



číslo metodiky: 1920222-V4

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Detekce falšování kozího mléka kravským mlékem metodou ^1H NMR

Lucie Rysová, Zuzana Pacáková, Oto Hanuš, Veronika Legarová, Jaroslav Havlík,
Anna Mascellani Bergo, Hana Nejeschlebová, Irena Němečková

ISBN: 978-80-213-3143-3

Listopad 2021

Vydavatel:

Pro: Českou zemědělskou univerzitu v Praze a Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. vydala
Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha - Suchbát

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce: <https://metodiky.agrobiologie.cz/>

1. Vydání 2021

ISBN: 978-80-213-3143-3

Autorský kolektiv:

Ing. Lucie Rysová¹
Ing. Zuzana Pacáková, Ph.D.²
prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.³
Ing. Veronika Legarová, Ph.D.¹
doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.¹
MSc. Anna Mascellani Bergo¹
Mgr. Hana Nejšlechbová³
Ing. Irena Němečková, Ph.D.³

¹Katedra kvality a bezpečnosti potravin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze

²Katedra statistiky, Provozně ekonomická fakulta, Česká zemědělská univerzita v Praze

³Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

- 1) Odborník z daného oboru: RNDr. Hana Navrátilová, Ph.D.; Státní zemědělská a potravinářská inspekce
- 2) Pracovník státní správy: MVDr. Sylva Havelková; Státní veterinární správa

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu MZe NAZV Země QK1920222 s názvem: „Nové spolehlivé metody detekce falšování koziho mléka a ovčího mléka a mléčných výrobků“.

Obsah

1. Současný stav problematiky	4
2. Cíl certifikované metodiky	5
3. Vlastní popis metodiky	5
3.1 Princip metody	5
3.2 Potřebný materiál a chemikálie	5
3.3 Přístrojové vybavení a software	5
3.4 Pracovní postup	6
3.5 Vlastní výzkum a vývoj certifikované metodiky	9
3.6 Závěrečné shrnutí	20
4. Srovnání „novosti postupů“	21
5. Popis uplatnění metodiky	22
6. Ekonomické aspekty	23
7. Seznam použité související literatury	24
8. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány	26
9. Jména oponentů a názvy jejich organizací	28
10. Přílohy	29

1. Současný stav problematiky

Falšování je obecně rozšířená lidská činnost motivovaná komerčními zájmy, vedoucí obvykle k prisouzení neadekvátní hodnoty za domnělou kvalitu. Nejinak je tomu v mlékařském sektoru. Pojem falšování mléka definoval Ola (2015) ve své studii jako odstranění nebo nahrazení mléčných složek, které mohou být nahrazeny cizorodými látkami bez vědomí kupujícího. Mezi tyto cizorodé látky lze zařadit vodu, mléko jiného živočišného druhu, syrovátku, škrob, hydroxid sodný, formaldehyd, syntetické mléko, melamin, nemléčné bílkoviny, hovězí lůj, vepřové sádlo atd. Hlavním cílem falšování je převážně ekonomický profit plynoucí nejčastěji z navýšení objemu, nebo z navýšení obsahu složek mléka, které podléhají zpeněžení, konkrétně obsah tuku a bílkovin.

A právě navýšením objemu mlékem jiného živočišného druhu si mohou neoprávněně přilepšovat chovatelé malých přežvýkavců, kteří zároveň chovají i skot a soustředí se na mléčnou produkci. K tomuto falšování mléka podněcuje zvláště fakt, že kravské mléko v porovnání s kozím mlékem je celoročně dostupné a levnější. Nutno podotknout, že toto falšování nemusí být realizováno pouze s vidinou většího ekonomického profitu, ale také kvůli přijatelnějším senzoričtým vlastnostem. Kravské mléko totiž z části potlačí typickou chuť a vůni kozího mléka. I přestože nejsou použity žádné chemikálie, ale pouze jiný živočišný druh mléka, dopad na veřejné zdraví může být fatální, a to především pro tu část populace, která trpí alergií na bílkovinu kravského mléka a po pozření mléka tohoto druhu u ní mohou nastat kožní, gastrointestinální, respirační potíže nebo dokonce anafylaktický šok (Golinelli et al., 2014; Ewida and Abd El-Magiud, 2018).

I přesto, že mléko představuje jednu z nejvíc komplexních potravin na světě, popisem, vývojem a hodnocením četných analytických metod sloužících k detekci cizorodého druhu mléka se zabývalo hned několik vědeckých prací (Ferreira et al., 2007; Pesic et al., 2011; Ren et al., 2014; Trimboli et al., 2019; Tsakali et al., 2019; Teixeira et al., 2020). Nejčastěji se jednalo o postupy založené na analýze DNA, své uplatnění našly i imunochemické metody ELISA, infračervená spektroskopie v blízké i celé středové oblasti infračerveného záření, chromatografické metody s různými typy detektorů nebo elektromigrační metody. Detekční limity výše zmíněných analytických metod jsou různé, většina z nich je schopna detekovat 5 % a více mléka jiného živočišného druhu, což lze považovat za dostačující vzhledem ke skutečnosti, že falsifikace pod 10 % nepřináší jeho protagonistům očekávaný ekonomický profit. Nicméně, melaminové incidenty týkající se nejen mléčného sektoru z let 2007 a 2008 ukázaly, kam až může sahát vynalézavost podvodníků (Anděl & Dlouhý 2009). Melamin

tenkrát totiž nefiguroval na seznamu potenciálních kontaminantů, a tak jeho detekce nebyla zahrnuta do běžných rutinních kontrol. Právě proto je důležité nepřetržitě rozvíjet analytické metody hodnotící autenticitu potravin, které budou i nadále udržovat jejich bezpečnost a kvalitu na stále vysokém evropském standardu.

2. Cíl certifikované metodiky

Cílem certifikované metodiky je detekovat falšování kozího mléka kravským mlékem metodou protonové nukleární magnetické rezonance (NMR). V souvislosti s touto metodikou jsou taktéž zveřejněny markery jednotlivých druhů mléka a jejich změny při různém procentu falšování sloužící pro odhalování případných komerčních, neetických manipulací v mlékařské praxi pro zajištění korektnosti mléčného potravinového řetězce.

3. Vlastní popis metodiky

3.1 Princip metody

Pomocí protonové nukleární magnetické rezonance s použitím rutinní pulsní sekvence *noesypr1d* pro kapalně vzorky je získáno spektrum nízkomolekulárních látek nacházející se v kravském a kozím mléku. Stěžejní roli hrají především aminosacharidy, konkrétně N-acetylglukosamin a N-acetylgalaktosamin, které byly na základě výzkumu vyhodnoceny jako spolehlivé a robustní biomarkery sloužící pro ověření autenticity kozího mléka. Výstupem analýzy jsou integrály relativní intenzity výše zmíněných aminosacharidů. Limit detekce kravského mléka v kozím mléku je $> 5\%$. Metoda je aplikovatelná na konzumní mléko, které bylo tepelně ošetřeno šetrnou nebo vysokou pasterací.

3.2 Potřebný materiál a chemikálie

- Centrifugační zkumavky o objemu 15 ml
- Centrifugační mikrozkušavky o objemu 1,5 ml
- NMR zkumavky
- Chloroform obsahující ethanol jako stabilizátor (1 %)
- Fosfátový pufr (1,5 M K_2HOP_4 a NaH_2PO_4 rozpuštěných v D_2O ; 5 mM 3-(trimethylsilyl)propionát sodný (TSP); 0,2% NaN_3 ; pH 7,4)

3.3 Přístrojové vybavení a software

- Orbitální třepačka
- Laboratorní centrifuga s vhodným rotorem na 15 ml a 1,5 ml zkumavky
- Pipety od 20 μl do 5 ml

- Spektrometr Bruker Avance III HD 500 MHz vybavený 5-mm BBFO sondou (broad-band fluorine observation (Bruker BioSpin, Německo)) a softwarem Topspin, nebo podobný
- Program MestReNova (Mestrelab Research, Španělsko), nebo podobný
- Program Microsoft Office: MS Excel (Microsoft Corporation, USA)

3.4 Pracovní postup

Odběr vzorku mléka

Odebrány jsou minimálně 4 ml zhomogenizovaného vzorku mléka, s tím, že 2 ml jsou použity pro hlavní analýzu a další 2 ml slouží jako rezerva. Preprava je vždy zajištěna při teplotě $<4\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby nedošlo k rozvoji patogenních mikroorganismů a následné produkci nízkomolekulárních látek, které by mohly znehodnotit analýzu. Po odebrání je vzorek mléka v co nejkratší době připraven a podroben analýze na NMR.

Příprava vzorku pro analýzu NMR

1. Do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml se odpipetují 2 ml řádně zhomogenizovaného mléka,
2. za účelem odstranění tukové fáze jsou přidány 2 ml chloroformu, který je stabilizovaný ethanolem,
3. následně se centrifugační zkumavka po dobu 1 minuty řádně homogenizuje pomocí homogenizátoru,
4. nyní je zapotřebí oddělit tukovou část, centrifugační zkumavka je vložena do centrifugy a centrifuguje se po dobu 15 minut při relativní centrifugační síle $18\,000 \times g$ při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,
5. po centrifugaci je z horní části odebráno 720 μl supernatantu do centrifugační mikrozkušavky o objemu 1,5 ml, přidá se také 80 μl fosfátového pufru (1,5 M K_2HOP_4 a NaH_2PO_4 rozpuštěných v D_2O ; 5 mM TSP (3-(trimethylsilyl)propionát sodný); 0,2% NaN_3 ; pH 7,4), obsah se důkladně protřepává po dobu 1 minuty,
6. centrifugační mikrozkušavka je poté vložena do centrifugy a centrifuguje se po dobu 15 minut při relativní centrifugační síle $24\,400 \times g$ při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,
7. z mikrozkušavky z horní části je odebráno 600 μl supernatantu, který je odpipetován do NMR zkumavky. Před samotnou analýzou na spektrometru je zkontrolována čistota NMR zkumavek, která je velmi důležitá pro správné

proběhnutí experimentu, v případě, že je povrch zašpiněn, očistí se vatou a ethanolem,

8. během celé přípravy vzorku je nutností dodržovat základní pravidla bezpečnosti práce v laboratoři a používat žádoucí laboratorní ochranné pomůcky, vzhledem k toxicitě použitých chemikálií probíhá příprava vzorku v digestoři.

Analýza vzorků na NMR

Pro analýzu vzorku je využit spektrometr Bruker Avance III HD (500,23 MHz; Bruker BioSpin, Německo) vybavený 5-mm BBFO sondou (broad-band fluorine observation). Ke snímání spekter je použita rutinní pulsní sekvence *noesypr1d* pro kapalně vzorky s potlačením signálu vody s využitím softwaru Topspin pro řízení spektrometru, manipulaci se vzorky, sběr a zpracování NMR dat. Snímání spekter probíhá za následujících podmínek: relaxační prodleva – 1 s; akviziční čas – 4,00 s; směřovací čas – 100 ms; šířka spektra – 16 ppm; více než 32K datových bodů je získáno pomocí 128 skenů a 4 dummy skeny pro ustálení stavu. Prostřednictvím automatického lock, ladění, shimování a kalibrace 90° pulsu dle standardních rutin od společnosti Bruker jsou optimalizovány podmínky získávání experimentů. Na signály volné precese (FID) je před Fourierovou transformací (FT) použit line broadening 0,3 Hz. Signál je manuálně fázován a spektrum je referencováno na TSP (0,00 ppm). Nastavení se může lišit podle použitého přístrojového vybavení.

