



číslo metodiky: 1920222-V5

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Detekce falšování kozího a ovčího mléka
kravským mlékem metodou MALDI-TOF MS

Autorský kolektiv:

Lucie Rysová, Pavel Cejnar, Oto Hanuš, Matěj Božik, Veronika Legarová,
Hana Nejeschlebová, Irena Němečková

ISBN: 978-80-213-3154-9

Prosinec 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 2022

ISBN: 978-80-213-3154-9

Podíl autorů na tvorbě certifikované metodiky:

Ing. Lucie Rysová¹

RNDr. Mgr. Pavel Cejnar, Ph.D.²

prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.³

Ing. Matěj Božik, Ph.D.¹

Ing. Veronika Legarová, Ph.D.¹

Mgr. Hana Nejšlechbová³

Ing. Irena Němečková, Ph.D.³

¹Katedra kvality a bezpečnosti potravin, Česká zemědělská univerzita v Praze

²Ústav počítačové a řídicí techniky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

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

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

1) Odborník z daného oboru: MVDr. Šimon Friedrich; Státní veterinární ústav Jihlava

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 kozího 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	8
3.6 Závěrečné shrnutí	15
4. Srovnání „novosti postupů“	16
5. Popis uplatnění metodiky	18
6. Ekonomické aspekty	19
7. Seznam použité související literatury	20
8. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány	22
9. Jména oponentů a názvy jejich organizací	23
10. Příloha	24

1. Současný stav problematiky

Falšování je obecně rozšířená lidská činnost motivovaná komerčními zájmy, vedoucí obvykle k přisouzení 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 přeživkavců, 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 a ovčím mlékem je celoročně dostupné a levnější. Nutno podotknout, že toto falšování nemusí být realizováno pouze s vidinou většího ekonomického profitu, ale také kvůli přijatelnějším sensorickým vlastnostem. Kravské mléko totiž z části potlačí typickou chuť a vůni kozího i ovčího mléka. I přestože nejsou použity žádné cizorodé látky, ale pouze jiný živočišný druh mléka, dopad na lidské 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, Oliveira, & Ā, 2007; Pesic et al., 2011; Ren et al., 2014; Teixeira, Caramês, Baptista, Gigante, & Pallone, 2020; Trimboli et al., 2019; Tsakali et al., 2019). 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 detekce falšování kozího a ovčího mléka kravským mlékem metodou hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací v přítomnosti matrice v kombinaci s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF MS).

3. Vlastní popis metodiky

3.1 Princip metody

Metoda je založena na porovnání peptido-proteinového spektra neznámého vzorku se souborem vytvořeným z koncentračních řad falšovaných mlék. Následně je pomocí statistického modelu odhadnuto procento falšování zkoumaného vzorku.

3.2 Potřebný materiál a chemikálie

- Centrifugační zkumavky o objemu 15 ml a 1,5 ml
- Ultračistá voda
- Matrice pro MALDI roztok kyseliny alfa-kyano-4-hydroxyskořicové (acetonitril 50 %, voda 47,5 % a kyselina trifluoroctová 2,5 %; 10 mg/ml alfa-kyano-4-hydroxyskořicové - HCCA)
- MALDI destička z broušené oceli*
* v závislosti na použitém přístroji
- Kalibrační roztoky Bacterial Test Standard (Bruker #255343) a Peptide Calibration Standard II (Bruker #8222570)

3.3 Přístrojové vybavení a software

- Pipety od 1 do 1000 µl
- Laboratorní centrifuga s vhodným rotorem na 15 ml a 1,5 ml zkumavky
- Orbitální třepačka
- Spektrometr MALDI-TOF s lineárním průletovým detektorem (Bruker Autoflex Speed, nebo podobný)

- Software pro akvizici spekter
- Software R (R Core Team), software je zdarma a ke stažení např. zde:
 - <https://mirrors.nic.cz/R/>
 - <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>
- Softwarový nástroj pro kvantifikaci: <https://zenodo.org/record/6603207#.YqhSPITP1hE>

3.4 Pracovní postup

Odběr vzorku mléka

Odebrány jsou minimálně 2 ml zhomogenizovaného reprezentativního vzorku mléka, s tím, že 1 ml je použit pro hlavní analýzu a 1 ml slouží jako rezerva. Přeprava je vždy zajištěna při teplotě <4 °C, aby nedošlo k rozvoji patogenních mikroorganismů, či jiným fyzikálně-chemickým změnám. Při odběru mléka musí být vždy zaznamenáno, o jaký typ pasterace se jedná, aby mléko bylo správně vyhodnoceno, jelikož skript ve statistickém modelu byl vytvořen zvlášť pro šetrnou pasteraci a zvlášť pro vysokou pasteraci, a to z důvodu přítomnosti termolabilních proteinů a vzniku nových peptidů během tepelného ošetření.

Příprava vzorku pro analýzu MALDI-TOF MS

1. Jeden mililitr vzorku je odpipetován do centrifugační zkumavky a centrifugován při takové odstředivé síle a teplotě, aby se řádně oddělil mléčný tuk (doporučení: 24 900 x g po dobu 15 minut při teplotě 4 °C),
 2. následně se reprezentativní vzorek mléčné plazmy smíchá v poměru 1:1 s ultračistou vodou a je homogenizován na homogenizátoru po dobu 10 sekund*,
- * při větším množství vzorků lze pro ředění využít mikrotitrační destičky
3. na připravenou čistou MALDI destičku se nanese 1 µl připravené směsi, který se při pokojové teplotě nechá zaschnout,
 4. po zaschnutí se vzorek překryje 1 µl roztoku matrice a při pokojové teplotě se nechá zaschnout,
 5. ihned po zaschnutí je MALDI destička uchycena do ocelového nosiče a provede se akvizice hmotnostních spekter,
 6. během celé přípravy vzorku je nutností dodržovat základní pravidla bezpečnosti práce v laboratoři a používat žádoucí laboratorní ochranné pomůcky.

Analýza vzorků pomocí MALDI-TOF MS

Před samotným měřením je nutné vytvořit a kalibrovat novou metodu, která vychází ze základní metody pro Biotyper (MBT_FC). Hmotnostní spektra jsou měřena v rozmezí m/z

od 500 do 4000 Da v lineárním pozitivním módu s následujícími parametry: napětí ve zdroji IS1 19890 V a IS2 18450, napětí na čočce 6000 V. Celkově je shromážděno 6000 výstřelů ve 200 krocích a každý vzorek je změřen 3krát. Pro kalibraci metody byly použity standardy zmíněné výše. Nastavení se může lišit podle použitého přístrojového vybavení, ale měl by být zachován rozsah 500 až 4000 Da.

