

# ODHAD PROPORCÍ PODÍLŮ SLOŽEK NA BODU MRZNUTÍ MLÉKA KRAV, OVCÍ A KOZ A IDENTIFIKACE PRAVDĚPODOBNÉHO ZVODNĚNÍ OVČÍHO MLÉKA

Oto Hanuš<sup>1</sup>, Martin Tomáška<sup>2</sup>, Marcela Klimešová<sup>1</sup>,  
Margita Hofericová<sup>2</sup>, Lenka Vorlová<sup>3</sup>,  
Irena Němečková<sup>1</sup>, Miroslav Kološta<sup>2</sup>, Petr Roubal<sup>1</sup>,  
Radoslava Jedelská<sup>1</sup>, Jaroslav Kopecký<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

<sup>2</sup> Výzkumný ústav mlíkárenský, a.s.

<sup>3</sup> Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

**Estimation of components proportions on cow, sheep and goat milk freezing point depression and identification of probable sheep milk adulteration with added water**

## Abstrakt

Mléko malých přežvýkavců (MP) je vnímáno zdravotně jako vhodná alternativa případných problémů s konzumací mléka kravského. Cena syrového mléka MP je výrazně vyšší než mléka kravského. Cena ovčího mléka je faktorem potřeby kontroly jeho případného zvodnění (ZM; falšování). ZM může představovat technologické a představuje ekonomické riziko pro zpracovatele mléka. Cílem bylo realizovat zpřesnění detekčního limitu bodu mrznutí (BMM) pro ZM u ovcí. Použity byly bazénové vzorky. Laktóza tvoří 55,0, 46,95 a 48,18 % BMM u krav, ovcí a koz. Průměr BMM u ovcí byl  $-0,559 \pm 0,029$  °C ( $n = 811$ ). Vysoké korelace byly mezi BMM a složkami:  $-0,228$ ,  $-0,231$ ,  $-0,219$  ( $P < 0,01$ ),  $-0,497$  a  $-0,341$  ( $P < 0,001$ ) pro tuk, bílkoviny, laktózu, sušinu tukuprostou a sušinu celkovou. Korelace mezi BMM (přímá kryoskopie) a jeho ekvivalentem (nepřímé určení) byla  $0,945$  ( $P < 0,001$ ).  $1$  % ZM zvyšuje BMM o  $0,006$  a  $0,0072$  °C u krav a ovcí. Změny (zvýšení) v obsahu tuku (např. chyba odběru vzorku) o  $5,75$  % změnil (snížily) BMM u ovcí o  $0,005$  °C. Odhad měsíčních limitů BMM a složek pro ZM u ovcí byl: průměr ( $x$ ) + směrodatná odchylka ( $sd$ )  $\times 1,64$  a  $x - sd \times 1,64$  (95 % jednostranného intervalu spolehlivosti). Limitní rovnice pro BMM podle měsíců (sezóny, laktace) byla:  $y = 0,0044x - 0,5436$ ;  $r = 0,864$ ;  $P < 0,05$ . Byl vytvořen hierarchický model aplikace limitních rovnic BMM a složek pro identifikaci ZM ovcí k redukci falešně pozitivních a negativních nálezů podle vztahů složek k BMM. Výsledky jsou prakticky použitelné na Slovensku i v České republice.

**Klíčová slova:** minerální složky; tuk; bílkoviny; laktóza; sušina tukuprostá; bod mrznutí mléka; zvodnění mléka

## Abstract

Milk of small ruminants (SR) is seen as a suitable alternative of potential health problems with the consumption of cow milk. SR raw milk price is considerably higher than that of cow milk. The price of sheep milk is a factor of necessity why to control the eventual milk adulteration with added water (MAAW; falsification). MAAW may represent a technological and represents economic risk for milk processors. The goal was to implement a more accurate detection limit of the milk freezing point (MFP) for MAAW in sheep. Bulk samples were used. Lactose forms 55.0, 46.95 and 48.18% of MFP in cows, sheep and goats. MFP mean in sheep was  $-0.559 \pm 0.029$  °C ( $n = 811$ ). There were high correlations between the components and the MFP:  $-0.228$ ,  $-0.231$ ,  $-0.219$  ( $P < 0.01$ ),  $-0.497$  and  $-0.341$  ( $P < 0.001$ ) for fat, protein, lactose, solids non-fat and the total solids. Correlation between MFP (direct cryoscopy) and its equivalent (indirect determination) was  $0.945$  ( $P < 0.001$ ). MAAW by 1% increases MFP by  $0.006$  and  $0.0072$  °C in cows and sheep. Change (increasing) in fat content (eg. sampling error) by  $5.75\%$  changed (decreased) the MFP by  $0.005$  °C in sheep. The estimation of MFP and components monthly limits for MAAW in sheep were: mean ( $x$ ) + standard deviation ( $sd$ )  $\times 1.64$  and  $x - sd \times 1.64$  (95% one-sided confidence interval). MFP limit equation according to months (season, lactation) was:  $y = 0.0044x - 0.5436$ ;  $r = 0.864$ ;  $P < 0.05$ . There was created a hierarchic model of application of limit equations for MFP and components to identify MAAW in sheep for reduction of false positive and negative findings according to relations of components to MFP. The results are practically applicable in the Slovak Republic and the Czech Republic as well.