Zpracování dat

Naměřená vodíková spektra jsou exportována do programu MestReNova a upravena pomocí šablony s tímto nastavením*:

- Group delay: linear phase shift,
- apodization: 0,3 Hz,
- zero filling – spectrum size: 62536,
- phase correction: imported.

* Nastavení se může lišit podle použitého programu.

Takto upravená spektra jsou exportována jako skript NMR CSV Matrix (*.csv*.txt). do MS Excel (Microsoft Corporation, USA), ve kterém jsou pro účely výpočtu integrálu aminosacharidů vybrány dvě oblasti v rozsahu: -0,015 až 0,015 ppm (TSP); 2,04 až 2,09 ppm (rozmezí aminosacharidů). U těchto oblastí je upravena základní linie pomocí polynomické funkce nultého stupně, a poté jsou spočteny integrály píku reprezentujícího TSP (- 0,015 až 0,015 ppm) a píku reprezentujícího N-acetylglukosamin a N-acetylgalaktosamin

(2,05497 až 2,06793 ppm). Závěrem je provedena normalizace integrálu N-acetylglukosaminu a N-acetylgalaktosaminu na integrál TSP. Získaný integrál relativní intenzity dvou aminosacharidů je posouzen dle uvedených hodnot níže.

Vyhodnocení

Na základě příslušného výzkumu, který předkládáme v kapitole 3.5, byly stanoveny meze, které odpovídají integrálům relativní intenzity zvolených biomarkerů kravského mléka pro různé tepelné ošetření mléka. Příslušné meze uvádíme v Tabulce 1 a 2. Ke stanoveným mezím byla vypočtena i přesnost, se kterou je možné kravské mléko v kozím mléku detekovat. V případě vysoké pasterace je možné detekovat 5 % kravského v mléka s 85% přesností a s 87% přesností v případě šetrné pasterace. Příměs 10 % kravského mléka lze poté detekovat s téměř 100% přesností, a to s 96% přesností v případě vysoké pasterace a 98% přesností v případě šetrné pasterace. Vzhledem ke skutečnosti, že většina falšování kozího mléka kravským mlékem se pohybuje v rozmezí 10 % až 50 %, lze výše zmíněné přesnosti považovat za velmi dobré. V případě, že meze uvedené v Tabulce 1 a 2 pro 5% příměsi nebudou překročeny, doporučujeme přistoupit k dalším analytickým metodám jako jsou chromatografické, imunochemické anebo elektroforetické, které jsou schopny detekovat pod 1 % kravského mléka.

Tabulka 1 Meze pro identifikaci čistého kravského mléka a s příměsí kravského mléka v kozím mléku, které bylo podrobeno vysoké pasteraci

Identifikace vzorku	Mez ¹
Příměs 5 %	> 0,060
Příměs 10 %	> 0,072
Čisté kravské mléko	> 0,337

¹integrál relativní intenzity dvou aminosacharidů

Tabulka 2 Meze pro identifikaci čistého kravského mléka a s příměsí kravského mléka v kozím mléku, které bylo podrobeno šetrné pasteraci

Identifikace vzorku	Mez ¹
Příměs 5 %	> 0,045
Příměs 10 %	> 0,055
Čisté kravské mléko	> 0,150

¹integrál relativní intenzity dvou aminosacharidů

V rámci našeho výzkumu (kapitola 3.5) byly taktéž vyhodnoceny meze, prostřednictvím kterých je možné rozlišit, zdali se jedná o 5% nebo 10% příměs kravského mléka v kozím mléku. Meze byly stanoveny pro vysokou i šetrnou pasteraci a jsou uvedeny v Tabulce 3. V případě, že je stanovená mez překročena, jedná se o kozí mléko, kde je 10% příměs kravského mléka. Ke stanoveným mezím byla opět vypočtena i přesnost, s jakou je možné tyto

dvě příměsi rozlišit. V případě vysoké pasterace je možné 5% a 10% příměs rozlišit s 83% přesností, u šetrné pasterace je pak možné příměsi rozlišit se 79% přesností.

Tabulka 3 Meze pro rozlišení 5% a 10% příměsi kravského mléka v kozím mléku

Mez ¹ určená pro mléko, které bylo ošetřeno vysokou pasterací	> 0,086
Mez ¹ určená pro mléko, které bylo ošetřeno šetrnou pasterací	> 0,070

¹integrál relativní intenzity dvou aminosacharidů

Meze určené pro rozlišení 5% a 10% příměsi kravského mléka v kozím mléku mohou být uplatněny v případě, že se potvrdí falšování koziho mléka. Pomocí těchto mezí lze určit obsah příměsi, a tudíž více specifikovat závěr analýzy.

Robustnost metody

NMR je všeobecně považována za robustní metodu, což dokazuje i vědecká literatura (Piccinonna et al., 2016), i přesto je nutné zdůraznit kritické kroky, jejichž dodržení je zásadní pro získání správnosti výsledků:

- Během přepravy vzorků mléka by neměla teplota skladování přesáhnout 4 °C,
- dbát na důkladnou přípravu vzorku, která zajistí eliminaci nežádoucích posunů píků ve spektru,
- zajištění správné optimalizace přístroje zahrnující kontrolu výběru pulzní sekvence včetně dalšího nastavení experimentu.

3.5 Vlastní výzkum a vývoj certifikované metodiky

Průzkum terénu a výběr mléčných plemen

Na začátku roku 2019 byl proveden průzkum terénu mléčných farem skotu a koz v Olomouckém, Moravskoslezském a Zlínském kraji podle plemen, doживosti, technologie, ale i lokalizace pro možnost řešení dopravního problému pro vzorkování mléka. Do experimentu bylo zařazeno 6 stád dojnic a 6 stád koz. Vybraná stáda se nacházela v nadmořské výšce: krávy 339±100 m (od 227 m do 474 m); kozy 337±89 m (od 240 m do 474 m). Plemenný profil jednotlivých stád vykazoval následující relativní plemenné zastoupení – stáda dojnic: 83 % holštýnské a 17 % české strakaté; stáda koz: 59 % bílá krátkosrstá koza, 29 % hnědá krátkosrstá koza, 12 % anglonúbijská koza. Výběr plemen se odvíjel od typického profilu dojených krav a koz v České republice (Kvapilík et al., 2019; Bucek et al., 2019).

Odběr vzorků

Odběr vzorků mléka určený pro vývoj nové metodiky byl rozložen do dvou let. První odběry proběhly v roce 2019. Během vzorkování byly zohledněny jednak termíny odstavu mláďat u malých přežvýkavců, dále fyziologický fakt změn složení mléka s laktací, a také skutečnost poklesu dojivosti během léta u koz. Tudíž bylo vzorkováno dvakrát během května (první polovina laktace) a dvakrát během srpna (druhá polovina laktace). Během roku bylo tímto způsobem odebráno 23 vzorků čistého kravského mléka a 23 vzorků čistého kozího mléka. V roce 2020 proběhlo obdobné vzorkování, odebráno bylo 24 vzorků čistého kravského mléka a 24 vzorků čistého kozího mléka.

Krom vzorků, které sloužily pro vývoj metodiky a interní validaci, byla zakoupena i konzumní mléka v malých i velkých supermarketech a na farmářských trzích. Tyto vzorky posloužily jako data set pro externí validaci.

Analýza základních mléčných charakteristik čistých mlék

Při vývoji metodiky určené pro detekci falsifikace mléka je velmi významné metodicky uvést podmínky, za kterých metoda vznikla a ověřit vhodnost testovaného souboru. Z toho důvodu byly získané vzorky čistého kravského a kozího mléka analyzovány v laboratořích Výzkumného ústavu mlékárenského, s.r.o. základními mlékařskými analytickými metodami. Stanoveny byly následující mléčné ukazatele: celkový počet mezofilních mikroorganismů (KTJ/ml); počet somatických buněk (tisíc/ml); obsah tuku (g/100 ml) pro kravské a kozí mléko (objemová %); obsah hrubých bílkovin (g/100g); obsah kaseinu (g/100 g); obsah monohydrátu laktózy (g/100 g); obsah sušiny tukuprosté (g/100 g); koncentrace močoviny (mg/100 ml); obsah sušiny celkové (g/100 g); bod mrznutí mléka hodnota (°C); aktivní kyselost (pH); titrační kyselost (dle Soxhlet-Henkela, SH); syřitelnost jako 1) čas koagulace mléka syřidlem v sekundách (čas), jako 2) pevnost sýřeni (pevnost) v cm jako opačná hodnota, jako 3) kvalita sýřeni aspekty a palpací ve třídách 1 výborná až 4 nejhorší, a jako 4) objem vypuzené syrovátky v ml; kysací schopnost mléka (dle Soxhlet-Henkela, SH) a počet streptokoků a laktobacilů po fermentaci v (KTJ/ml). Přístrojové vybavení a související literární podklady k těmto analýzám jsou uvedeny v Příloze č. 1.

Falšování kozího mléka

Kozí mléko bylo porušeno kravským mlékem v poměrech uvedených v Tabulce 4. Dále byly připraveny binární směsi obsahující 20 %, 40 %, 60 %, 80 % kravského mléka, jejichž

integrály relativní intenzity vybraných aminosacharidů byly využity při externí validaci. Tyto binární směsi byly připraveny ze zakoupených vzorků mlék v tržní síti v České republice.

Tabulka 4 Poměry kravského a koziho mléka při falšování – základní škála

Kravské (%)	Objem (ml)	Kozí (%)	Objem (ml)
0	0	100	250
1	2,5	99	247,5
5	12,5	95	237,5
10	25	90	225
100	250	0	0

Tepelné ošetření mléka

Odebrané čisté vzorky kravského a koziho mléka a taktéž vzorky koziho mléka, které byly porušeny kravským mlékem (rok 2019), byly pasterovány vsádkovým způsobem ve vodní lázni k dosažení $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 až 2 sekund (vysoká pasterace). Vysoká pasterace se standardně využívá v České republice k ošetření konzumního mléka, proto byla zvolena v prvním roce. Syrové mléko nesmí být v tržní síti České republiky prodáváno, zakoupit ho lze pouze v případě „Prodeje ze dvora“. V roce 2020 byl zvolen jiný typ tepelného ošetření, konkrétně šetrná pasterace při teplotě $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Důvodem výběru bylo testování stability biomarkerů při změně tepelného ošetření, výběr tohoto tepelného ošetření některými farmáři, a také využití mléka ošetřeného šetrnou pasterací pro sýrařské účely. Všechny zchlazené čisté i falšované vzorky mléka byly následně přemístěny do laboratoří České zemědělské univerzity, kde byly podrobeny dalším analýzám.

Příprava vzorku pro NMR

Viz výše (str. č. 6).

Analýza vzorků na NMR

Viz výše (str. č. 7).

Zpracování NMR dat

Naměřená vodíková spektra čistého kravského a koziho mléka byla následně zpracována dvěma způsoby. Pro účely identifikace charakteristických biomarkerů kravského mléka, byla spektra převedena do softwaru MestReNova 14.0.1 (Mestrelab Research, Španělsko), kde byla provedena korekce základní linie (tzv. baseline) pomocí algoritmu Splines a exponenciální potlačení šumu ($0,3\text{ Hz}$). Rovněž byly odstraněny nežádoucí signály vody ($4,7\text{--}4,98\text{ ppm}$) a ethanolu ($1,02\text{--}1,3$ a $3,66\text{--}3,77\text{ ppm}$). Spektra byla poté normalizována na průměrnou intenzitu vnitřního standardu a redukována na 232 binů o velikosti $0,04\text{ ppm}$. Takto připravený soubor

byl zpracován multivariační statistickou analýzou v online nástroji MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>; Chong et al., 2019). Pro vyhodnocení nejlepšího diskriminujícího biomarkeru byly použity FT spektrální datové body čtyř píků nacházející se v kravském mléku. FT spektrální datové body byly exportovány opět z programu MestReNova 14.0.1 s korekcí šumu (0,3 Hz) a zarovnáním do MS Excel (Microsoft Corporation, USA), ve kterém byla u zvolených oblastí píků upravena základní linie pomocí polynomické funkce nultého stupně, poté byly píky integrovány a integrální hodnoty byly normalizovány na integrál TSP. Takto získaný datový soubor byl dále statisticky vyhodnocen multivariační a univariační statistickou analýzou.

