zasady-a-pozadavky-potravinoveho-prava-zrizuje-se-evropsky-urad-pro-bezpecnost-potravin-a-stanovi-postupy-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EtI668NLI3LvCQ>.
- Ralli E, Amargianitaki M, Manolopoulou E, Misiak M, Markakis G, Tachtalidou S, Kolesnikova A, Dais P, Spyros A. 2018. NMR spectroscopy protocols for food metabolomics applications. *Methods in Molecular Biology* **1738**:203–211.
- Rassin DK, Sturman JA, Gaull GE. 1978. Taurine and other free amino acids in milk of man and other mammals. *Early Human Development* **2**:1–13.
- Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard P, Guillet I, Chilliard Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research* **79**:57–72.
- Sanchez LJ, Zhu D, Frew R, Kebede B. 2021. Optimization of nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry-based fingerprinting methods to characterize goat milk powder. *Journal of Dairy Science* **104**:102–111. American Dairy Science Association. Available from <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-18467>.
- 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. Elsevier.
- Santos PM, Pereira-Filho ER, Rodriguez-Saona LE. 2013. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food chemistry* **138**:19–24. Elsevier.
- Scano P, Murgia A, Pirisi FM, Caboni P. 2014. A gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomic approach for the characterization of goat milk compared with cow milk. *Journal of Dairy Science* **97**:6057–6066. Elsevier. Available from <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8247>.
- Segato S, Caligiani A, Contiero B, Galaverna G, Bisutti V, Cozzi G. 2019. <sup>1</sup>H NMR metabolic profile to discriminate pasture based alpine asiago PDO cheeses. *Animals* **9**:1–11.
- Siciliano R, Rega B, Amoresano A, Pucci P. 2000. Modern mass spectrometric methodologies in monitoring milk quality. *Analytical Chemistry* **72**:408–415.
- Singuluri H. 2014. Milk Adulteration in Hyderabad, India – A Comparative Study on the Levels of Different Adulterants Present in Milk. *Journal of Chromatography & Separation Techniques* **05**:1–3.
- Smiddy MA, Huppertz T, van Ruth SM. 2012. Triacylglycerol and melting profiles of milk fat from several species. *International Dairy Journal* **24**:64–69. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.07.001>.
- Sobolev AP, Thomas F, Donarski J, Ingallina C, Circi S, Cesare Marincola F, Capitani D, Mannina L. 2019. Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. *Trends in Food Science and Technology* **91**:347–353.
- Song H, Xue H, Han Y. 2011. Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. *Food Control* **22**:883–887. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.019>.

- Sousa YRF, Medeiros LB, Pintado MME, Queiroga RCRE. 2019. Goat milk oligosaccharides: Composition, analytical methods and bioactive and nutritional properties. *Trends in Food Science and Technology* **92**:152–161. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.052>.
- Špoljarić J, Mikulec N, Plavljančić D, Radeljević B, Havranek J, Antunac N. 2013. Proving the adulteration of ewe and goat cheeses with cow milk using the reference method of isoelectric focusing of  $\gamma$ -casein. *Mljekarstvo* **63**:115–121.
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 2015. Prezentace SZPI v Poslanecké sněmovně Parlamentu ČR: Falšování potravin - aktuální problém? Available from <https://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1096807&docType=ART&nid=11343>.
- Sundekilde U, Larsen L, Bertram H. 2013. NMR-Based Milk Metabolomics. *Metabolites* **3**:204–222.
- Thomas DL, Berger YM, McKusick BC. 2001. Effects of breed, management system, and nutrition on milk yield and milk composition of dairy sheep. *Journal of Animal Science* **79**:E16.
- Tripaldi C, Martillotti F, Terramocchia S. 1998. Content of taurine and other free amino acids in milk of goats bred in Italy. *Small Ruminant Research* **30**:127–136.
- Veloso ACA, Teixeira N, Ferreira IMPLVO. 2002. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis: Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A* **967**:209–218.
- Whetstine MEC, Drake MA. 2008. Flavor Characteristics of Goat Milk and Other Minor Species Milk Products. *Handbook of milk of non-bovine mammals*:107. Wiley Online Library.
- Yadav AK, Singh J, Yadav SK. 2016. Composition, nutritional and therapeutic values of goat milk: A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research* **35**:96–102.
- Yang Y et al. 2016. Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals. *Journal of Proteomics* **136**:174–182. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.12.031>.
- Zachar P, Šoltés M, Kasarda R, Novotný J, Novíkmecová M, Marcinčáková D. 2011. Analytical methods for the species identification of milk and milk products. *Mljekarstvo* **61**:199–207.
- Zákon č. 110/1997 Sb., *o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů*.
- Zákon č. 89/2012 Sb., *občanský zákoník, ve znění pozdějších předpisů*.
- Zhao Y, Chen H, Feng J, Chen Z, Cai S. 2017. 1H NMR-based compositional identification of different powdered infant formulas. *Food Chemistry* **230**:164–173. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.020>.
- Zhu D, Kebede B, Chen G, McComb K, Frew R. 2020. Changes in milk metabolome during the lactation of dairy cows based on 1H NMR and UHPLC–QToF/MS. *International Dairy Journal* **111**:104836. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104836>.