**Keywords:** mineral components; fat; protein; lactose; solids non-fat; milk freezing point; milk adulteration with added water

## Úvod

Mléko malých přežvýkavců je vnímáno zdravotně jako vhodná alternativa případných problémů s konzumací mléka kravského. Např. v případě výskytu alergií na některé varianty kaseinů. Jeho produkce se proto postupně zvyšuje. Cena syrového mléka malých přežvýkavců je výrazně vyšší v porovnání k mléku kravskému, až pětinašobek. V České republice (ČR) je mléko malých přežvýkavců zpracováváno v menších objemech především faremně. Na Slovensku je vykupováno a zpracováváno také v poměrně velkých mlékárenských provozech. Výkup a cena mléka jsou faktory potřeby kontroly jeho případného zvodnění (falšování). Přesto je ovčí mléko na Slovensku doposud kontrolováno jen podle celkového počtu mikroorganismů a reziduí antibiotik (Regulation

(EC) No 853/2004), přičemž počet somatických buněk je sledován spíše okrajově. Zavedenou metodou kontroly zvodnění v kravském mléce je možnost měření bodu mrznutí, ačkoliv jeho variabilita může být ovlivněna také celou řadou faktorů, jako je plemeno nebo výživa, popřípadě rovněž technologie ošetření při zpracování, jako pasterace (BROUWER, 1981; BUCHBERGER, 1990 a, b, 1991, 1994, 1997; ROHM et al., 1991; BAUCH et al., 1993; WIEDEMANN et al., 1993; CROMBRUGGE, 2003; ROUBAL et al., 2004; NAVRÁTILOVÁ et al., 2006; HANUŠ et al., 2010, 2011 a, b). Zatímco pro mléko kravské existuje legislativní detekční limit (-0,520 až -0,515 °C) bodu mrznutí mléka (BMM), u malých přežvýkavců tomu tak často (ČR, Slovensko) není a je uváděna toliko variabilita (PAVIČ et al., 2002; PARK et al., 2007).

Pro podporu potravinářsko-legislativních ambicí projektu QJ1230044 bylo cílem sledování realizovat metodu zpřesnění odhadu detekčního limitu bodu mrznutí pro zvodnění v ovčím mléce. Pro nedostatek produkce v ČR (málo reprezentativních dat o ovčím mléce) byl pro odhad použit referenční soubor ze Slovenska.

## Materiál a metody

Na základě hodnotícího přístupu podobného metaanalýze a kompilaci vlastních předchozích výsledků pracoviště byl sestaven návrh postupu umožňujícího identifikovat riziko pravděpodobného zvodnění ovčího mléka (ZM).

### Kalkulace podílů složek na bodu mrznutí kravského, ovčího a kozího mléka

**A) Metaanalýza zdrojů BMM.** Metaanalýza, obecně jako výzkumná metoda, bazíruje na novém vyhodnocení více metodicky utříděných a sjednocených předchozích výsledků z literárních pramenů, kdy na základě této objektivizace může disponovat, ovšem jen v případě korektního a zdařilého provedení, i vyšším potenciálem spolehlivosti výpovědi než původní, často izolované zdroje. Jako etalon, resp. základní metodologický materiál, pro realizovaný odhad, byla použita historická, dnes již klasická, referenční tabulka zdrojů BMM u krav (Tab. 1; WALSTRA a JENNESS, 1984). Z různých dalších zdrojů byly připojeny aktuálnější relevantní informace o složení biologických druhů mléka a jejich modifikace (Tab. 2). Následně byly provedeny analogické relativní propočty jako modelová kalkulace pro určení zdrojů deprese BMM u aktuálního složení kravského, ovčího a kozího mléka. Jedná se tak o metodický základ (Tab. 2) pro další návrhy případných aktuálních limitů ZM. Ve výsledku jde o odhad podílů osmoticky aktivních složek na příslušném BMM.