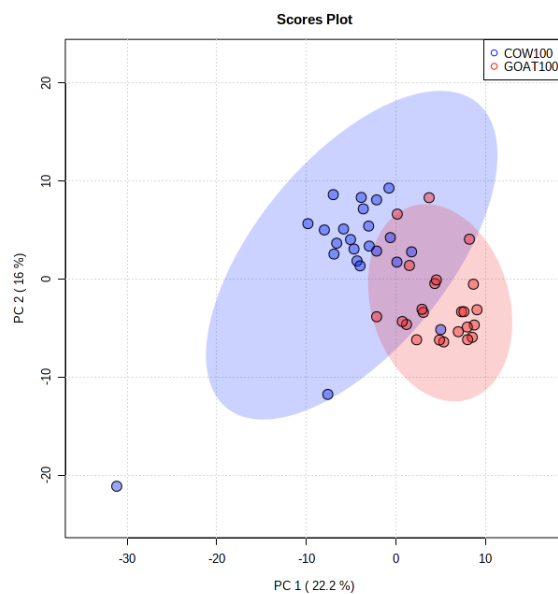
Identifikace diskriminujících biomarkerů kravského mléka byla provedena v softwaru Chenomx NMR Suite 8.6 (Chenomx Inc., Kanada), pomocí autentických standardů, a také pomocí již publikované literatury zaměřující se na využití NMR v mlékařství.

Statistické vyhodnocení

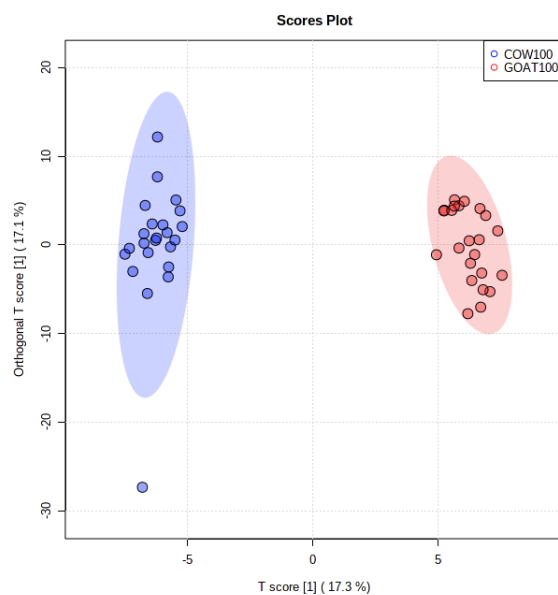
U složkových, hygienických, fyzikálních a technologických ukazatelů byly vypočteny základní statistické charakteristiky (Příloha č. 2). Dále bylo provedeno porovnání středních hodnot čistého kravského a kozího mléka párovým t-testem v MS Excel (Microsoft Corporation, USA). Základní statistické charakteristiky a výsledné p -hodnoty poukázaly na způsobilost použitých vzorků k provedení studie identifikace falšování kozího mléka v daných geografických podmínkách.

Multivariační statistická analýza poskytla tři výstupy hodnotící rozdílnost vodíkových spekter čistého kravského a kozího mléka pro oba měřené soubory (dvě různá tepelná ošetření). Analýza hlavních komponent (PCA), ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců (OPLS-DA) a analýza binů založená na korelačních koeficientech $p(\text{corr})$ získaných z OPLS-DA prokázaly rozdílnost mezi skupinami a homogenitu uvnitř skupin včetně identifikace pro nás nejdůležitějších diskriminačních míst ve vodíkových spektrech kravského mléka. Jednotlivé výstupy, které byly zpracovány v softwarech MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>; Chong et al., 2019) a MATLAB R2020 a softwaru (MathWorks Inc.), jsou zobrazeny na Obr. 1-6. Na Obr. 3 a 6 jsou znázorněny i nejvíce diskriminující biomarkery nacházející se v čistém kravském mléku. V případě kravského mléka, které bylo ošetřeno vysokou pasterací, se jedná o aminosacharidy, citrát, neznámou látku a orotát. Druhý soubor vykazoval téměř stejné diskriminující biomarkery s tím rozdílem, že orotát se u šetrně pasterovaného mléka mezi tyto biomarkery nezařadil, namísto něj přibyla další neznámá látka.

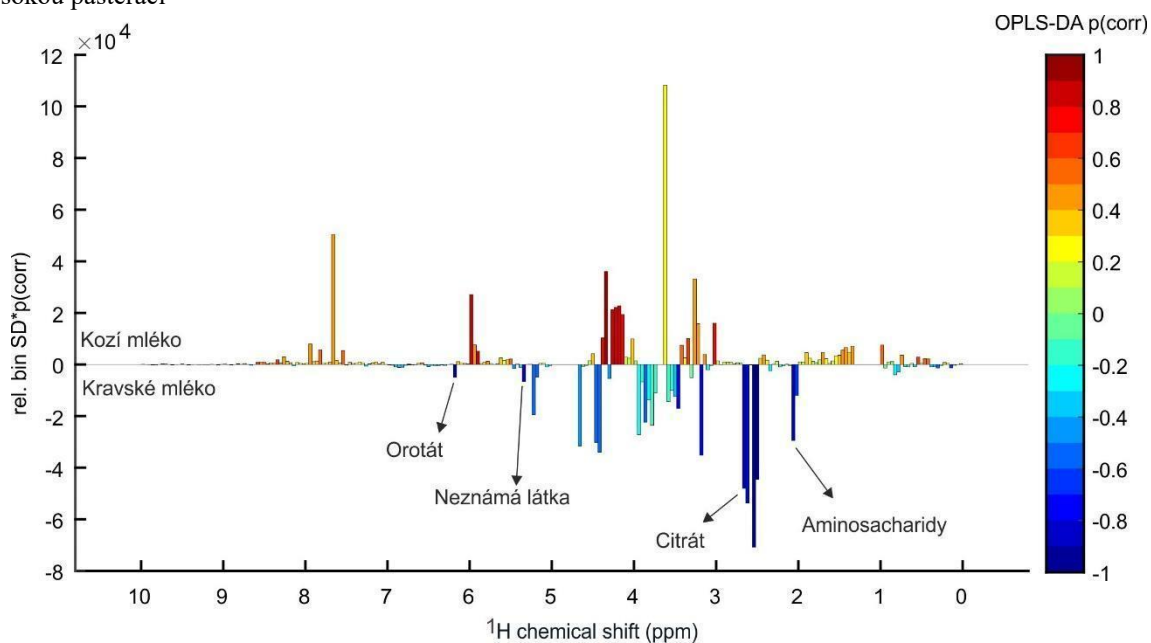
Obrázek 1 Model analýzy hlavních komponent (PCA) čistého kravského ($n = 23$; označeno modrou barvou) a koziho mléka ($n = 23$; označeno červenou barvou); jedná se o mléčné vzorky odebrané v roce 2019 – ošetřeno vysokou pasterací



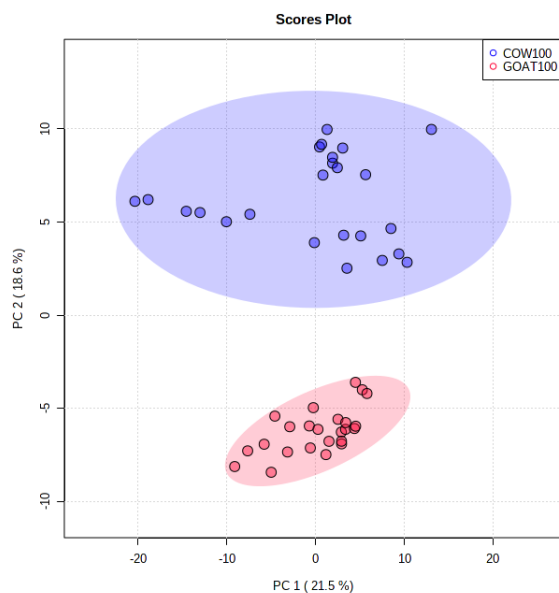
Obrázek 2 Model ortogonální diskriminační analýzy částečných nejmenších čtverců (OPLS-DA) čistého kravského ($n = 23$; označeno modrou barvou) a koziho mléka ($n = 23$; označeno červenou barvou); jedná se o mléčné vzorky odebrané v roce 2019 – ošetřeno vysokou pasterací



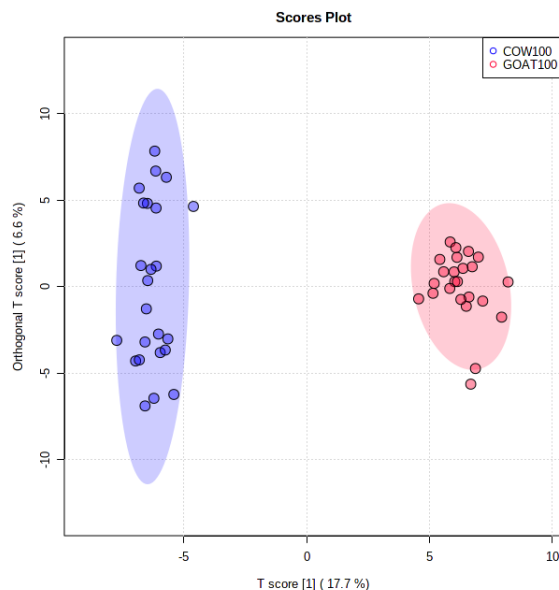
Obrázek 3 Analýza binů – barva sloupce je zbarvena dle korelačního zatížení binů hodnotou $p(\text{corr})$ získanou z OPLS-DA; v horní části vodíkového spektra jsou vyobrazeny diskriminující oblasti pro čisté kozí mléko ($n = 23$), v dolní části vodíkového spektra jsou vyobrazeny diskriminující oblasti pro čisté kravské mléko ($n = 23$) – ošetřeno vysokou pasterací