Zpracování a vyhodnocení získaných dat

Následně je ze softwaru flexAnalysis vygenerován textový soubor (.txt) s intenzitou a rozmezím (m/z) analyzovaných vzorků mléka*. Výstupní soubory s příponou .txt by měly obsahovat právě dva sloupce, jejichž hodnoty jsou oddělené tabulátorem, sloupce neobsahují záhlaví, tzn. na prvním řádku je očekávána již hodnota. Následně soubory nakopírujeme do adresáře určeného pro vyhodnocování (tam kde je nainstalovaný soubor WorkspaceWithLoadedScript.RData). Výpočetní prostředí R se spustí dvojklikem na soubor WorkspaceWithLoadedScript.RData (přípona.RData je asociována se spouštěním v prostředí R for Windows), jenž obsahuje paměťový obraz s již nahranými skripty. Následně se na příkazovém řádku prostředí R musí zadat příkaz:

vypoctiKoncentraci_Koza_VysokaPasterace("jméno textového souboru s intenzitami.txt") a stisknete Enter**. Příkaz po krátké době (max. do 1 minuty) vypíše na obrazovku předpokládanou hodnotu příměsi kravského mléka (v procentech) v kozím pasterovaném mléce s vysokou pasterací. Tuto hodnotu také vepíše do textového souboru ve stejném adresáři a pojmenovaném stejně jako vstupní soubor, ale navíc s příponou *.vysledek.Koza.VysokaPasterace.txt. Podobně je možné volat skripty:

- vypoctiKoncentraci_Koza_SetrnaPasterace("jméno textového souboru.txt")
- vypoctiKoncentraci_Ovce_VysokaPasterace("jméno textového souboru.txt")
- vypoctiKoncentraci_Ovce_SetrnaPasterace("jméno textového souboru.txt")

pro další predikce. Hodnota je vždy vypsána jak do prostředí R (ze kterého je možné kopírovat), tak do samostatného souboru s adekvátní příponou. Současně je do adresáře zapsán i soubor s příponou *.templateMatch.Koza.VysokaPasterace.png. V tomto souboru je výsledek registrace naměřeného spektra (červená křivka) na šablonu spekter (černá křivka). Pokud by červená křivka neobsahovala žádné píky, či pouze píky v záporném směru, naměřené spektrum vykazovalo extrémní odlišnosti a predikovaná hodnota není validní – v daném případě by bylo nutné vzorek opět přeměřit na MALDI-TOF MS. Všechny skripty byly testovány pro prostředí R 4.0 (64-bit) a R 4.1 (64-bit).

*software se může lišit dle použitého přístrojového vybavení

** uvnitř závorek okolo jména souboru zadávaného do příkazu je třeba důsledně psát (počítačové) uvozovky, alternativně lze i apostrofy.

Kritické body

Kritické body při aplikaci metody MALDI-TOF MS pro odhalování falšování jsou následující:

- Skladování a přeprava vzorků mléka: během přepravy a skladování vzorků mléka teplota nesmí přesáhnout 4 °C;
- před samotnou analýzou je důležité určit, jaký typ pasterace byl proveden, tak aby byl správně zvolen skript ve statistickém programu;
- správně provedená kalibrace dle návodu k použití IVD Bacterial Test Standad a Peptide Calibration Standard II;
- po naměření je třeba spektra zkontrolovat, pokud bude naměřeno spektrum pouze s nulovými hodnotami, je třeba jej přeměřit.

Reprodukovatelnost metody

MALDI-TOF MS je celosvětově uznávaná a spolehlivá metoda používaná zvláště pro klasifikaci a identifikaci mikroorganismů, a také při kontrole kvality potravin. Maier et al. (2006) uvedli, že reprodukovatelnost této metody je pozoruhodná, a to na základě robustnosti, která byla prokázána pro širokou škálu podmínek. Rovněž potvrdili, že v případě zajištění standardizovaných podmínek přípravy vzorků a měření lze mezi jednotlivými laboratořemi získávat srovnatelná spektra.

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 a ovcí 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, 5 stád ovcí a 6 stád koz. Vybraná stáda se nacházela v nadmořské výšce: krávy 339±100 m (od 227 m do 474 m); ovce 425±80 m (od 300 m do 498 m); kozy 337±89 m (od 240 m do 474 m). Plemenný profil jednotlivých stád vykazoval následující relativní plemenné zastoupení – stáda dojnic: 83 % holštýnské a 17 % české strakaté; stáda ovcí: 70 % lacaune, 20 % cighája, 10 % východofříská ovce; stáda koz: 59 % bílá krátkosrstá koza, 29 % hnědá krátkosrstá koza, 12 % anglonúbijská koza. Výběr plemen se odvíjel od typického profilu dojených krav, ovcí 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 doživosti během léta u ovcí a koz. Tudíž bylo vzorkováno dvakrát během května (první polovina laktace) a dvakrát během srpna (druhá polovina laktace). Během roku bylo tímto způsobem odebráno 24 vzorků čistého kravského mléka, 23 vzorků čistého koziho mléka a 24 vzorků ovčího mléka. V roce 2020 proběhlo obdobné vzorkování, odebráno bylo 24 vzorků čistého kravského mléka, 24 vzorků čistého koziho mléka a 24 vzorků čistého ovčího mléka.

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, ovčího a koziho 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 (°C); aktivní kyselost (pH); titrační kyselost (dle Soxhlet-Henkela, SH); syřitelnost jako 1) čas koagulace mléka syřidlem v sekundách (čas), jako 2) pevnost syřeniny (pevnost) v cm jako opačná hodnota, jako 3) kvalita syřeniny aspekci a palpací ve třídách 1 výborná až 4 nejhorší, a jako 4) objem vypužené 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 koziho a ovčího mléka

Kozí a ovčí mléko bylo porušeno kravským mlékem v poměrech uvedených v Tabulce 1.

Tabulka 1. Poměry kravského a kozího/ovčího mléka při falšování – základní škála

Kravské (%)	Kozí/Ovčí (%)
0	100
0,5	99,5
1	99
5	95
10	90
20	80
40	60
60	40
80	20
100	0

Tepelné ošetření mléka

Odebrané čisté vzorky kravského, kozího a ovčího mléka a taktéž vzorky kozího a ovčího mléka, které byly porušeny kravským mlékem (rok 2019), byly pasterovány vsádkovým způsobem ve vodní lázni k dosažení 85 °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 za dvora“. V roce 2020 byl zvolen jiný typ tepelného ošetření, konkrétně šetrná pasterace při teplotě 72 °C po dobu 15 sekund. 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.

Statistické vyhodnocení základních mléčných ukazatelů

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, a také kravského a ovčího mléka párovým t-testem v Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA). Základní statistické charakteristiky a výsledné *p*-hodnoty poukázaly na způsobilost použitých vzorků k provedení studie identifikace falšování kozího a ovčího mléka v daných geografických podmínkách.