### Podmínky pokusných souborů vzorků mléka, sledování, pokusy a postupy hodnocení

**B) Statistické charakteristiky ovčího mléka.** Byla zpracována a vyhodnocena velká databáze bazénových

vzorků ovčího mléka slovenského původu (2014; Tab. 3). Databáze byla zaměřena na některé významné složkové a fyzikální ukazatele kvality syrového mléka. Zde byl hodnocen především bod mrznutí (BMM). Soubor zahrnoval 811 vzorků, tedy 61 % slovenských vzorků ze čtyř mlékáren a od pěti plemen ovcí (Zušlechtěná valaška, Cigája, Lacaune, Východofříská ovce a Slovenská dojná ovce). Ostatní ovčí mléko je na Slovensku zpracováváno farmářským způsobem. Vzorky byly odebrány od března do října.

**C) Specifikace definovaných doplňkových vlivů a jejich změn na BMM.** Byly provedeny pokusy se zvodněním (a) a manipulacemi tukového obsahu (b) ovčího mléka s možným vlivem na BMM při jinak stejné (zachované) mléčné matrici. Měsíčně byly pro obě modifikace (a, b) zpracovávány dva specificky vybrané nestejně bazénové vzorky přes celou sezónu dojení, resp. laktaci. Stejně jako v části B byly stanoveny ukazatele doplňkové, složkové (chemické), jako obsahy tuku (T), bílkovin (B), laktózy (L), sušiny (S) a sušiny tukuprosté (STP) vedle BMM. Stejně tak byl stanoven počet somatických buněk (PSB).

**D) Statistický konvenční odhad limitů pro zvodnění ovčího mléka.** Podle měsíčních statistických výsledků části B byly vypočteny limitní hodnoty pro podezření na zvodnění ovčího mléka pro BMM a ostatní pravidelně měřené složky mléka (Tab. 4 podle Tab. 3) na hladině pravděpodobnosti 95 % (jednostranný interval). Hodnoty v Tab. 4 jsou limity ZM. Následně byly vypočteny lineární regresní rovnice cut-off limit pro indikaci podezření na pravděpodobné ZM (Tab. 5 podle Tab. 4) podle měsíců sezóny nebo laktace (Obr. 2, 3 a 4). Na základě porovnáni

**Tab. 1** "Pítva kryobodu" (-0,53 °C) podle zdrojů jeho deprese, resp. hlavních osmoticky aktivních složek mléka (podle WALSTRA a JENNESS, 1984). / "The dissection of the cryo-point" (-0.53 °C) in terms of the sources of its depression and principal osmotically active constituents of milk respectively (according to WALSTRA and JENNESS, 1984).

Složka	Koncentrace mg/100ml	Deprese kryobodu (BMM) %	* %
Laktóza	4 400	53,8	
Močovina	26	1,9	
Citráty 3-	14,9	0,4	
Ca citrát-	148,9	2,2	3,3
Mg citrát-	21,3	0,7	
K+	142,3	12,7	
Na+	48,1	7,2	30,4
Cl-	108,9	10,5	
Zbytkové vazby	7 672	6,9	
Celkem		96,3	

(Kravské mléko, 1984, Cow milk, 1984; zbytkové vazby = vliv obsahu hlavních, osmoticky v podstatě neutrálních (intaktních), složek mléka, tuku a bílkovin, rest bindings = impact of content of main, basically neutral, milk components as fat and protein; \* = relativní suma chemicky nebo fyzikálně podobných složek, \* = relative sum of similar components in terms of chemical and physical viewpoint; Složka = Component; Koncentrace = Concentration; Deprese kryobodu (BMM) = Cryo-point depression (MFP); Laktóza = Lactose; Močovina = Urea; Citráty = Citrates; Zbytkové vazby = tuk a bílkoviny, Rest bindings = fat and protein; Celkem = Sum)

**Tab. 2** Mléčné složky a deprese bodu mrznutí mléka (BMM), metaanalýza ČR (2015), kravské, ovčí a kozí mléko. / Milk components and milk freezing point depression (MFP), a meta-analysis in the Czech Republic (2015), cow, sheep and goat milk.