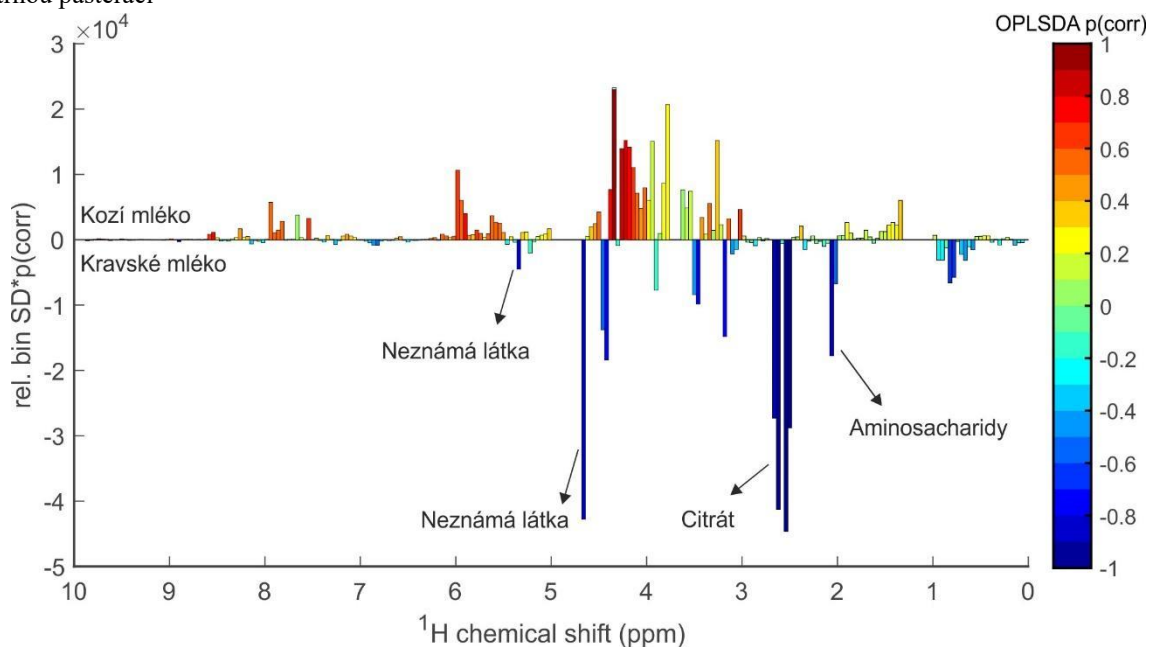
Obrázek 4 Model analýzy hlavních komponent (PCA) čistého kravského ($n = 24$; označeno modrou barvou) a kozího mléka ($n = 24$; označeno červenou barvou); jedná se o mléčné vzorky odebrané v roce 2020 – ošetřeno šetrnou pasterací



Obrázek 5 Model ortogonální diskriminační analýzy částečných nejmenších čtverců (OPLS-DA) čistého kravského ($n = 24$; označeno modrou barvou) a koziho mléka ($n = 24$; označeno červenou barvou); jedná se o mléčné vzorky odebrané v roce 2020 – ošetřeno šetrnou pasterací



Obrázek 6 Analýza binů – barva sloupce je zbarvena dle korelačního zatížení binů hodnotou $p(\text{corr})$ získanou z OPLS-DA; v horní části vodíkového spektra jsou vyobrazeny diskriminující oblasti pro čisté kozi mléko ($n = 24$), v dolní části vodíkového spektra jsou vyobrazeny diskriminující oblasti pro čisté kravské mléko ($n = 24$) – ošetřeno šetrnou pasterací



Dále bylo nutností otestovat diskriminující sílu vybraných biomarkerů kravského mléka u porušených kozích mlék. Pro tento cíl byly integrály těchto biomarkerů všech koncentrací (1 %; 5 % a 10 %) předloženy jako proměnné do další OPLS-DA analýzy. Dle získaného skóre

byly jako nejvíce specifické biomarkery vyhodnoceny aminosacharidy, konkrétně pík na pozici 2,06 ppm reprezentující methylovou skupiny N-acetylglukosaminu a N-acetylgalaktosaminu.

Před posouzením účinnosti aminosacharidů jako biomarkerů, které budou sloužit pro odhalování falšování kozího mléka, byl posouzen vztah mezi procentem kravského mléka v kozím mléku a integrálem relativní intenzity aminosacharidů pomocí validačního korelačního koeficientu získaného z křížové validace. Získaný validační korelační koeficient pro vysokou pasteraci ($r = 0,9344$ s 95% intervalem spolehlivosti od 0,9342 do 0,9347) i pro šetrnou pasteraci ($r = 0,9582$ s 95% intervalem spolehlivosti od 0,9580 do 0,9584) potvrdily vysokou pozitivní korelaci.

Statistická analýza ROC křivek (Receiver Operating Characteristic Curve) posoudila schopnost diskriminace různé procentuální příměsi kravského mléka (1 %, 5 % a 10 %) v kozím mléku od čistého kozího mléka, čistého kravského a kozího mléka, a také dvou různých hladin falšování (5 % a 10 %) mezi sebou dle integrálu relativní intenzity N-acetylglukosaminu a N-acetylgalaktosaminu. Na základě vyhodnocení výsledků byly určeny meze (Tabulka 1 a 2), dle kterých je možné porovnávané skupiny diskriminovat. Na základě takto stanoveného diskriminačního pravidla byla určena přesnost a spolehlivost predikce příslušnosti vzorku do skupiny. Přesnost predikce s využitím mezí získaných pomocí ROC křivek byla vypočtena s využitím k-násobné křížové validace, kdy správnost predikce byla vždy posuzována na skupině vzorků, které nebyly použity pro odhad dané meze. Soubor byl náhodně rozdělen do devíti skupin (9-násobná křížová validace). Osm skupin bylo použito pro odhad meze pomocí ROC křivek, vzorky v deváté skupině byly následně klasifikovány na základě takto získané meze. Tento proces byl opakován celkem devětkrát, vždy s vynecháním jiné skupiny. Dále byl stanoven počet správně a nesprávně klasifikovaných vzorků, který je základem pro výpočet senzitivity, specificity a celkové přesnosti. Meze uvedené v tabulkách na str. 8 tak představují průměrnou hodnotu z devíti dílčích kroků v rámci křížové validace. Výsledky níže uvádějí celkovou přesnost a p -hodnoty pro posouzení plochy pod křivkou (AUC) u jednotlivých ROC křivek. Jednotlivé ROC křivky pro vzorky, které byly ošetřeny vysokou a šetrnou pasterací jsou vyobrazeny na Obrázku 7 a 8 včetně náležitých charakteristik a krabicových grafů znázorňujících porovnání integrálů relativní intenzity aminosacharidů v daném páru. Z níže uvedených obrázků je patrné, že identifikovat 1 % kravského mléka v kozím mléku není pomocí protonové NMR možné, nicméně identifikace dalších binárních směsí byla již úspěšná. Kozí mléko obsahující 5 % kravského mléka, které bylo podrobena vysoké pasteraci, bylo identifikováno s 85% přesností ($p < 0,0001$ pro AUC), což lze vyhodnotit jako vynikající test.

Hladinu 10 % kravského mléka lze pak určit s 96% přesností ($p < 0,0001$ pro AUC) a jedná se o téměř dokonalý test. Falsifikované kozi mléko, které bylo ošetřeno šetrnou pasterací, bylo možné diskriminovat v případě obsahu 5 % i 10 % kravského mléka s větší přesností, konkrétně s 87% a 98% ($p < 0,0001$ pro obě AUC). Lepší schopnost diskriminovat falšování u šetrné pasterace je zřejmě dána proběhlou proteolýzou, která může změnit strukturu glykoproteinů, a tak ovlivňovat viditelnost aminosacharidů.

Poslední ROC analýza, která je zmíněna na Obrázku 7 a 8 je vyhodnocení možnosti rozlišení různých příměsí kravského mléka, konkrétně 5 % a 10 %. U vysoké i šetrné pasterace bylo i v tomto případě potvrzeno, že rozlišení pomocí integrálů relativní intenzity aminosacharidů, je proveditelné. Tyto dvě příměsi bylo možné rozlišit s 83% přesností ($P < 0,001$ pro AUC) v případě vysoké pasterace a s 79% přesností ($P < 0,001$ pro AUC) přesností v případě šetrné pasterace. Tento výsledek otevírá cestu ke zjištění prahových hodnot pro další kategorie falšování (> 10 %).

Účinnost aminosacharidů byla vyhodnocena i externí validací. Testovány byly meze stanovené pro šetrnou pasteraci a vysokou pasteraci. Data set byl sestaven z binárních směsí mlék (> 20 % kravského mléka), které byly zakoupeny v tržní síti a z čistých kozích mlék. Skupinu „True Positive“ reprezentovala mléka znehodnocená kravským mlékem, skupinu „True Negative“ reprezentovala čistá kozi mléka. Výpočet přesnosti proběhl dle Dalabasmaz et al. (2019). Mez stanovená (dle výsledků pro 10% příměs) pro vysokou pasteraci diskriminovala čisté kozi mléko a falšovaná kozi mléka se 100% přesností, mez určená pro šetrnou pasteraci selhala v jednom případě, a tak výsledná přesnost byla 97% (Tabulka 5 a 6). Snížená přesnost je zřejmě dána faktem, že u většiny mlék, které lze zakoupit v naší tržní síti, je prováděna vysoká pasterace. Výsledky externí validace jsou uvedeny v Tabulce 5 a 6, a také v Příloze č. 3.

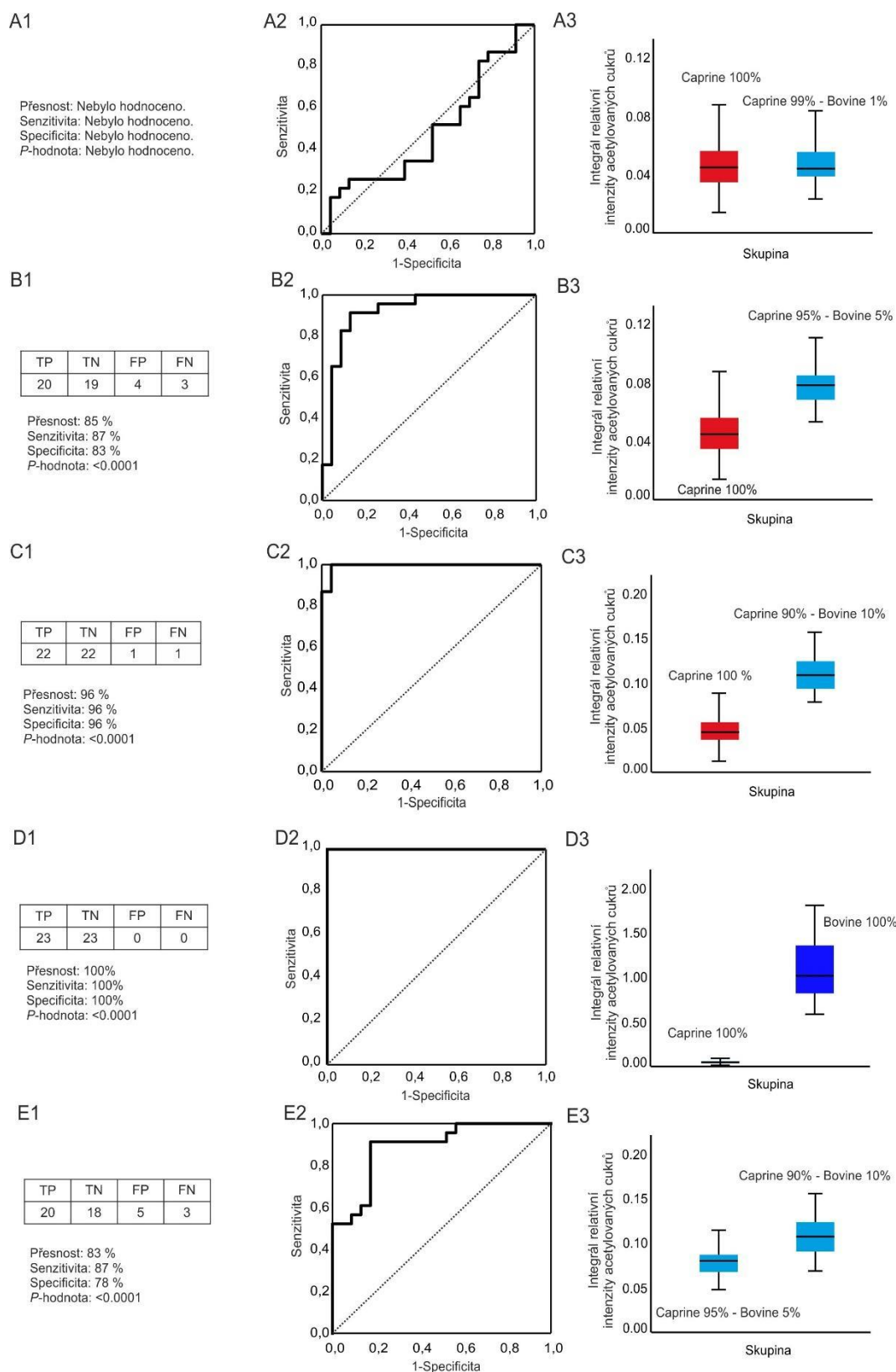
Tabulka 5 Výsledky externí validace s použitím meze pro vysokou pasteraci

Typ pasterace	Použitá mez	True Positive	True Negative	False Positive	False Negative	Přesnost
Vysoká	0,072	26	6	0	0	100%

Tabulka 6 Výsledky externí validace s použitím meze pro šetrnou pasteraci

Typ pasterace	Použitá mez	True Positive	True Negative	False Positive	False Negative	Přesnost
Šetrná	0,055	26	5	1	0	97%

Obrázek 7 Vybrané charakteristiky ROC křivky (A1 – E1); ROC křivky zpracované pro vzorky, které byly ošetřeny vysokou pasterací; každá skupina obsahuje 23 vzorků mléka (A2 – E2); krabicové grafy znázorňující dolní a horní kvartil, minimum a maximum (A3 – E3); TP = true positive, TN = true negative, FP = false positive, FN = false negative.