Příprava vzorku pro MALDI-TOF MS

Viz výše (str. č. 6).

Analýza vzorků pro MALDI-TOF MS

Analýza MALDI-TOF MS byla provedena pomocí přístroje Autoflex Speed (Bruker Daltonics), který byl vybaven laserem SmartBeam™ II (355 nm) a softwarem flexControl (verze 3.4 Build 135, Bruker Daltonics). Pro měření byly vyvinuty a použity dvě lineární pozitivní metody s různými hmotnostními rozsahy a různou akumulací spekter. Konkrétně se měřila tato rozmezí: 500–4000 Da a 4–20 kDa. Metoda pro nízkomolekulární proteiny (označená jako 500–4000 Da) byla měřena s následujícími parametry: IS1 19890 V, IS2 18450 V, napětí čočky 6000 V; 6000 výstřelů ve 200 krocích. Metoda s větším rozsahem (označená jako 4–20 kDa) byla měřena s následujícími parametry: IS1 19500 V, IS2 18300 V, čočky 7000 V, 8000 výstřelů ve 200 krocích, které získávají rozsah přibližně 3–17,6 kDa. Každý vzorek mléka byl měřen třikrát. Pro kalibraci metody byl použit *Bruker Bacterial Test Standard* (Bruker Daltonics) a *Peptide Calibration Standard II* (Bruker Daltonics); ppm chyba byla 1–7. Oba standardy společně pokryly celý rozsah měření od 500 do 17 000 Da.

Předzpracování a registrace peptido-proteinových spekter

Před samotnou analýzou dat pomocí regresních modelů byla hmotnostní spektra mléčných vzorků předzpracována (oříznuta a vyhlazena) a registrována vůči šabloně (normalizována a případně jemně posunuta). Po registraci bylo nutné odstranit spektra, u kterých byly zjištěny anomálie v množství přítomného šumu, a také byla po vizuální kontrole odstraněna spektra, která vykazovala extrémní odchylky v registracích. Nutností bylo také odstranit spektra, která se odchýlila od polohy ostatních dvou spekter z trojice opakování, nebo celý vzorek (trojici opakování) v případě, že se spektra odchýlila od polohy ostatních spekter v rámci série s rostoucí koncentrací přidaného kravského mléka (myšlena je série, která byla vytvořena v rámci jednoho páru kravské mléko + kozi/ovčí mléko). Všechna takto odstraněná spektra zabírala maximálně jednotky procent z celkového počtu pořízených spekter.

Statistické vyhodnocení regresními modely

Ke kvantifikaci falšování mléka malých přežvýkavců, která byly ošetřeny vysokou pasterací, byly použity dva regresní modely, a to GLM-Lasso (Generalized Linear Model with Lasso regularization; Tibshirani, 1996) a PLS (Partial Least Squares; Wold et al., 2001). Oba modely byly aplikovány na naměřená data (určeny jejich optimální hyperparametry) v softwaru R (verze 4.0.3; R Core Team, 2020) pomocí balíčků 'caret' (6.0.86), 'pls' (2.7.3), 'glmnet' (4.0.2). Z balíčku 'caret' byla použita funkce 'train', přičemž jako předzpracování bylo zvoleno odstranění nulových hodnot a centrování, jako metrika byla zvolena RMSE (Root mean square error – střední kvadratická chyba) a jako výběrová funkce pro určení optimálních hodnot

hyperparametrů byla testována "best" a "oneSE". Pro výběr optimálních hodnot hyperparametrů byla použita křížová validace (dvě různá schémata). Pro model PLS byl jako hyperparametr optimalizován počet latentních proměnných (1 až 10). Pro model GLM-Lasso byl parametr alfa balíčku "glmnet" nastaven na 1 (regularizace typu L1), a hodnota hyperparametru lambda byla optimalizována přes 81 různých hodnot rovnoměrně rozložených v logaritmickém prostoru v intervalu od 10^5 do 10^{-3} . Pro testování kvantifikačních modelů se změřená hmotnostní spektra rozdělila do šesti různých setů mléčných vzorků – A, B, souhrnný set AB, C, A+ a C+. Sety zahrnovaly předem určené koncentrace přídatku kravského mléka a zvolený počet vzorků. Tyto sety byly vytvořeny samostatně pro kozí mléko s přídatkem kravského a samostatně pro ovčí mléko s přídatkem kravského. V průběhu testování bylo nutností nejprve nakalibrovat optimální hodnoty hyperparametrů obou regresních modelů. V rámci obou výsledných optimalizovaných regresních modelů (PLS a GLM-Lasso) byla testována schopnost kvantifikace objemu přidaného kravského mléka, a také citlivost metody MALDI-TOF MS. Finální hodnoty RMSE byly stanoveny pro obě testovaná rozmezí akvizičního intervalu (500–4000 Da, 4–20 kDa), aby bylo možné posoudit, který z nich má pro náš cíl větší upotřebitelnost.

Testování regresních modelů bylo zahájeno kalibrací, kdy se pracovalo se směsmi o koncentraci přidaného kravského mléka 20 %; 40 %; 60 % a 80 %. Po kalibraci byly do testování zařazeny i další sety zahrnující čistá mléka společně se směsmi o koncentraci přídatku kravského mléka 0,5 %; 1 %; 5 % a 10 %. Na základně získaných RMSE bylo zjištěno, že nejlepší pro náš cíl bude mít největší využitelnost regresní model GLM-Lasso s určováním optimálních hodnot hyperparametrů pomocí výběrové funkce "oneSE" a schématem křížové validace leave-one-random_concentration_from_series-out (označováno v tabulkách jako LO-RC-OCV) pracující s rozmezím akvizičního intervalu 500–4000 Da, jak je patrné z Tabulky č. 2. RMSE predikovaných hodnot koncentrace u falšovaných mléčných vzorků (vysoká pasterace) natrénovaného finálního modelu na testovacím setu byla 11,4 % u kozího a 17,0 % u ovčího mléka. Podrobná srovnání testovaných parametrů a příslušné RMSE jsou dostupná na vyžádání u autorů, nebo v příloze vědecké publikace výše zmíněného autorského kolektivu ([10.5281/zenodo.6351584](https://doi.org/10.5281/zenodo.6351584)). Statistické vyhodnocení proběhlo také u souboru mlék, která byla ošetřena šetrnou pasterací. Volba parametrů byla obdobná jako u prvního testovaného souboru ošetřeného vysokou pasterací. Příslušné RMSE jsou uvedeny v Tabulce č. 3. Jak je patrné z tabulky RMSE predikovaných hodnot koncentrace u falšovaných vzorků natrénovaného finálního modelu na testovacím setu byla 10,0 % u kozího mléka a 10,9 % u ovčího mléka.