	Kráva	-0,52648 °C vztažná hodnota BMM	Ovce	-0,56723 °C vztažná hodnota BMM	Koza	-0,5532 °C vztažná hodnota BMM
Složka	konc. mg/100 ml	BMM %	konc. mg/100 ml	BMM %	konc. mg/100 ml	BMM %
Laktóza	4 807	55,0	4 321	46,95	4 327	48,18
Močovina	25,5	1,74	57,4	3,72	47,8	3,18
Citráty <sup>3-</sup>	15,6	0,39	9,0	2,15	10,3	2,52
Ca citrát	156,3	2,16	89,9	1,18	105,3	1,42
Mg citrát	22,4	0,69	12,9	0,37	14,8	0,45
K <sup>+</sup>	159,6	13,33	129,7	10,29	201,4	16,36
Na <sup>+</sup>	42,4	5,94	74,0	9,85	43,9	5,98
Cl <sup>-</sup>	115,5	10,43	116,5	9,98	140,3	12,32
Zbytkové vazby	7 862,9	6,63	14 779,7	11,81	7 197,4	5,89
Celkem		96,3		96,3		96,3

(Kráva = Cow; Ovce = Sheep; Koza = Goat; Složka = Component; BMM = MFP; konc. = concentration; vztažná hodnota BMM = MFP referential value; podle: BUCEK et al., 2013; CROMBRUGGE, 2003; GAJDŮŠEK a JELÍNEK, 1992; GAJDŮŠEK et al., 1996; GENČUROVÁ et al., 2008 a, b; GRAPPIN, 1987; HANUŠ et al., 2007, 2008 a, b, 2009 a, b, 2010 a, b, 2011 a, b, 2012, 2015; JANŮ et al., 2007; JELÍNEK et al., 1996; KHALED et al., 1999; KLÍČNÍK, 1978; KLIMEŠOVÁ et al., 2015; KVAPILÍK et al., 2013, 2015; MACEK et al., 2008; MORAND-FEHR et al., 2007; PIRISI et al., 2007; PŘIDALOVÁ et al., 2009; WALSTRA a JENNESS, 1984; citovaná literatura je u autorů; cited literature is at authors)

**Tab. 3** Hlavní statistické parametry ukazatelů ovčího mléka. / The main statistic parameters of sheep milk indicators.

U/P (I/P)	BMM (MFP)	EBMM (MFPE)	T (F)	B (P)	L	STP (SNF)	S
jednotka	°C	°C	%	%	%	%	%
x	-0,559	-0,554	7,44	5,98	4,56	11,35	18,67
sd	0,029	0,023	1,15	0,79	0,43	0,54	1,39
vx (%)	5,1	4,1	15,5	13,2	9,4	4,7	7,5

U/P ukazatel/parametr; I/P indicator/parameter; jednotka unit; x aritmetický průměr; x arithmetic mean; sd směrodatná odchylka; sd standard deviation; vx variační koeficient; vx variation coefficient; BMM bod mrznutí mléka (kryoskop); MFP milk freezing point (cryoscope); EBMM ekvivalent BMM (infračervená spektroskopie a konduktometrie); MFPE milk freezing point equivalent (infra-red spectroscopy and conductometry); T tuk; F fat; B hrubé bílkoviny; P crude protein; L monohydrát laktózy, lactose monohydrate; STP sušina tukuprostá; SNF solids non-fat; S celková sušina, total solids.

vah vlivu složek mléka na BMM (Tab. 1 a 2) byl pak (metodou kvalifikovaného odhadu) sestaven hierarchický model (s preferenčním pořadím submodelů) postupu od BMM (základní rovnice) přes složky mléka (doplňkové rovnice) pro odhad rizika pravděpodobného zvodnění (Tab. 6). Zároveň uvedené slouží pro maximální eliminaci falešně pozitivních nebo falešně negativních nálezů ve smyslu identifikace ZM.