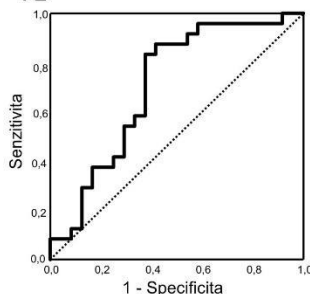


Obrázek 8 Vybrané charakteristiky ROC křivky (F1 – I1); ROC křivky zpracované pro vzorky, které byly ošetřeny šetrnou pasterací; každá skupina obsahuje 24 vzorků mléka (kromě skupiny mlék, které byly falšovány 5% přídavkem kravského mléka, $n = 23$) (F2 – I2); krabicové grafy znázorňující dolní a horní kvartil, minimum a maximum (F3 – I3); TP = true positive, TN = true negative, FP = false positive, FN = false negative.

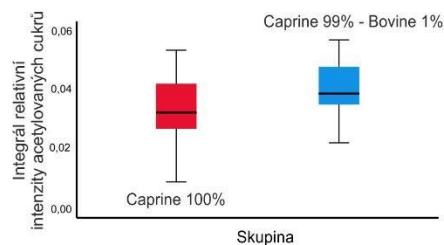
F1

Přesnost: Nebylo hodnoceno.
Senzitivita: Nebylo hodnoceno.
Specifita: Nebylo hodnoceno.
P-hodnota: Nebylo hodnoceno.

F2



F3

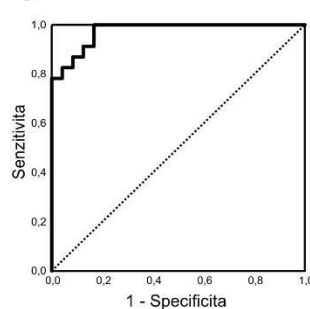


G1

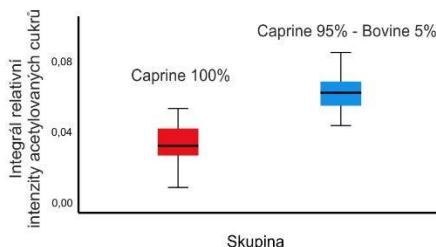
TP	TN	FP	FN
21	20	4	2

Přesnost: 87 %
Senzitivita: 91 %
Specifita: 83 %
P-hodnota: <0.0001

G2



G3

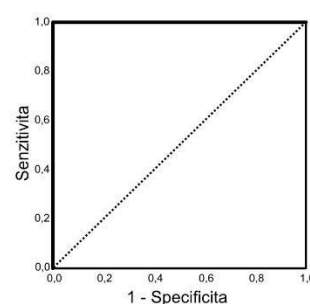


H1

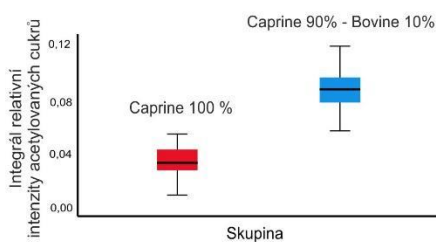
TP	TN	FP	FN
23	24	0	1

Přesnost: 98 %
Senzitivita: 96 %
Specifita: 100 %
P-hodnota: <0.0001

H2



H3

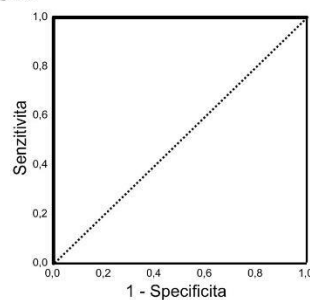


Ch1

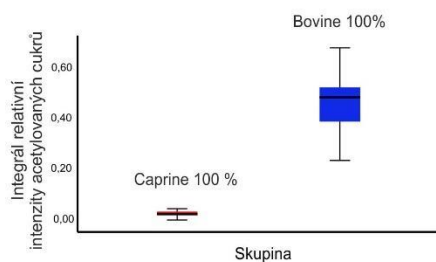
TP	TN	FP	FN
24	24	0	0

Přesnost: 100 %
Senzitivita: 100 %
Specifita: 100 %
P-hodnota: <0.0001

CH2



CH3

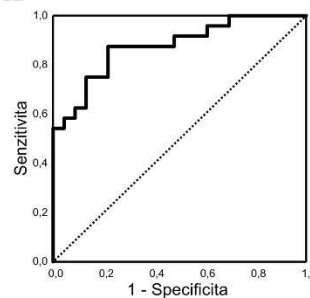


I1

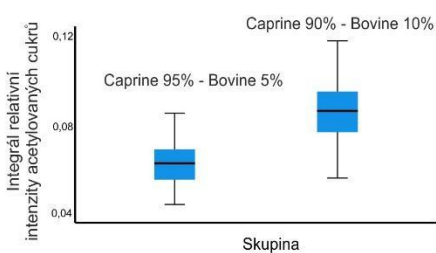
TP	TN	FP	FN
19	18	5	5

Přesnost: 79 %
Senzitivita: 79 %
Specifita: 78 %
P-hodnota: <0.0001

I2



I3



3.6 Závěrečné shrnutí

Samotný vývoj metodiky byl postaven na komplexní mléčné matrici, která reprezentovala variabilitu kozího a kravského mléka na českých farmách. Analyzováno pomocí NMR bylo téměř 300 vzorků mléka, u kterých se aminosacharidy prokázaly jako vhodné biomarkery pro odhalování falsifikace kozího mléka. Pomocí metody NMR byla detekována příměs 5 % kravského mléka s přesností 87% v případě šetrné pasterace a 85% v případě vysoké pasterace, 10 % kravského mléka bylo pak detekováno s téměř 100% přesností pro obě tepelná ošetření. Nejnižší testovaná koncentrace kravského mléka (1 %) nebyla pomocí zvolené metody identifikovatelná. Skutečnost, že se ve většině případů falšuje minimálně 10 % kravského mléka a více, činí tuto metody obzvláště užitečnou.

4. Srovnání „novosti postupů“

Spektroskopie NMR je výzkumná technika, která využívá magneticky aktivní atomová jádra neradioaktivních izotopů k získání poměrně velkého množství informací o molekulární struktuře vybraného organického vzorku. Využití této techniky v rámci testování autenticity potravin je v posledních letech na vzestupu a nejenak je tomu v mlékárenském sektoru. NMR lze využít k určení zeměpisného původu u mléka i mléčných produktů, k rozlišení čerstvého mléka od mléka s již prošlým datem spotřeby, k detekci melaminu v kojenecké výživě, a v neposlední řadě také k detekci syntetických triacylglycerolů v másle. Studií, které se zaměřily na detekci falšování mléka malých přežvýkavců, je pomálu. Jako první lze zmínit studii publikovanou v roce 2011, ve které se autoři zaměřili na detekci kravského mléka v ovčím mléku pomocí protonové NMR společně s neutrální jednovrstvou sítí. Přestože shoda mezi binárními směsmi a umělou neuronovou jednovrstvou sítí byla vysoká, nejnižší poměr míchání byl 20 % kravského mléka v ovčím mléku (Lamanna et al., 2011). Na identifikaci metabolitů v kozím, ovčím a kravském mléku se zaměřil Yang et al. (2016). Pro analýzu vzorků byla použita stejná pulsní sekvence jako v této metodice, s tím rozdílem, že zde zařadili krom NMR i kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Na základě metabolické analýzy bylo zjištěno hned několik biomarkerů pro výše zmíněná mléka, nicméně binární směsi kravského mléka a mléka malých přežvýkavců testovány nebyly. Schopnost NMR detekovat kravské mléko v kozím mléku prokázali Li et al. (2017). Ti pomocí deseti proměnných zahrnujících i aminosacharidy sestrojili matematický model, s jehož pomocí detekovali 5 % kravského mléka v kozím mléku. Autoři této studie dosáhli obdobných výsledků jako my, avšak jejich metoda nebyla zřejmě určena pro praktické využití, o čemž svědčí i fakt, že do experimentu bylo zařazeno mléko ošetřené pouze ultravysokou teplotou (UHT), informace o plemeni či farmách zcela chybí, a taktéž byl vynechán možný vliv změn složení mléka v průběhu laktace malých přežvýkavců. Žádné jiné předchozí studie obdobné téma nezkoumaly.

5. Popis uplatnění metodiky

Výše uvedená metodika byla vyvinuta v rámci projektu MZe NAZV Země QK1920222 „Nové spolehlivé metody detekce falšování kozího mléka a ovčího mléka a mléčných výrobků“ s cílem ji poskytnout kontrolním orgánům České republiky – Státní veterinární správě, která potenciálně a kompetenčně představuje hlavního smluvního uživatele metodiky. Certifikovanou metodiku bude tento kontrolní úřad používat při podezření falšování kozího mléka. S ohledem na to, že provozní laboratoře Státní veterinární správy nedisponují podle našeho vědomí nukleární magnetickou rezonancí, předpokládá se, že Státní veterinární správa a Česká zemědělská univerzita v Praze budou v budoucnu v rámci analytické části spolupracovat.

6. Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty výše zmíněné metodiky byly vypracovány s ohledem na fakt, že autorům není známo, že by hlavní uživatel metodiky – Státní veterinární správa disponovala nukleární magnetickou rezonancí. Tudíž byla ekonomická náročnost analýzy jednoho vzorku vypočtena pro laboratoř na České zemědělské univerzitě, která se podílela na vývoji.

Velkou výhodou nukleární magnetické rezonance je rychlá příprava vzorku, která vyžaduje pouze malé množství chemikálií i spotřebního laboratorního materiálu. Vezmeme-li v úvahu chemikálie (CHCl_3 a pufr obsahující D_2O), spotřební laboratorní materiál, přístrojové vybavení a personální zajištění, cena přípravy jednoho vzorku činí přibližně 90 Kč. Z analýzy vzorku na digitálním NMR spektrometru Bruker Avance IIITM 500 MHz představují největší nákladovou položku nezbytné kryokapaliny a amortizace přístroje, dále do tohoto kroku musí být započítáno personální zajištění – zpracování dat a obsluha přístroje, a také licence softwaru, náklady na analýzu vzorku tak činí 500 Kč. Posledním krokem je nutnost započítat 25% režie. **Celková cena za vyšetření vzorku činí tedy 900 Kč včetně DPH.** Pokud by Státní veterinární správa zvažovala nákup a zavedení nukleární magnetické rezonance, celkové náklady by se pohybovaly nad 30 mil Kč.