Tabulka č. 2 Střední kvadratická chyba (RMSE) predikovaných vzorků falšovaného mléka koz a ovčí (ošetřená vysokou pasterací) s použitím vybraného testovacího a trénovacího setu. Jsou zahrnuty výsledky pro obě schémata křížového validace (LO-RC-OCV vs. LO-S-OCV) a pro obě rozmezí akvizičního intervalu hmotnostních spekter (500–4000 Da vs. 4–20 kDa).

Falšované mléko, GLM-Lasso – funkce výběru oneSE, lineární registrace, vysoká pasterace				
Falšované mléko	Kozí mléko		Ovčí mléko	
Akviziční interval	500–4000 Da	4–20 kDa	500–4000 Da	4–20 kDa
Průměrná křížově ověřená RMSE na trénovacím setu (LO-RC-OCV)*	10,8 ± 2,78	11,1 ± 2,87	9,94 ± 3,06	13,7 ± 3,82
Průměrná křížově ověřená chyba RMSE na trénovacím setu (LO-S-OCV)*	11,3 ± 2,80	11,2 ± 2,93	10,8 ± 3,39	14,0 ± 3,80
RMSE trénovacího finálního modelu (LO-RC-OCV) na trénovacím setu	7,58	9,54	7,23	11,5
RMSE trénovacího finálního modelu (LO-S-OCV) na trénovacím setu	8,01	9,84	9,07	12,7
RMSE trénovacího finálního modelu (LO-RC-OCV) na testovacím setu	11,4	12,6	17,0	18,6
RMSE trénovacího finálního modelu (LO-S-OCV) na testovacím setu	11,5	12,6	16,4	18,9

*průměrná RMSE ± one SE (výběrová funkce)

Tabulka č. 3 Střední kvadratická chyba (RMSE) predikovaných vzorků falšovaného mléka koz a ovčí (ošetřená šetrnou pasterací) s použitím vybraného testovacího a trénovacího setu. Jsou zahrnuty výsledky pro obě schémata křížového validace (LO-RC-OCV vs. LO-S-OCV) a pro rozmezí akvizičního intervalu hmotnostních spekter 500–4000 Da.

Falšované mléko, GLM-Lasso – funkce výběru oneSE, lineární registrace, šetrná pasterace		
Falšované mléko	Kozí mléko	Ovčí mléko
Akviziční interval	500–4000 Da	
Průměrná křížově ověřená RMSE na trénovacím setu (LO-RC-OCV)*	10,6 ± 6,75	10,3 ± 6,60
Průměrná křížově ověřená chyba RMSE na trénovacím setu (LO-S-OCV)*	12,1 ± 7,32	11,1 ± 6,24
RMSE trénovacího finálního modelu (LO-RC-OCV) na trénovacím setu	7,30	9,97
RMSE trénovacího finálního modelu (LO-S-OCV) na trénovacím setu	8,40	10,7
RMSE trénovacího finálního modelu (LO-RC-OCV) na testovacím setu	10,0	10,9
RMSE trénovacího finálního modelu (LO-S-OCV) na testovacím setu	9,90	11,7

*průměrná RMSE ± one SE (výběrová funkce)

Vzhledem k vyšší dosažené RMSE následovalo další vyhodnocování. V případě, že cílem byla klasifikace se stanovenou prahovou hodnotou (max. 10 % přidaného kravského mléka), bylo možné určit s 90,7% přesností, zda je vzorek kozího mléka falšován do či nad tuto prahovou hodnotu. U ovčího mléka pak klasifikace se stanovenou prahovou hodnotou (max. 10 % kravského mléka) dosáhla 93,3 %. Nicméně cílem této metodiky nebylo vyvinout klasifikační metodu, ale metodu kvantifikační, která by predikovala procento kravského mléka v kozím a ovčím mléku. Tudíž byl testován další model na omezené koncentrační škále od 10 % do 80 % s cílem snížit RMSE. U tohoto modelu RMSE kvantifikace klesla, jak u kozího mléka, tak i u ovčího mléka, což lze již považovat za velmi dobré výsledky.

Testování zaslepených vzorků mléka

Prostřednictvím zaslepených vzorků zahrnující kozí a ovčí mléko s různými přídavky kravského mléka byl testován finální statistický model určený k predikci koncentrace kravského mléka. Testované zaslepené vzorky, druh mléka a koncentrace kravského mléka jsou uvedeny v Tabulce č. 4.

Tabulka č. 4 Vyhodnocení testování predikce koncentrace kravského mléka v kozím a ovčím mléku

Číslo testovaného vzorku	Druh mléka	Přídavek kravského mléka (%)	Predikce (%)
1	ovčí mléko	20	33
2	ovčí mléko	40	46
3	ovčí mléko	50	52
4	ovčí mléko	60	60
5	ovčí mléko	40	65
6	ovčí mléko	20	27
7	ovčí mléko	40	38
8	ovčí mléko	50	41
9	ovčí mléko	60	47
10	kozí mléko	10	6
11	kozí mléko	30	39
12	kozí mléko	0	nehodnoceno*
13	kozí mléko	5	5
14	kozí mléko	20	17
15	kozí mléko	10	11
16	kozí mléko	20	25
17	kozí mléko	50	57
18	kozí mléko	100	84

*vyhodnoceno jako prázdné spektrum – nutnost přeměřit

3.6 Závěrečné shrnutí

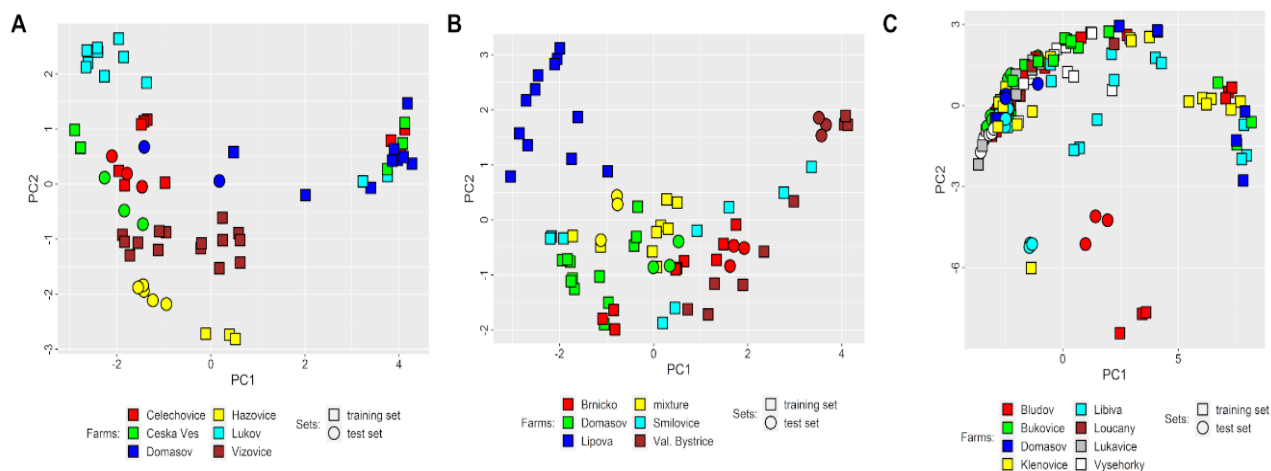
Samotný vývoj metodiky byl postaven na komplexní mléčné matrici, která reprezentovala variabilitu kozího, ovčího a kravského mléka na českých farmách. Původně byl jako finální model zamýšlen takový, který by zahrnoval veškeré testované koncentrace kravského mléka v kozím a ovčím mléku. Vzhledem k vysoké RMSE byly nakonec koncentrace omezeny na 10 %; 20 %; 40 %; 60 % a 80 %, čímž se podařilo dosáhnout nižší chyby i se zachováním možnosti predikce kvantifikace. Na základě výše uvedeného faktu kolektiv autorů metodiky doporučuje využití této kvantifikační metody v kombinaci s klasifikační metodou jako je polymerázová řetězová reakce či imunochemická nebo elektroforetická metoda, které jsou schopny detekovat i velmi malý přídavek kravského mléka v kozím či ovčím mléku. V případě potvrzení přídavku kravského mléka, lze pak v druhém kroku analýzy velmi rychle predikovat pomocí metody MALDI-TOF MS a statistického modelu procentuální obsah kravského mléka, a tak rozlišit neúmyslnou kontaminaci a cílený podvod.