### Analýzy vzorků mléka

Vzorky byly měřeny v laboratoři Examinála (Výskumný ústav mlékárenský, Žilina). Použitá přímá (referenční) měřicí metoda pro BMM byl kryoskop (CryoStar

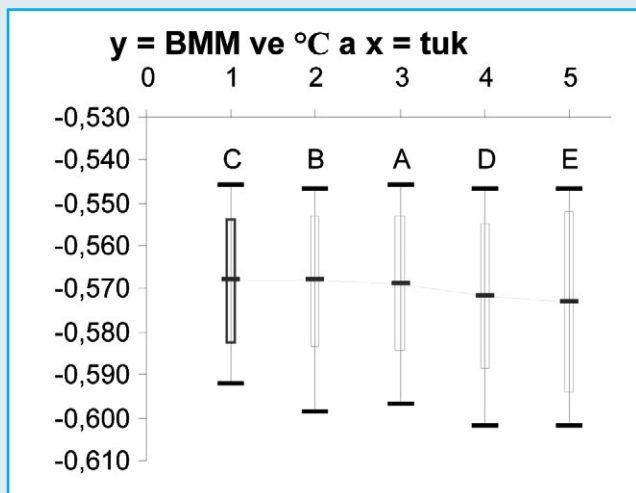
Automatic; Funke-Gerber, Berlin, Germany (CRS)) a nepřímá pro EBMM (ekvivalent BMM) byla infračervená spektroskopie (MIR-FT) kombinovaná s konduktometrií (MilkoScan FT 6000; Foss Electric, Hillerød, Denmark). Na zařízení MIR-FT byly také měřeny hlavní složky mléka (tuk (T), bílkoviny (B), laktóza (L), sušina tukuprostá (STP) a sušina (S)). Obě zařízení byla kalibrována v souladu s návodem výrobce a kontrolována pravidelnou účastí ve výkonnostních testech analytické způsobilosti (PT; ISO 5764, 2009). PSB byl stanoven metodou průtočné cytometrie na zařízení Fossomatic 5000 (Foss Electric, Denmark). Přístroj byl rovněž kontrolován prostřednictvím příslušných PT.

**Tab. 4** Limitní hodnoty bodu mrznutí (BMM) a složek mléka pro identifikaci zvodnění mléka (ZM) u ovcí podle Tab. 3 (jednostranný konfidenční interval 95 %). / The limit values of milk freezing point (MFP) and components to identify the milk adulteration with added water (MAAW) in sheep according to Tab. 3 (one-sided 95% confidence interval).

Ukazatel	Měsíc						
	3	4	5	6	7	8	9 - 10
BMM (MFP) °C	-0,522	-0,529	-0,529	-0,518	-0,511	-0,512	-0,498
tuk (T, F) %	4,88	5,66	5,84	6,0	6,18	6,78	7,43
bílkoviny (B, P) %	4,43	4,75	5,07	4,98	5,41	5,63	6,29
laktóza (L) %	4,75	4,57	4,22	4,41	4,19	4,02	3,36
sušina tukuprostá (STP, SNF) %	10,0	10,34	10,73	10,52	10,53	10,96	11,09
sušina celková (S) %	15,4	16,47	16,93	16,7	17,05	17,98	18,41

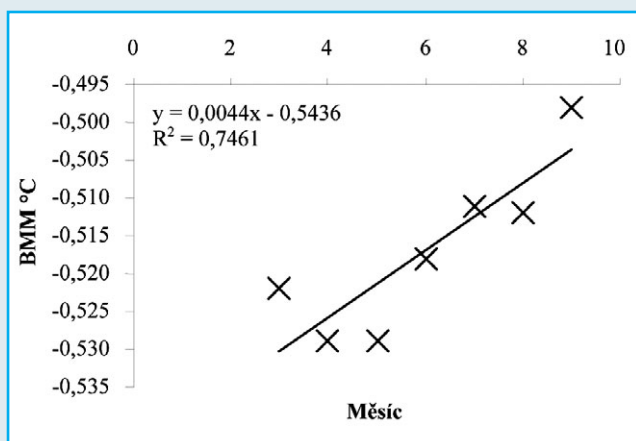
Měsíc = month; Ukazatel = indicator; aktuální hodnota BMM > tabulkový limit = podezření na ZM; aktuální hodnota složky < tabulkový limit = podezření na ZM; current value of MFP > table limit = suspicion on milk adulteration with added water (MAAW); current value of component < table limit = suspicion on MAAW; MFP milk freezing point; F fat; P protein; L lactose; SNF solids non-fat; S total solids.

**Obr. 1** Změny bodu mrznutí mléka (BMM ve °C) v závislosti na manipulaci s obsahem tuku (C až E, A je původní mléko) se stejnou matricí ovčího mléka. / The changes of milk freezing point (MFP in °C) in dependence on fat content manipulation (from C to E, A is original milk) with the same sheep milk matrix.