Výše zmíněná metoda, kterou lze považovat za robustní, rychlou a z pohledu spotřeby chemikálií téměř nenáročnou, by měla díky zvýšení účinnosti kontroly mléka malých přežvýkavců snížit podíl falšovaného mléka v tržní síti. Snížení podílu falšovaného mléka malých přežvýkavců představuje velký přínos zvláště na poli veřejného zdraví, kdy budou lépe chráněni konzumenti kozího mléka, kteří nemohou např. z důvodu alergie na specifickou bílkovinu konzumovat kravské mléko. Ekonomický přínos nelze v tomto případě přesně odhadnout.

7. Seznam použité související literatury

- Anděl M, Dlouhý P. 2009. Falšování kojenecké výživy příčinou úmrtí. *Vesmír* 88, 298, 2009/5. Available from <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2009/cislo-5/melamin.html> (accessed May 2009).
- Chong, J., D.S. Wishart, and J. Xia. 2019. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 68:1–128. doi:10.1002/cpbi.86.
- Dalabasmaz, S., D. Dittrich, I. Kellner, T. Drewello, and M. Pischetsrieder. 2019. Identification of peptides reflecting the storage of UHT milk by MALDI-TOF-MS peptide profiling. *J. Proteomics* 207. doi:10.1016/j.jprot.2019.103444.
- Ewida, R.M., and D.S.M. Abd El-Magiud. 2018. Species adulteration in raw milk samples using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Vet. World* 11:830–833. doi:10.14202/vetworld.2018.830-833.
- Ferreira, I.M.P.L.V.O., M.B.P.P. Oliveira, and I.M. ã. 2007. A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows ' milk in goats ' milk cheese 17:1132–1138. doi:10.1016/j.idairyj.2007.01.009.
- Golinelli, L.P., A.C. Carvalho, R.S. Casaes, C.S.C. Lopes, R. Deliza, V.M.F. Paschoalin, and J.T. Silva. 2014. Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese. *J. Dairy Sci.* 97:6693–6699. doi:10.3168/jds.2014-7990.
- Lamanna, R., A. Braca, E. Di Paolo, and G. Imparato. 2011. Identification of milk mixtures by ^1H NMR profiling. *Magn. Reson. Chem.* 49. doi:10.1002/mrc.2807.
- Li, Q., Z. Yu, D. Zhu, X. Meng, X. Pang, Y. Liu, R. Frew, H. Chen, and G. Chen. 2017. The application of NMR-based milk metabolite analysis in milk authenticity identification. *J. Sci. Food Agric.* 97:2875–2882. doi:10.1002/jsfa.8118.
- Ola, F.A.T. 2015. Milk adulteration: Some Chemical Adulterants of Milk. *Egypt. J. Chem. Environ. Heal.* 1:694–703.
- Pesic, M., M. Barac, M. Vrvic, N. Ristic, O. Macej, and S. Stanojevic. 2011. Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. *Food Chem.* 125:1443–1449. doi:10.1016/j.foodchem.2010.10.045.
- Piccinonna, S., R. Ragone, M. Stocchero, L. Del Coco, S.A. De Pascali, F.P. Schena, and F.P. Fanizzi. 2016. Robustness of NMR-based metabolomics to generate comparable data sets for olive oil cultivar classification. An inter-laboratory study on Apulian olive oils. *Food Chem.* 199:675–683. doi:10.1016/j.foodchem.2015.12.064.
- Ren, Q.R., H. Zhang, H.Y. Guo, L. Jiang, M. Tian, and F.Z. Ren. 2014. Detection of cow milk adulteration in yak milk by ELISA. *J. Dairy Sci.* 97:6000–6006. doi:10.3168/jds.2014-8127.
- Teixeira, J.L. da P., E.T. dos S. Caramês, D.P. Baptista, M.L. Gigante, and J.A.L. Pallone. 2020. Vibrational spectroscopy and chemometrics tools for authenticity and improvement the

safety control in goat milk. Food Control 112:107105.
doi:10.1016/j.foodcont.2020.107105.

Trimboli, F., N. Costanzo, V. Lopreiato, C. Ceniti, V.M. Morittu, A. Spina, and D. Britti. 2019. Detection of buffalo milk adulteration with cow milk by capillary electrophoresis analysis. J. Dairy Sci. 102:5962–5970. doi:10.3168/jds.2018-16194.

Tsakali, E., C. Agkasta, C. Koliaki, D. Livanios, G. Boutris, M.I. Christopoulou, S. Koulouris, S. Koussissis, J.F.M. Van Impe, and D. Houhoula. 2019. Milk Adulteration: Detection of Bovine Milk in Caprine Dairy Products by Real Time PCR. J. Food Res. 8:52. doi:10.5539/jfr.v8n4p52.

Yang, Y., N. Zheng, X. Zhao, Y. Zhang, R. Han, J. Yang, S. Zhao, S. Li, T. Guo, C. Zang, and J. Wang. 2016. Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals. J. Proteomics 136:174–182. doi:10.1016/j.jprot.2015.12.031.

8. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány

- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- HULOVÁ, I.- VYLETĚLOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.: The differences of selected indicators of raw milk composition and properties between small ruminants and cows in the Czech Republic. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, L, 183, 3, 2008, 10-19.
- HANUŠ, O.: Úvaha nad řešením problému falšování potravin a potravinových surovin, zejména s přihlédnutím k mlékařství. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 30, 177, 6, ISSN 1212-950X, 2019, XIII-XIV.
- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- JANŮ, L.- MACEK, A.- ZAJÍČKOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Impact of different milk yields of cows on milk quality in Bohemian spotted cattle. *Acta Veterinaria Brno*, 76, 4, 2007, 563-571.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- KUČERA, J.- VYLETĚLOVÁ, M.- TRÍNÁCTÝ, J.: Analyse of relationships between freezing point and selected indicators of udder health state among cow, goat and sheep milk. Analýza vztahů mezi bodem mrznutí a vybranými ukazateli zdravotního stavu vemene mezi kravským, kozím a ovčím mlékem. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, ISSN 1211-8516, LVII, 5, 2009, 103-110.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- KUČERA, J.- TRÍNÁCTÝ, J.: The effects of milk indicators of sheep mammary gland health state on some milk composition and properties. *Folia Veterinaria*, 53, 4, 2009, 208-216.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- LANDOVÁ, H.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: The effect of goat udder health on composition and properties of raw milk. *Folia Veterinaria*, 52, 3-4, 2008, 149-154.
- HANUŠ, O.- JANŮ, L.- SCHUSTER, J.- KUČERA, J.- VYLETĚLOVÁ, M.- GENČUROVÁ, V.: Exploratory analysis of dynamics of frequency distribution of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, LIX, 1, 2011, 83-100.
- HANUŠ, O.- NĚMEČKOVÁ, I.- RYSOVÁ, L.- LEGAROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.: Možnosti identifikace falšování syrového mléka. Possibilities of identification of adulteration of raw milk. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 30, 177, 6, ISSN 1212-950X, 2019, 1-7.
- HANUŠ, O.- RYSOVÁ, L.- NĚMEČKOVÁ, I.- LEGAROVÁ, V.- KUČERA, J.- KLIMEŠOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- NEJESCHLEBOVÁ, L.: Změny technologických vlastností mléka malých přežvýkavců v důsledku falšování mlékem kravským. Changes in the technological properties of small ruminant milk as a result of adulteration by cow milk. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 31, 183, 6, ISSN 1212-950X, 2020, 4-13.
- HANUŠ, O.- TOMÁŠKA, M.- HOFERICOVÁ, M.- VYLETĚLOVÁ KLIMEŠOVÁ, M.- Klapáčová, L.- JEDELSKÁ, R.- KOLOŠTA, M.: Relationship between freezing point and raw ewes' milk components as a possible tool for estimation of milk adulteration with added water. *Journal of Food and Nutrition Research*, 54, 4, 2015, 281-288.
- JANŮ, L.- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- MACEK, A.- ZAJÍČKOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Influences of different milk yields of Holstein cows on milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, 76, 4, 2007, 553-561.

- PECOVÁ, L.- SAMKOVÁ, E.- HANUŠ, O.- HASOŇOVÁ, L.- ŠPIČKA, J.: Fatty acids stability in goat yoghurt. Stabilita mastných kyselin v kozím jogurtu. *Ciência Rural*, 49, 7, 2019, 1-10. doi: [10.1590/0103-8478cr20180803](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180803)
- RYSOVÁ, L.- LEGAROVÁ, V.- HANUŠ, O.- NĚMEČKOVÁ, I.- HAVLÍK, J.: Nové spolehlivé metody detekce falšování koziho a ovčího mléka. Novel robust methods for detection adulteration of goat and sheep milk. In *Mléko a sýry 2020*. Praha: VŠCHT 2020, 23. 1. 2020, ISBN: 978-80-7592-076-8
Praha, Česká republika.
<https://cps.vscht.cz/files/uzel/56263/0001~~K07KL8rLzHYOCDYyMDIAAA.pdf?redirected>
- RYSOVÁ, L.- LEGAROVÁ, V.- PACAKOVÁ, Z.- HANUS, O.- NEMEČKOVÁ, I.- KLIMESOVÁ, M.- HAVLÍK, J.: Detection of bovine milk adulteration in caprine milk with *N*-acetyl carbohydrate biomarkers by using ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Detekce falšování bovinního mléka v kozím mléce biomarkery *N*-acetyl karbohydrátu pomocí ^1H nukleární magnetické rezonanční spektroskopie. *Journal of Dairy Science*, 104, 9, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20077>
- SOJKOVÁ, K.- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- GENČUROVÁ, V.- HULOVÁ, I.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Impacts of lactation physiology at higher and average yield on composition, properties and health indicators of milk in Holstein breed. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 1, 2010 a, 21-28.
- SOJKOVÁ, K.- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- YONG, T.- HULOVÁ, I.- VYLETĚLOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: A comparison of lactation physiology effects at high and lower yield on components, properties and health state indicators of milk in Czech Fleckvieh. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 2, 2010 b, 84-91.

9. Jména oponentů a názvy jejich organizací

- 1) Odborník z daného oboru: RNDr. Hana Navrátilová, Ph.D.; Státní zemědělská a potravinářská inspekce
- 2) Pracovník státní správy: MVDr. Sylva Havelková; Státní veterinární správa

10. Přílohy

Příloha č. 1 **Použité analytické metody k analýzám syrového čistého** **kravského a koziho mléka**

Analýza chemického složení vzorků mléka:

Obsahy složení mléka, tuku, hrubých bílkovin, monohydrátu laktózy a tukuprosté sušiny (popřípadě kaseinu, celkové sušiny a močoviny nebo hodnota bodu mrznutí mléka) byly stanoveny nepřímou metodou infračervené spektroskopie MIR-FT (s Michelsonovým interferometrem a Fourierovou transformací) na přístroji Bentley DairySpec (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA). Přístroje byly pravidelně kalibrovány (na kravské mléko měsíčně, na mléko malých přežvýkavců dvoutříměsíčně) podle výsledků relevantních referenčních metod (Hanuš et al., 2009, 2014). Výsledky analýz byly pravidelně kontrolovány prostřednictvím testů výkonnosti analytické způsobilosti (Hanuš et al., 2004). Při kalibrační a kontrolní činnosti bylo postupováno v rámci norem: ČSN EN ISO/IEC 17025; ČSN 57 0536; ČSN 57 0530; ČSN ISO 8196-2 (570536); ČSN ISO 8196-1 (570536); ČSN ISO 8196-3 (570536).