4. Srovnání „novosti postupů“

V posledních letech bylo vyvinuto několik metod založených na MALDI-TOF MS, které hodnotily pravost mléka, a i některých mléčných výrobků. Oblíbenost této metody je dána především faktem, že oproti jiným analytickým metodám nabízí výhody jako rychlé generování spekter s rychlou a snadnou přípravou vzorku, absence čištění analytu či chemické modifikace (Cozzolino & De Giulio, 2011; Zambonin, 2021).

Jedním z nejčastějších podvodů v mlékařském sektoru je stále míšení levnějšího a celoročně dostupného mléka – kravského s dražším a sezonně dostupným mlékem – ovčím a kozím. Tento trend reflektují i vědecké studie, které byly publikovány v 21. století a jsou zaměřeny právě na tuto problematiku. Potenciál MALDI-TOF MS potvrdili Calvano et al. (2012, 2013). Ti ve své první publikaci odhalili přídavek 5 % kravského mléka v kozím a ovčím mléku pomocí specifických peptidových markerů, které získali z hmotnostních spekter mléka po tryptickém štěpení. Autoři však krom potvrzení závislosti mezi úrovní falšování a relativní intenzity peptidových markerů kravského mléka neprovedli další kroky ve vývoji metodiky. Ve své druhé publikaci se autoři již nezaměřovali na peptidy, nýbrž na fosfolipidy. Hmotnostní profily fosfolipidů mléka použili k získání dvou píků jejichž poměr intenzity využili k detekci kravského mléka v kozím a ovčím mléku. Poměr těchto píků umožnil odhalit pouze 20 % a více kravského mléka v mléce malých přežvýkavců. Liland et al. (2009) zvolili podobný přístup k odhadu relativních podílů kravského mléka v kozím a ovčím mléku jako kolektiv autorů této metodiky. Pro kvantitativní analýzu použili rovněž celá hmotnostní spektra a vícerozměrnou regresi, která vycházela ze tří samostatných regresních modelů PLS. Liland et al. (2009) prokázali, že MALDI-TOF MS má velký potenciál pro kvantitativní analýzu bez nutnosti porovnávání jednotlivých peptido-proteinových biomarkerů, a to s RMSE 5,40 % pro ovčí mléko a 6,50 % pro kozí mléko. Vícerozměrné statistické metody použili ke stanovení procentuálního objemu kravského mléka v kozím a ovčím mléku i Nicolaou et al. (2011). Ti testovali dva regresní modely, konkrétně lineární PLS a nelineární Kernel PLS. Regresní model Kernel PLS mírně překonal PLS s hodnotami RMSE 6,35 % pro kozí mléko a 8,13 % pro ovčí mléko. Jak je patrné v kapitole č. 3 RMSE našich regresních modelů dosahují vyšších hodnot v porovnání s přechozími vědeckými publikacemi. Tyto vyšší hodnoty RMSE jsou s největší pravděpodobností způsobeny širokým souborem mléčných vzorků, které byly do testování zahrnuty. Celkově byly vzorky kravského, kozího a ovčího mléka odebrány z 18 českých farem nacházející se ve třech různých regionech. Viditelné nehomogenní rozložení peptido-proteinových spekter čistých mlék je patrné z Grafu č. 1 u všech tří druhů testovaných mlék.

Graf č. 1 Analýzy hlavní komponent (PCA) hmotnostních spekter čistých kravských, kozích a ovčích mlék použitých z konkrétního trénovacího a testovacího setu (mléčné vzorky ošetřené vysokou pasterací, jednotlivé barvy reprezentují konkrétní farmy nebo směsi)



Tato komplexnost mléčného proteomu bude způsobena především genetickou variabilitou mléčných proteinů odebraných mléčných vzorků i post translačními modifikacemi, ke kterým může docházet přirozeně, nebo nebiologicky během zpracování či skladování mléka (např. pasterace; Le et al., 2017). K další složitosti mléčného proteomu může přispívat složení krmné dávky, které je napříč všemi farmami odlišené, zdravotní stav jedinců, způsob chovu, či fáze laktace (Abd El-Salam, 2014; Tacoma, Fields, Ebenstein, Lam, & Greenwood, 2016). Falšování syrového mléka a následné tepelné ošetření šetrnou nebo vysokou pasterací může rovněž přispět k rozptylu nehomogenity mléčného proteomu, což je dáno výskytem tepelně nestabilních mléčných proteinů, které mohou být během pasterace degradovány (Meltretter, Schmidt, Humeny, Becker, & Pischetsrieder, 2008). Následné změny mohou potencionálně snížit přesnost kvantifikačního modelu, jelikož během záhřevu mohou vznikat nové peptidy, které se mohou lišit podle složení falsifikované směsi. Tento postup falšování a tepelného ošetření imituje postup přípravy falšovaných směsí, který by s největší pravděpodobností zvolili i podvodníci. Co se týče výše zmíněných vědeckých studií, většina z nich analyzovala mléka zakoupená v obchodním řetězci, tudíž chyběla data identifikující původ vzorků. Liland et al. (2009b) jako jedni z mála uvedli, že vzorky syrového mléka získali na univerzitní farmě a zahrnuli více mléčných plemen, nicméně vnitřní a vnější faktory působící na mléčný proteom nerozvedli, a také netestovali žádné tepelné ošetření. Zahrnutí možných vlivů působících na složení proteomu mléka do vývoje regresního modelu je tedy nezbytné pro dosažení odpovídající spolehlivosti a robustnosti metody, což podporují i další vědecké studie (Czerwenka, Muller, & Lindner, 2010; Trimboli et al., 2019). Nicméně i přes nehomogenitu mléčného proteomu analyzovaných vzorků se podařilo při omezení koncentrací detekovat 10 %; 20 %; 40 %; 60 % a 80 % kravského mléka v kozím a ovčím mléku.