Metodika C, b; C soubor vzorků mléka = 4,3 % (průměrně) tuku, E = 10,05 % a A = 7,34 % tuku jako původní mléko; C, b method; C milk sample set = 4.3% (by mean) of fat, E = 10.05% and A = 7.34% of fat as original milk; tuk = fat. Rozdíly v BMM mezi soubory podle mléčného tuku (C, B, A, D, E) jsou zobrazeny pomocí krabicových grafů pro dobré vyjádření rozložení četností hodnot s mediánem (středová čárka), 50 %ním středovým kvantilem (krabice) a variačním oborem (maximum a minimum). Differences in MFP among files according to milk fat (C, B, A, D, E) are rendered by box graphs for good expression of data frequency distribution with median (central line), 50% central quantile (the box) and variation range (maximum and minimum).

**Obr. 2** Vztah mezi sezónou a limity pro identifikaci rizika zvodnění mléka (ZM) u ovcí podle bodu mrznutí (BMM) podle Tab. 5. / The relationship between season (months) and limits for identification of hazard of milk adulteration with added water (MAAW) in sheep according to milk freezing point (MFP) according to Tab. 5.

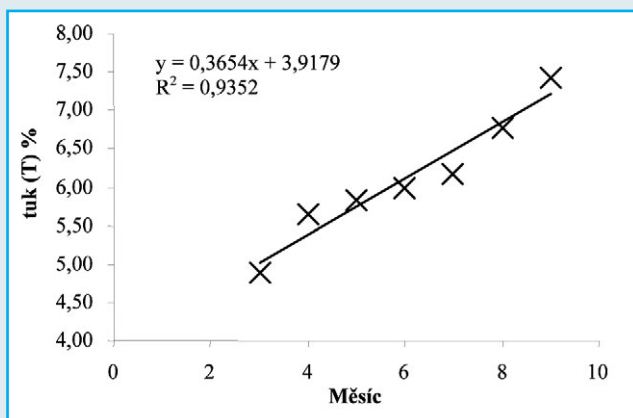


n = 7; r = 0,864; P < 0,05

### Statistické postupy

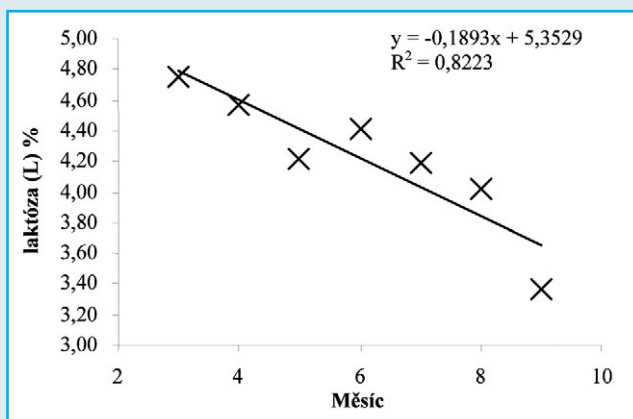
Byly vypočteny základní statistické parametry, střední hodnoty a ukazatele variability a provedena regresní analýza výsledků. Statistická analýza byla provedena v programu MS Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

**Obr. 3** Vztah mezi sezónou a limity pro identifikaci rizika zvodnění mléka (ZM) u ovcí podle obsahu tuku (T) podle Tab. 5. / The relationship between season (months) and limits for identification of risk of milk adulteration with added water (MAAW) in sheep according to milk fat content (F) according to Tab. 5.



n = 7; r = 0,967; P < 0,001

**Obr. 4** Vztah mezi sezónou a limity pro identifikaci rizika zvodnění mléka (ZM) u ovcí podle obsahu laktózy (L) podle Tab. 5. / The relationship between season (months) and limits for identification of risk of milk adulteration with added water (MAAW) in sheep according to lactose content (L) according to Tab. 5.



n = 7; r = -0,907; P < 0,001

## Výsledky a diskuse

### Specifikace podmínek odhadu zvodnění pro ovčí mléko

ZM může představovat technologické a představuje ekonomické riziko pro zpracovatele mléka. Ovšem každé mléko získané pomocí strojního dojení je zvodněné. Obsahuje vždy maximálně do 0,5 % tzv. technologické pitné vody (minimálně kondenzace vody a vlhkost skleněných nebo kovových stěn potrubí). Při hledání limitu podezření ze zvodnění (falšování suroviny) se jedná o prokazování skutečnosti komerčního podvodu. V dnešní praxi tedy vždy jde pouze o zachycení nepřijatelné míry ZM.