Analýza počtu somatických buněk v syrovém mléce:

Počet somatických buněk byl stanoven fluoro-opto-elektronickou metodou průtočné cytometrie na zařízení Somacount 300 (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA). Přístroj byl pravidelně kalibrován podle výsledků referenční metody a kontrolován referenčními vzorky (Hanuš et al., 2009, 2011). Při kalibrační a kontrolní činnosti bylo postupováno v rámci norem: ČSN EN ISO/IEC 17025; ČSN EN ISO 13366–1 (57 0531); ČSN EN ISO 13366–2 (57 0531).

Analýzy mikrobiologické (hygienická kvalita mléka):

Stanovení celkového počtu mezofilních mikroorganismů v syrovém mléce:

Pro stanovení CPM byla použita klasická plotnová metoda podle ČSN ISO EN 4833-1 (2014). Vzorek mléka (jeho příslušné ředění) byl inokulován na Petriho misku v objemu 1 ml a zalit agarem. Pro kultivaci byl použit GTK M agar (MILCOM, Tábor) a kultivace proběhla při 30 °C po dobu 72 hodin. Počet kolonií byl vyjádřen jako KTJ v 1 ml vzorkovaného mléka podle normy ČSN EN ISO 7218 (2008).

Stanovení Lactobacillus bulgaricus v jogurtovém testu (laktobacilů) a stanovení Streptococcus thermophilus v jogurtovém testu (streptokoků):

Kysací schopnost mléka (jogurtový test, ON 57 0534), hodnoty KSM–PL (počet laktobacilů), –PS (počet streptokoků) a –CP (celkový počet ušlechtilé mikroflóry - prováděné podle normy ON 57 0534 mírně upraveným postupem s termofilní jogurtovou kulturou YC-180, 50U (Chr. Hansen, Denmark), *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, navážka 0,24 g, 150 ml pasterované mléko, teplota 43 °C, míchání 15 min., 2 ml do každého vzorku o 25 ml, čas inkubace 3,5 hodiny) byly stanoveny počítáním jednotek tvořících kolonie (KTJ) za použití: *S. thermophilus* - *S. thermophilus* Isolation agar (HiMedia, Indie, M 948), kultivace při 37 °C po dobu 48-72 hodin; *Lb. delbrueckii* a *bulgaricus* – *Lactobacillus bulgaricus* Agar Base (HiMedia, Indie, M 927), anaerobní kultivace při 37 °C po dobu 48 hodin. Jednotky byly KSM–PL (počet laktobacilů ($\text{KTJ} \times \text{ml}^{-1}$); KSM–PS (počet streptokoků ($\text{KTJ} \times \text{ml}^{-1}$); KSM–CP (počet ušlechtilých mlékařských mikroorganismů ($\text{KTJ} \times \text{ml}^{-1}$); KSM–S/L (poměr streptokoků/laktobacilů).

Analýzy fyzikálních a technologických vlastností pasterovaného mléka:

Aktivní kyselost mléka byla měřena použitím pH–metru 1100L (VWR pH enomenal), který byl pravidelně před každým měřením sady vzorků kalibrován na roztoky standardních pufrů (pH 4,0 a 7,0) při 20 °C.

Titrační kyselost mléka byla měřena prostřednictvím titrace 100 ml mléka (Soxhlet-Henkel) za použití alkalického roztoku NaOH 0,25 M v prostředí indikátoru (fenolftalein) podle normy ČSN 57 0530.

Kysací schopnost mléka (jogurtový test) byla stanovena formou titrační kyselosti (Soxhlet-Henkel) za použití alkalického roztoku NaOH 0,25 M v prostředí indikátoru (fenolftalein) podle dřívější normy ON 57 0534.

Syřitelnost mléka, jako čas koagulace laktoproteinů (vteřin do vytvoření viditelných vloček bílkovin) byla stanovena s přidavkem bakteriálního sýřicího enzymu Fromáza (Fromase[®] 220 TL BF, Royal DSM, Heerlen, Netherlands; www.tomscheese.cz) v 50 ml mléka při 32 °C ve vodní lázni. Po hodině syntézy byla kontrolována kvalita sýřeniny podle pevnosti vytvořeného koláče palpací do 4 tříd kvality a propadem vhozeného tělíška za standardizovaných podmínek v cm. Byl rovněž stanoven objem kontrakcí vypuzené syrovátky.

Související normy:

- ČSN 57 0536 (570536) 1999. Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem. Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. Český normalizační úřad, Czech Normalization Institute, Prague.
- ČSN 57 0530 (570530) 1973. Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Methods for testing of milk and milk products. Český normalizační úřad, Czech Normalization Institute, Prague.
- ČSN EN ISO 1211 (570534). 2011. Milk – Fat content determination – Gravimetric method (Reference method). Český normalizační úřad, Czech Normalization Institute, Prague.
- ČSN EN ISO/IEC 17025. 2005. Conformity assessment - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Český normalizační úřad, Czech Normalization Institute, Prague.
- ČSN EN ISO 13366–1 (57 0531). 1998. Milk – Somatic cell count determination – Part 1: Microscopy method. Český normalizační úřad, Czech Normalization Institute, Prague.
- ČSN EN ISO 13366–2 (57 0531). 2007. Milk – Somatic cell count determination – Part 2: Manual for fluoro–opto–electronic instrument operation. Český normalizační úřad, Czech Normalization Institute, Prague.
- ČSN ISO 8196-1 (570536). 2016. Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 1: Analytické atributy alternativních metod.
- ČSN ISO 8196-2 (570536). 2016. Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 2: Kalibrace a řízení kvality v laboratoři při analýzách mléka alternativními metodami.
- ČSN ISO 8196-3 (570536). 2016. Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 3: Protokol pro hodnocení a validaci alternativních metod pro analýzu mléka.
- ON 57 0534: Kysací schopnost mléka. Milk fermentationability determination. Oborová norma, Standard Milk Industry Prague, (1986).
- ČSN EN ISO 4833-1: Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2014.
- ČSN EN ISO 7218: Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2008.

Související vlastní práce na uvedené metodické problematice analýz mléka:

- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- JEDELSKÁ, R.: Diagnostic use of proficiency testing in dairy laboratory. *Acta agriculturae slovenica*, 2004, 84, 1, 37-42.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- YONG, T.- KUČERA, J.- ŠTOLC, L.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Reference and indirect instrumental determination of basic milk composition and somatic cell count in various species of mammals. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 40, 4, ISSN 1211-3174, 2009, 196 - 203.
- HANUŠ, O.- SOJKOVÁ, K.- HANUŠOVÁ, K.- SAMKOVÁ, E.- HRONEK, M.- HYŠPLER, R.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: An experimental comparison of methods for somatic cell count determination in milk of various species of mammals. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, ISSN 1211-8516, LIX, 1, 2011, 67-82.
- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- SAMKOVÁ, E.- LEDVINA, D.- CHLÁDEK, G.- KUČERA, J.- ROUBAL, P.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: A comparison of result reliability for investigation of milk composition by alternative analytical methods in Czech Republic. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 62, 5, ISSN 1211-8516, 2014, 929-937.

Příloha č. 2

Výsledky složkových, hygienických, fyzikálních a technologických ukazatelů čistých mlék odebraných v roce 2019 a 2020

Kravské mléko rok 2019

Celkem	CPM	log CPM	SB	log SB	Fat	Protein	Caseine	Lactose	Urea
<i>n</i>	23	23	23	23	23	23	23	23	23
<i>x</i>	54 278	4,0904	228	2,1866	4,25	3,38	2,71	5,05	35,11
<i>g</i>		12314		154					
<i>sx_v</i>	125 222	0,7216	252	0,4011	0,952	0,214	0,245	0,082	7,289
<i>vx_v</i>	230,7		110,5		22,4	6,3	9,0	1,6	20,8
<i>sx</i>	122 470	0,7058	246	0,3923	0,931	0,209	0,240	0,080	7,129
<i>vx</i>	225,6		107,9		21,9	6,2	8,9	1,6	20,3
<i>min</i>	1 000	3,0000	13	1,1139	2,11	2,85	1,95	4,85	22,66
<i>max</i>	570 000	5,7559	1 190	3,0755	6,32	3,76	3,12	5,26	48,83
<i>Rmax-min</i>	569 000	2,7559	1 177	1,9616	4,21	0,91	1,17	0,41	26,17
<i>medián</i>	8 000	3,9031	171	2,2330	4,36	3,39	2,74	5,04	34,09
<i>horní q</i>	4 425	3,6459	94	1,9731	3,88	3,30	2,61	5,02	31,05
<i>dolní q</i>	29 000	4,4582	235	2,3699	4,79	3,51	2,86	5,09	40,20

Celkem	SNF	To.Solids	FPD	ML - pH	ML - SH	čas	pevnost	kv.syr.	objem syr.
<i>n</i>	23	23	12	23	23	23	23	23	23
<i>x</i>	9,01	13,15	546,58	6,65	7,00	487,09	1,90	3,43	18,26
<i>g</i>									
<i>sx_v</i>	0,226	0,948	5,346	0,034	1,074	55,200	0,043	0,788	11,419
<i>vx_v</i>	2,5	7,2	1,0	0,5	15,3	11,3	2,3	23,0	62,5
<i>sx</i>	0,221	0,928	5,119	0,033	1,050	53,987	0,042	0,770	11,168
<i>vx</i>	2,5	7,1	0,9	0,5	15,0	11,1	2,2	22,4	61,2
<i>min</i>	8,33	10,77	535,00	6,59	4,72	356,00	1,80	2,00	2,00
<i>max</i>	9,37	14,61	554,00	6,72	8,82	579,00	2,00	4,00	37,00
<i>Rmax-min</i>	1,04	3,84	19,00	0,13	4,10	223,00	0,20	2,00	35,00
<i>medián</i>	8,97	13,33	547,25	6,64	7,05	500,00	1,90	4,00	18,00
<i>horní q</i>	8,92	12,65	543,88	6,63	6,28	444,50	1,90	3,00	8,50
<i>dolní q</i>	9,14	13,74	550,25	6,67	7,76	532,50	1,90	4,00	27,50

Celkem	objem syr.	Jog - SH	STR 10 ^{^7}	log STR 10 ^{^7}	LACTO 10 ^{^6}	log LACTO 10 ^{^6}
<i>n</i>	23	23	23	23	23	23
<i>x</i>	18,26	30,75	752 173 913	8,8483	75 434 783	7,8211
<i>g</i>				705180022		66236900
<i>sx_v</i>	11,419	3,282	257 628 283	0,1703	43 028 348	0,2199
<i>vx_v</i>	62,5	10,7	34,3		57,0	
<i>sx</i>	11,168	3,210	251 965 431	0,1665	42 082 555	0,2151
<i>vx</i>	61,2	10,4	33,5		55,8	
<i>min</i>	2,00	25,35	200 000 000	8,3010	33 000 000	7,5185
<i>max</i>	37,00	39,62	1 350 000 000	9,1303	210 000 000	8,3222
<i>Rmax-min</i>	35,00	14,27	1 150 000 000	0,8293	177 000 000	0,8037
<i>medián</i>	18,00	29,23	700 000 000	8,8451	66 000 000	7,8195
<i>horní q</i>	8,50	28,69	615 000 000	8,7888	45 500 000	7,6580
<i>dolní q</i>	27,50	32,47	885 000 000	8,9469	92 500 000	7,9622