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 představuje hlavního smluvního uživatele metodiky. Vzhledem k tomu, že Státní veterinární správa disponuje přístroji MALDI-TOF MS, bude moci certifikovanou metodiku užívat při běžných kontrolních činnostech.

6. Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty výše zmíněné metodiky byly vypracovány s ohledem na fakt, že Státní veterinární správa ve většině případů disponuje přístrojem MALDI-TOF MS. Tudiž není zapotřebí zajišťovat službu v jiné laboratoři, a proto níže zmíněné náklady na analýzu vzorku nezohledňují nákup přístroje.

Velkou výhodou metody MALDI-TOF MS je rychlá příprava s minimálním využitím dalších chemikálií a spotřebního laboratorního materiálu. Vezmeme-li v úvahu chemikálie, spotřebu laboratorního materiálu, přístrojové vybavení a personální zajištění, cena přípravy jednoho vzorku činí přibližně 50 Kč. Co se týče samotné analýzy, největší nákladové položky představují servis přístroje a amortizace, případně nákup kalibračních standardů, náklady na analýzu jednoho vzorku tak činí 120 Kč. Součást nákladů je také 25% režie. **Celková cena za vyšetření vzorku činí tedy 213 Kč (260 Kč včetně DPH po zaokrouhlení)*.**

Výše zmíněná metoda 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 a ovčího mléka, kteří nemohou např. z důvodu alergie na specifickou bílkovinu konzumovat kravské mléko. Ekonomický přínos nelze v tomto případě přesně odhadnout.

*celková cena se může lišit dle vývoje ekonomické situace

7. Seznam použité související literatury

- Anděl, M., Dlouhý, P. (2009). Falšování kojenecké výživy příčinou úmrtí. *Vesmír* 88, 298, 2009/5. <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2009/cislo-5/melamin.html>
- Abd El-Salam, M. H. (2014). Application of proteomics to the areas of milk production, processing and quality control - A review. *International Journal of Dairy Technology*, 67(2), 153–166. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12116>
- Calvano, Cosima D., De Ceglie, C., Aresta, A., Facchini, L. A., & Zambonin, C. G. (2013). MALDI-TOF mass spectrometric determination of intact phospholipids as markers of illegal bovine milk adulteration of high-quality milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(5), 1641–1649. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6597-z>
- Calvano, Cosima Damiana, De Ceglie, C., Monopoli, A., & Zambonin, C. G. (2012). Detection of sheep and goat milk adulterations by direct MALDI-TOF MS analysis of milk tryptic digests. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(9), 1141–1149. <https://doi.org/10.1002/jms.2995>
- Cozzolino, R., & De Giulio, B. (2011). Application of ESI and MALDI-TOF MS for triacylglycerols analysis in edible oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(2), 160–167. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000429>
- Czerwenka, C., Muller, L., & Lindner, W. (2010). Detection of the adulteration of water buffalo milk and mozzarella with cow's milk by liquid chromatography-mass spectrometry analysis of β -lactoglobulin variants. *Food Chemistry*, 122(3), 901–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.034>
- Ewida, R. M., & Abd El-Magiud, D. S. M. (2018). Species adulteration in raw milk samples using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Veterinary World*, 11(6), 830–833. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.830-833>
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Oliveira, M. B. P. P., & Â, I. M. (2007). A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese, 17, 1132–1138. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.009>
- Golinelli, L. P., Carvalho, A. C., Casaes, R. S., Lopes, C. S. C., Deliza, R., Paschoalin, V. M. F., & Silva, J. T. (2014). Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6693–6699. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7990>
- Le, T. T., Deeth, H. C., & Larsen, L. B. (2017). Proteomics of major bovine milk proteins: Novel insights. *International Dairy Journal*, 67, 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.016>
- Liland, K. H., Mevik, B. H., Rukke, E. O., Almøy, T., & Isaksson, T. (2009). Quantitative whole spectrum analysis with MALDI-TOF MS, Part II: Determining the concentration of milk in mixtures. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 99(1), 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.07.008>
- Liland, K. H., Mevik, B. H., Rukke, E. O., Almøy, T., Skaugen, M., & Isaksson, T. (2009). Quantitative whole spectrum analysis with MALDI-TOF MS, Part I: Measurement optimisation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 96(2), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.02.003>
- Maier, T., Klepel, S., Renner, U., & Kostrzewa, M. (2006). Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Methods*, 3(4). <https://doi.org/10.1038/nmeth870>
- Meltretter, J., Schmidt, A., Humeny, A., Becker, C. M., & Pischetsrieder, M. (2008). Analysis of the peptide profile of milk and its changes during thermal treatment and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 2899–2906. <https://doi.org/10.1021/jf073479o>
- Nicolaou, N., Xu, Y., & Goodacre, R. (2011). MALDI-MS and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(10), 3491–3502. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4728-6>

- Ola, F. A. T. (2015). Milk adulteration: Some Chemical Adulterants of Milk. *Egyptian Journal of Chemistry and Environmental Health*, 1(1), 694–703.
- 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(4), 1443–1449. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.045>
- Ren, Q. R., Zhang, H., Guo, H. Y., Jiang, L., Tian, M., & Ren, F. Z. (2014). Detection of cow milk adulteration in yak milk by ELISA. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6000–6006. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8127>
- Tacoma, R., Fields, J., Ebenstein, D. B., Lam, Y. W., & Greenwood, S. L. (2016). Characterization of the bovine milk proteome in early-lactation Holstein and Jersey breeds of dairy cows. *Journal of Proteomics*, 130, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.024>
- Teixeira, J. L. da P., Caramês, E. T. dos S., Baptista, D. P., Gigante, M. L., & Pallone, J. A. L. (2020). Vibrational spectroscopy and chemometrics tools for authenticity and improvement the safety control in goat milk. *Food Control*, 112(October 2019), 107105. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107105>
- Tibshirani, R. (1996). Regression Shrinkage and Selection Via the Lasso. *Journal of the Royal Statistical Society: Ser. B* 58:267–288. doi:10.1111/j.2517-6161.1996.tb02080.x.
- Trimboli, F., Costanzo, N., Lopreiato, V., Ceniti, C., Morittu, V. M., Spina, A., & Britti, D. (2019). Detection of buffalo milk adulteration with cow milk by capillary electrophoresis analysis. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 5962–5970. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16194>
- Tsakali, E., Agkasta, C., Koliaki, C., Livanios, D., Boutris, G., Christopoulou, M. I., ... Houhoula, D. (2019). Milk Adulteration: Detection of Bovine Milk in Caprine Dairy Products by Real Time PCR. *Journal of Food Research*, 8(4), 52. <https://doi.org/10.5539/jfr.v8n4p52>
- Zambonin, C. (2021). Maldi-tof mass spectrometry applications for food fraud detection. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/app11083374>

8. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány

Genčurová, V., Hanuš, O., Hulová, I., Vyleťelová, M., Jedelská, R. (2008). 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. (2019). 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. (2007). 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., Vyleťelová, M., Třináctý, J. (2009). 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., Vyleťelová, M., Kučera, J., Třináctý, J. (2009). 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., Vyleťelová, M., Landová, H., Kopecký, J., Jedelská, R. (2008). 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., Vyleťelová, M., Genčurová, V. (2011). Exploratory analysis of dynamics of frequency distribution of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, LIX, 1, 2011, 83-100.

Hanuš, O., Němečková, I., Rysová, L., Legarová, V., Kopecký, J. (2019). 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. (2020). 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., Vyleťelová Klimešová, M., Klapáčová, L., Jedelská, R., Kološta, M. (2015). 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. (2007). 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. (2019). Fatty acids stability in goat yoghurt. Stabilita mastných kyselin v kozím jogurtu. *Ciência Rural*, 49, 7, 2019, 1-10. doi: 10.1590/0103-8478cr20180803

Rysová, L., Legarová, V., Hanuš, O., Němečková, I., Havlík, J. (2020). Nové spolehlivé metody detekce falšování kozího 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., Cejnar, P., Hanuš, O., Legarová, V., Havlík, J. (2022). Evaluation of MALDI-TOF MS technology in small ruminant milk adulteration using raw bovine milk. *Journal of Dairy Science*, Dostupné online. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21396>

9. Jména oponentů a názvy jejich organizací

- 1) Odborník z daného oboru: MVDr. Šimon Friedrich; Státní veterinární ústav Jihlava
- 2) Pracovník státní správy: MVDr. Sylva Havelková; Státní veterinární správa

10. Příloha

Příloha č. 1 Použité analytické metody k analýzám syrového čistého kravského a kozího 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: CSN EN ISO/IEC 17025; CSN 57 0536; CSN 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: CSN EN ISO/IEC 17025; CSN EN ISO 13366–1 (57 0531); CSN 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 o 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, *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 (CFU) 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 ($\text{CFU} \times \text{ml}^{-1}$ (colony forming unit))); KSM–PS (počet streptokoků ($\text{CFU} \times \text{ml}^{-1}$); KSM–CP (počet ušlechtilých mlékařských mikroorganismů ($\text{CFU} \times \text{ml}^{-1}$); 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 N 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 N (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 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.
- CSN EN ISO 1211 (570534). 2011. Milk – Fat content determination – Gravimetric method (Reference method). Český normalizační úřad, Czech Normalization Institute, Prague.
- CSN EN ISO/IEC 17025. 2005. Conformity assessment - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Český normalizační úřad, Czech Normalization Institute, Prague.
- CSN EN ISO 13366–1 (57 0531). 1998. Milk – Somatic cell count determination – Part 1: Microscopy method. Český normalizační úřad, Czech Normalization Institute, Prague.
- CSN 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 (2019) použité při falšování koziho mléka

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
<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 (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
<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

Kravné mléko (2019) použité při falšování ovčího mléka

Celkem	CPM	log CPM	SB	log SB	Fat	Protein	Casine	Lactose	SNF	Urea
<i>n</i>	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
<i>x</i>	53 071	4,1034	223	2,1821	4,25	3,39	2,71	5,05	9,02	34,57
<i>g</i>		12688		152						
<i>sx_v</i>	122 613	0,7086	247	0,3929	0,931	0,215	0,242	0,080	0,230	7,598
<i>vx_v</i>	231,0		110,8		21,9	6,3	8,9	1,6	2,5	22,0
<i>sx</i>	120 031	0,6937	242	0,3847	0,911	0,211	0,237	0,079	0,226	7,438
<i>vx</i>	226,2		108,5		21,4	6,2	8,7	1,6	2,5	21,5
<i>min</i>	1 000	3,0000	13	1,1139	2,11	2,85	1,95	4,85	8,33	22,23
<i>max</i>	570 000	5,7559	1 190	3,0755	6,32	3,76	3,12	5,26	9,37	48,83
<i>Rmax-min</i>	569 000	2,7559	1 177	1,9616	4,21	0,91	1,17	0,41	1,04	26,60
<i>medián</i>	9 025	3,9527	170	2,2292	4,34	3,39	2,75	5,04	8,98	33,54
<i>horní q</i>	4 463	3,6495	95	1,9754	3,94	3,31	2,64	5,02	8,92	30,89
<i>dolní q</i>	27 225	4,4320	230	2,3620	4,75	3,55	2,86	5,08	9,16	39,32

Celkem	To. Solids	FPD	ML - pH	ML - SH	čas	pevnost	kv.syr.
<i>n</i>	24	12	24	24	24	24	24
<i>x</i>	13,17	546,58	6,65	7,00	487,00	1,90	3,46
<i>g</i>							
<i>sx_v</i>	0,930	5,346	0,033	1,050	53,989	0,042	0,779
<i>vx_v</i>	7,1	1,0	0,5	15,0	11,1	2,2	22,5
<i>sx</i>	0,911	5,119	0,032	1,028	52,852	0,041	0,763
<i>vx</i>	6,9	0,9	0,5	14,7	10,9	2,2	22,1
<i>min</i>	10,77	535,00	6,59	4,72	356,00	1,80	2,00
<i>max</i>	14,61	554,00	6,72	8,82	579,00	2,00	4,00
<i>Rmax-min</i>	3,84	19,00	0,13	4,10	223,00	0,20	2,00
<i>medián</i>	13,42	547,25	6,65	7,04	492,50	1,90	4,00
<i>horní q</i>	12,68	543,88	6,63	6,28	446,25	1,90	3,00
<i>dolní q</i>	13,71	550,25	6,66	7,75	530,75	1,90	4,00

Celkem	objem syr.	Jog - SH	STR 10^7	log STR	LACTO 10^6	log LACTO
<i>n</i>	24	24	24	24	24	24
<i>x</i>	17,79	30,84	741 666 667	8,8421	73 708 333	7,8090
<i>g</i>				695184371		64416927
<i>sx_v</i>	11,402	3,238	257 169 656	0,1693	42 924 078	0,2231
<i>vx_v</i>	64,1	10,5	34,7		58,2	
<i>sx</i>	11,162	3,170	251 754 951	0,1657	42 020 312	0,2184
<i>vx</i>	62,7	10,3	33,9		57,0	
<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>	17,00	29,61	690 000 000	8,8388	65 000 000	7,8129
<i>horní q</i>	7,00	28,69	595 000 000	8,7745	43 750 000	7,6404
<i>dolní q</i>	27,25	32,93	877 500 000	8,9432	86 250 000	7,9326