Problém je obtížný z toho důvodu, že v datovém souboru (vzorků) nelze odlišit, které mléko bylo případně zvodněno uvedeným negativním způsobem. Neexistuje totiž analy-



**Tab. 5** Limitní rovnice pro identifikaci podezření na zvodnění mléka (ZM) podle měsíců (průběh sezóny, laktace) pro bod mrznutí mléka (BMM) a složky u ovcí ( $n = 7$ ) podle Tab. 4. / The limit equations for suspicion identification about milk adulteration with added water (MAAW) along months (season, lactation course) for milk freezing point (MFP) and components in sheep ( $n = 7$ ) according to Tab. 4.

Ukazatel	Parametr			
	Lineární rovnice	R <sup>2</sup>	r	s
BMM (MFP) °C	$y = 0,0044x - 0,5436$	0,7461	0,864	$P < 0,05$
tuk (T, F) %	$y = 0,3654x + 3,9179$	0,9352	0,967	$P < 0,001$
bílkoviny (B, P) %	$y = 0,2743x + 3,5771$	0,9263	0,962	$P < 0,001$
laktóza (L) %	$y = -0,1893x + 5,3529$	0,8223	-0,907	$P < 0,001$
sušina tukuprostá (STP, SNF) %	$y = 0,1539x + 9,6721$	0,8038	0,897	$P < 0,001$
sušina celková (S) %	$y = 0,4346x + 14,3836$	0,8986	0,948	$P < 0,001$

Parametr, Ukazatel = Parameter, Indicator; aktuální hodnota BMM > kalkulovaná hodnota BMM pro daný měsíc = podezření na ZM; aktuální hodnota složky < kalkulovaná hodnota složky pro daný měsíc = podezření na ZM; current value of MFP > calculated value of MFP for current month = suspicion on milk adulteration with added water (MAAW); current value of component < calculated value of component for current month = suspicion on MAAW; MFP milk freezing point; F fat; P protein; L lactose; SNF solids non-fat; S total solids; n počet případů; n number of cases; R<sup>2</sup> koeficient determinace; R<sup>2</sup> determination coefficient; r korelační koeficient; r correlation coefficient; s významnost (pravděpodobnost nulové hypotézy); s significance (probability of zero hypothesis).

tická metoda, která odliší v mléce vodu nativní od vody uměle přidané. Proto výsledky následné praktické komerční aplikace kvalitativního screeningu zvodnění se odvíjejí právě od objektivit nastaveného diskriminačního limitu podezření na ZM pro dané podmínky. Dále je nepochybně metodicky obtížnější používat BMM ve screeningu pro průkaz zvodnění u ovčího mléka než u kravského. Je tomu tak převážně ze tří důvodů:

- 1) pro obvykle vyšší variabilitu složek ovčího mléka;
- 2) pro simultánní vliv sezóny a stadia laktace (tím i sezónních změn výživy) na složení mléka;
- 3) pro výraznější genetické vlivy četných plemen na dojivost a skladbu mléka.

Zároveň existuje mnohem méně literárních pramenů a výsledků pro posouzení dynamiky BMM v ovčím mléce. Výše uvedené naznačuje na potřebu zohlednit sezónní efekty v celé metodice odhadu limitu BMM.

### Výsledky vymezených metodických postupů a pokusů A až D

**A)** Etalonem pro konkrétní metaanalýzu byla, ohledně BMM u krav, zvolena práce WALSTRA a JENNESS (1984). Ta pojednává o kvantifikaci zdrojů kryobodu v kravském mléce (Tab. 1). Od dob WALSTRA a JENNESS (1984) lze zaznamenat vzrůst obsahu laktózy (anhydridu), protože od těch dob vzrostla rovněž dojivost krav, neboť existuje pozitivní korelace mezi těmito dvěma ukazateli. Aby tedy tento geneticky, výživou a zdravotním stavem mléčné žlázy podmíněný vzrůst mléčné užitkovosti mohl být realizován, z fyziologicko-osmotických důvodů došlo i ke zvýšení obsahu laktózy (z 4,4 na 4,81 g / 100 ml ve střední Evropě). Pracovním předpokladem a hypotézou této metaanalýzy je, že stejné látky budou, při stejné koncentraci, relativně stejně osmoticky aktivní v různých druzích mléka, jako v kravském. K obsahovým položkám hlavních osmoticky aktivních látek v kravském mléce (Tab. 1) byly doloženy hodnoty aktuální pro kravské mléko a jim