Kozí mléko rok 2019

Celkem	CPM	log CPM	SB	log SB	Fat	Protein	Caseine	Lactose	Urea
<i>n</i>	23	23	23	23	23	23	23	23	23
<i>x</i>	479 435	4,7981	1 329	2,9866	3,80	3,23	2,75	4,61	63,93
<i>g</i>		62820		970					
<i>sx_v</i>	1 859 278	0,7372	993	0,3768	0,737	0,195	0,194	0,181	19,858
<i>vx_v</i>	387,8		74,7		19,4	6,0	7,1	3,9	31,1
<i>sx</i>	1 818 409	0,7210	972	0,3685	0,721	0,191	0,190	0,177	19,422
<i>vx</i>	379,3		73,1		19,0	5,9	6,9	3,8	30,4
<i>min</i>	2 000	3,3010	195	2,2900	2,60	2,76	2,34	4,38	35,15
<i>max</i>	9 000 000	6,9542	3 824	3,5825	6,09	3,64	3,14	5,07	114,77
<i>Rmax-min</i>	8 998 000	3,6532	3 629	1,2925	3,49	0,88	0,80	0,69	79,62
<i>medián</i>	77 000	4,8865	922	2,9647	3,62	3,16	2,79	4,61	62,12
<i>horní q</i>	23 750	4,3648	533	2,7241	3,34	3,12	2,63	4,48	50,26
<i>dolní q</i>	152 500	5,1832	2 052	3,3120	4,14	3,36	2,85	4,70	74,14

Celkem	SNF	To.Solids	ML - pH	ML - SH	čas	pevnost	kv.syr.
<i>n</i>	23	23	23	23	23	23	23
<i>x</i>	8,51	12,20	6,59	5,98	83,70	1,87	3,30
<i>g</i>							
<i>sx_v</i>	0,288	0,826	0,085	1,405	33,751	0,076	0,876
<i>vx_v</i>	3,4	6,8	1,3	23,5	40,3	4,1	26,5
<i>sx</i>	0,282	0,808	0,083	1,374	33,009	0,075	0,856
<i>vx</i>	3,3	6,6	1,3	23,0	39,4	4,0	25,9
<i>min</i>	8,02	10,52	6,47	3,67	44,00	1,70	1,00
<i>max</i>	8,98	14,13	6,83	8,95	178,00	2,00	4,00
<i>Rmax-min</i>	0,96	3,61	0,36	5,28	134,00	0,30	3,00
<i>medián</i>	8,52	12,16	6,57	5,56	74,00	1,90	4,00
<i>horní q</i>	8,29	11,59	6,53	5,12	62,00	1,80	3,00
<i>dolní q</i>	8,74	12,59	6,64	6,84	99,00	1,90	4,00

Celkem	objem syr.	Jog - SH	STR 10 ⁷	log STR 10 ⁷	LACTO 10 ⁶	log LACTO 10 ⁶
<i>n</i>	23	23	23	23	23	23
<i>x</i>	32,65	33,10	656 521 739	8,7131	79 739 130	7,8124
<i>g</i>				516535292		64923212
<i>sx_v</i>	5,104	5,797	490 367 290	0,3482	62 507 612	0,2635
<i>vx_v</i>	15,6	17,5	74,7		78,4	
<i>sx</i>	4,992	5,670	479 588 671	0,3406	61 133 651	0,2577
<i>vx</i>	15,3	17,1	73,0		76,7	
<i>min</i>	15,00	17,39	50 000 000	7,6990	30 000 000	7,4771
<i>max</i>	38,00	41,19	2 600 000 000	9,4150	260 000 000	8,4150
<i>Rmax-min</i>	23,00	23,80	2 550 000 000	1,7160	230 000 000	0,9379
<i>medián</i>	34,00	34,16	540 000 000	8,7324	60 000 000	7,7782
<i>horní q</i>	30,00	28,37	465 000 000	8,6675	39 500 000	7,5963
<i>dolní q</i>	36,00	36,45	715 000 000	8,8535	80 500 000	7,9054

Kravské mléko rok 2020

Celkem	CPM	log CPM	SB	log SB	Fat	Protein	Caseine
<i>n</i>	24	24	24	24	24	24	24
<i>x</i>	9 292	3,7504	195	2,2568	4,29	3,34	2,64
<i>g</i>		5629		181			
<i>sx_v</i>	9 281	0,4730	74	0,1817	0,432	0,213	0,241
<i>vx_v</i>	99,9		37,9		10,1	6,4	9,1
<i>sx</i>	9 085	0,4631	73	0,1779	0,423	0,209	0,236
<i>vx</i>	97,8		37,4		9,9	6,3	8,9
<i>min</i>	1 000	3,0000	53	1,7243	3,67	2,90	2,18
<i>max</i>	38 000	4,5798	412	2,6149	5,14	3,76	3,10
<i>Rmax-min</i>	37 000	1,5798	359	0,8906	1,47	0,86	0,92
<i>medián</i>	6 000	3,7721	187	2,2719	4,23	3,36	2,65
<i>horní q</i>	3 000	3,4771	153	2,1838	3,96	3,23	2,45
<i>dolní q</i>	11 500	4,0510	225	2,3513	4,65	3,49	2,78

Celkem	Lacto.	SNF	To.Solids	Urea	BMM	ML - pH
<i>n</i>	24	24	24	24	24	24
<i>x</i>	5,05	9,00	13,18	39,43	-0,5277	6,70
<i>g</i>						
<i>sx_v</i>	0,101	0,209	0,409	6,690	0,0050	0,040
<i>vx_v</i>	2,0	2,3	3,1	17,0	0,9	0,6
<i>sx</i>	0,098	0,205	0,400	6,549	0,0049	0,039
<i>vx</i>	1,9	2,3	3,0	16,6	0,9	0,6
<i>min</i>	4,90	8,56	12,60	27,79	-0,5400	6,63
<i>max</i>	5,27	9,33	14,10	55,96	-0,5197	6,76
<i>Rmax-min</i>	0,37	0,77	1,50	28,17	0,0203	0,13
<i>medián</i>	5,04	9,00	13,13	38,78	-0,5300	6,71
<i>horní q</i>	4,99	8,90	12,90	35,82	-0,5300	6,66
<i>dolní q</i>	5,09	9,12	13,49	42,66	-0,5249	6,73

Kozí mléko rok 2020

Celkem	CPM	log CPM	SB	log SB	Fat	Protein	Caseine
<i>n</i>	24	24	24	24	24	24	24
<i>x</i>	646 583	4,5057	1 062	2,8588	3,35	2,96	2,32
<i>g</i>		32041		722			
<i>sx_v</i>	1 691 050	1,1820	849	0,4178	0,602	0,235	0,259
<i>vx_v</i>	261,5		79,9		18,0	7,9	11,2
<i>sx</i>	1 655 445	1,1571	831	0,4090	0,589	0,230	0,253
<i>vx</i>	256,0		78,2		17,6	7,8	10,9
<i>min</i>	1 000	3,0000	145	2,1614	1,82	2,56	1,79
<i>max</i>	7 900 000	6,8976	3 015	3,4793	4,60	3,35	2,78
<i>Rmax-min</i>	7 899 000	3,8976	2 870	1,3179	2,78	0,79	0,99
<i>medián</i>	25 000	4,3891	743	2,8688	3,36	2,97	2,32
<i>horní q</i>	3 750	3,5709	348	2,5395	3,02	2,76	2,23
<i>dolní q</i>	170 000	5,2283	1 713	3,2337	3,65	3,18	2,48

Celkem	Lacto.	SNF	To.Solids	Urea	BMM	ML - pH
<i>n</i>	24	24	24	24	24	24
<i>x</i>	4,54	8,38	11,65	45,22	-0,5600	6,57
<i>g</i>						
<i>sx_v</i>	0,122	0,330	0,769	21,539	0,0264	0,260
<i>vx_v</i>	2,7	3,9	6,6	47,6	4,7	4,0
<i>sx</i>	0,119	0,323	0,753	21,086	0,0258	0,254
<i>vx</i>	2,6	3,9	6,5	46,6	4,6	3,9
<i>min</i>	4,32	7,88	9,72	23,10	-0,6800	5,40
<i>max</i>	4,82	9,10	13,03	80,99	-0,5400	6,79
<i>Rmax-min</i>	0,50	1,22	3,31	57,89	0,1400	1,39
<i>medián</i>	4,54	8,38	11,75	33,85	-0,5550	6,62
<i>horní q</i>	4,46	8,07	11,26	26,67	-0,5600	6,55
<i>dolní q</i>	4,61	8,56	12,14	67,95	-0,5500	6,66

Příloha č. 3

Výsledky externí validace

Využití meze pro vysokou pasteraci		Využití meze pro šetrnou pasteraci	
Číslo vzorku	Výsledek	Číslo vzorku	Výsledek
Zaslepený vzorek 1	True Positive	Zaslepený vzorek 1	True Positive
Zaslepený vzorek 2	True Positive	Zaslepený vzorek 2	True Positive
Zaslepený vzorek 3	True Positive	Zaslepený vzorek 3	True Positive
Zaslepený vzorek 4	True Positive	Zaslepený vzorek 4	True Positive
Zaslepený vzorek 5	True Positive	Zaslepený vzorek 5	True Positive
Zaslepený vzorek 6	True Positive	Zaslepený vzorek 6	True Positive
Zaslepený vzorek 7	True Positive	Zaslepený vzorek 7	True Positive
Zaslepený vzorek 8	True Positive	Zaslepený vzorek 8	True Positive
Zaslepený vzorek 9	True Positive	Zaslepený vzorek 9	True Positive
Zaslepený vzorek 10	True Positive	Zaslepený vzorek 10	True Positive
Zaslepený vzorek 11	True Positive	Zaslepený vzorek 11	True Positive
Zaslepený vzorek 12	True Positive	Zaslepený vzorek 12	True Positive
Zaslepený vzorek 13	True Positive	Zaslepený vzorek 13	True Positive
Zaslepený vzorek 14	True Positive	Zaslepený vzorek 14	True Positive
Zaslepený vzorek 15	True Positive	Zaslepený vzorek 15	True Positive
Zaslepený vzorek 16	True Positive	Zaslepený vzorek 16	True Positive
Zaslepený vzorek 17	True Positive	Zaslepený vzorek 17	True Positive
Zaslepený vzorek 18	True Positive	Zaslepený vzorek 18	True Positive
Zaslepený vzorek 19	True Positive	Zaslepený vzorek 19	True Positive
Zaslepený vzorek 20	True Positive	Zaslepený vzorek 20	True Positive
Zaslepený vzorek 21	True Positive	Zaslepený vzorek 21	True Positive
Zaslepený vzorek 22	True Positive	Zaslepený vzorek 22	True Positive
Zaslepený vzorek 23	True Positive	Zaslepený vzorek 23	True Positive
Zaslepený vzorek 24	True Positive	Zaslepený vzorek 24	True Positive
Zaslepený vzorek 25	True Positive	Zaslepený vzorek 25	True Positive
Zaslepený vzorek 26	True Positive	Zaslepený vzorek 26	True Positive
Zaslepený vzorek 27	True Negative	Zaslepený vzorek 27	True Negative
Zaslepený vzorek 28	True Negative	Zaslepený vzorek 28	True Negative
Zaslepený vzorek 29	True Negative	Zaslepený vzorek 29	True Negative
Zaslepený vzorek 30	True Negative	Zaslepený vzorek 30	True Negative
Zaslepený vzorek 31	True Negative	Zaslepený vzorek 31	True Negative
Zaslepený vzorek 32	True Negative	Zaslepený vzorek 32	False Positive