Ovčí mléko (2019)

Celkem	CPM	log CPM	SB	log SB	Fat	Protein	Casine	Lactose	SNF	Urea
<i>n</i>	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
<i>x</i>	421 042	5,1705	974	2,8627	6,71	6,00	4,92	4,74	11,63	96,11
<i>g</i>		148081		729						
<i>sx_v</i>	840 766	0,6217	699	0,3654	1,029	0,533	0,450	0,282	0,400	18,787
<i>vx_v</i>	199,7		71,8		15,3	8,9	9,1	5,9	3,4	19,5
<i>sx</i>	823 064	0,6086	684	0,3577	1,008	0,521	0,440	0,276	0,392	18,391
<i>vx</i>	195,5		70,2		15,0	8,7	8,9	5,8	3,4	19,1
<i>min</i>	12 000	4,0792	166	2,2201	4,73	4,63	3,72	4,15	10,74	57,48
<i>max</i>	4 050 000	6,6075	2 781	3,4442	9,01	6,76	5,56	5,18	12,32	131,10
<i>Rmax-min</i>	4 038 000	2,5283	2 615	1,2241	4,28	2,13	1,84	1,03	1,58	73,62
<i>medián</i>	149 000	5,1696	817	2,9122	6,73	6,07	4,96	4,80	11,68	97,38
<i>horní q</i>	70 000	4,8451	509	2,7041	6,05	5,72	4,71	4,50	11,51	80,63
<i>dolní q</i>	311 250	5,4873	1 322	3,1210	7,37	6,41	5,20	4,94	11,87	110,82

Celkem	To. Solids	ML - pH	ML - SH	čas	pevnost	kv.syr.	objem syr.
<i>n</i>	24	24	24	24	24	24	24
<i>x</i>	18,34	6,59	10,15	160,38	1,90	3,50	17,96
<i>g</i>							
<i>sx_v</i>	1,239	0,063	1,690	72,916	0,098	0,659	6,811
<i>vx_v</i>	6,8	1,0	16,7	45,5	5,2	18,8	37,9
<i>sx</i>	1,213	0,062	1,655	71,381	0,096	0,645	6,668
<i>vx</i>	6,6	0,9	16,3	44,5	5,1	18,4	37,1
<i>min</i>	15,53	6,48	7,09	92,00	1,70	2,00	8,00
<i>max</i>	20,81	6,69	13,24	452,00	2,00	4,00	37,00
<i>Rmax-min</i>	5,28	0,21	6,15	360,00	0,30	2,00	29,00
<i>medián</i>	18,25	6,59	10,21	142,50	1,90	4,00	17,50
<i>horní q</i>	17,69	6,53	9,07	130,50	1,80	3,00	14,25
<i>dolní q</i>	19,26	6,63	11,20	157,50	2,00	4,00	21,25

Celkem	Jog - SH	STR 10 ^{^7}	log STR	LACTO 10 ^{^6}	log LACTO
<i>n</i>	24	24	24	24	24
<i>x</i>	50,43	1 242 916 667	8,9970	113 083 333	7,9353
<i>g</i>			993116048		86158871
<i>sx_v</i>	4,394	931 826 067	0,2870	79 708 663	0,3563
<i>vx_v</i>	8,7	75,0		70,5	
<i>sx</i>	4,302	912 206 479	0,2810	78 030 398	0,3488
<i>vx</i>	8,5	73,4		69,0	
<i>min</i>	38,07	400 000 000	8,6021	12 000 000	7,0792
<i>max</i>	56,38	3 650 000 000	9,5623	320 000 000	8,5051
<i>Rmax-min</i>	18,31	3 250 000 000	0,9602	308 000 000	1,4259
<i>medián</i>	51,70	825 000 000	8,9165	95 000 000	7,9771
<i>horní q</i>	48,99	607 500 000	8,7835	58 250 000	7,7647
<i>dolní q</i>	53,55	1 697 500 000	9,2289	155 000 000	8,1891

Kravné mléko (2020) použité pro falšování kozího a ovčího mléka

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	Lactose	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 (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	Lactose	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

Ovčí mléko (2020)

Celkem	CPM	log CPM	SB	log SB	Fat	Protein	Casine	Lactose
<i>n</i>	24	24	24	24	24	24	24	24
<i>x</i>	458 917	4,7112	755	2,7673	6,74	5,90	5,07	4,73
<i>g</i>		51428		585				
<i>sx_v</i>	1 065 978	0,9691	485	0,3705	1,386	0,561	0,486	0,333
<i>vx_v</i>	232,3		64,2		20,6	9,5	9,6	7,0
<i>sx</i>	1 043 534	0,9487	475	0,3627	1,357	0,549	0,476	0,326
<i>vx</i>	227,4		62,9		20,1	9,3	9,4	6,9
<i>min</i>	1 000	3,0000	50	1,6990	3,89	4,49	3,78	4,15
<i>max</i>	4 800 000	6,6812	2 237	3,3497	8,76	6,61	5,70	5,36
<i>Rmax-min</i>	4 799 000	3,6812	2 187	1,6507	4,87	2,12	1,92	1,21
<i>medián</i>	26 500	4,4194	654	2,8150	6,74	6,01	5,15	4,81
<i>horní q</i>	14 000	4,1424	431	2,6347	6,12	5,67	4,85	4,46
<i>dolní q</i>	265 000	5,4231	930	2,9668	7,80	6,28	5,38	5,00

Celkem	SNF	To.Solids	Urea	BMM	ML - pH
<i>n</i>	24	24	24	24	24
<i>x</i>	11,65	18,21	100,86	-0,5735	6,64
<i>g</i>					
<i>sx_v</i>	0,437	1,536	23,983	0,0164	0,106
<i>vx_v</i>	3,8	8,4	23,8	2,9	1,6
<i>sx</i>	0,428	1,504	23,478	0,0161	0,103
<i>vx</i>	3,7	8,3	23,3	2,8	1,6
<i>min</i>	10,53	14,74	65,85	-0,6400	6,34
<i>max</i>	12,40	20,27	137,46	-0,5582	6,75
<i>Rmax-min</i>	1,87	5,53	71,61	0,0818	0,41
<i>medián</i>	11,70	18,56	98,98	-0,5700	6,67
<i>horní q</i>	11,38	17,55	81,14	-0,5800	6,63
<i>dolní q</i>	11,89	19,34	123,70	-0,5646	6,71