příslušné hodnoty pro malé přežvýkavce z relevantních pramenů pro podmínky střední Evropy. Zdrojová data často pocházela z vlastních předchozích sledování a vyhodnocení (Tab. 2). Statistické údaje současné skladby mléka v ČR (2005 - 2015) byly získány z četných pramenů (zdrojů). Kritériem výběru zdrojů byla jejich reprezentativnost, tedy aktuálnost mlékařských analytických dat a četnost zahrnutých pozorování v souborech. Při zisku středních hodnot byla četnost případů často vahou zahrnutí příslušných dílčích středních hodnot do derivovaných aktuálních výchozích dat. K uvedeným časovým periodám byly dohledány pravděpodobně vztažné průměry BMM. Běžnější data monohydrátu laktózy byla konvertována na hodnoty anhydridu laktózy (5057 = 4807; 4546 = 4321; 4552 = 4327 mg/100ml; kráva, ovce, koza; faktor 1,052; Tab. 2). Po takto kompleťované databázi byly na principu vyvážených relací kalkulovány poměry osmoticky aktivních složek a jejich podíl na BMM pro aktualizované složení kravského mléka a definované složení mléka malých přežvýkavců (Tab. 2), podle etalonové tabulky (Tab. 1). Většina nových výsledků byla vypočtena z nějakých reálných, byť vybraných, základů a pouze malou menšinu lze označit za kvalifikovaný odhad. Zbytečnými vazbami, vedle hlavních osmoticky aktivních mléčných složek v Tab. 1 a 2, je míněn obsah bílkovin a tuku, přičemž celek ještě netvoří 100 % (ale 96,3 %), neboť není např. zakalkulován proměnlivý vliv kyslíčnicku uhličitého, který se časem po nadojení snižuje v důsledku evaporace, ale jehož objemové % po nadojení činí 4 až 6. Např. jeho vakuovým odsátím z kravského mléka lze BMM zvýšit (zhoršit) až o cca 0,00383 °C (HANUŠ et al., 2012), tj. cca o 0,73 %. Pro aktualizovaná data složení a vlastností mléka byl výpočet následující: 1.) pro každou složku, látkový obsah složky v referenční tabulce (Tab. 1) / relativní hodnota vlivu složky v referenční tabulce (%) = x, látkový obsah složky v aktuální tabulce (Tab. 2) / x = relativní hodnota vlivu složky v aktuální tabulce (%; Tab. 2, nevyjádřeno); 2.) odvození koeficientu, suma relativních položek vlivů složek (%) v referenční tabulce (Tab. 1) / suma relativních položek vlivů složek (%) v aktuální tabulce (Tab. 2, nevyjádřeno) = koeficient pro relativní položku vlivu každé složky v aktuální tabulce (k, Tab. 2, nevyjádřeno); 3.) relativní hodnota vlivu složky v aktuální tabulce (%; Tab. 2, nevyjádřeno) × koeficient k = finální relativní hodnota vlivu složky v aktuální tabulce (%; Tab. 2).

Např. laktóza tak může nyní tvořit 55,0, 46,95 a 48,18 % BMM u krav, ovcí a koz (Tab. 2), zatímco obsahy tuku a bílkovin jen 6,63, 11,81 a 5,89 %. Tedy historicky, od roku 1984 (cca 30 roků) doposud, došlo pravděpodobně

**Tab. 6** Hierarchický model pro identifikaci rizika zvodnění mléka (ZM) u ovcí podle bodu mrznutí (BMM) a složek (T, B, L, STP a S) mléka (podle Tab. 5). / The hierarchic model for identification of hazard of milk adulteration with added water (MAAW) in sheep along freezing point (MFP) and components (F, P, L, SNF and S) of milk (according to Tab. 5).

Model	Základní rovnice (Basic equation)	Doplňková rovnice (Additional equation)	Preferenční pořadí (Preferential order)
I	BMM (MFP)	-	6. (6 <sup>th</sup> )
II	BMM (MFP)	B (P)	3. (3 <sup>rd</sup> )
III	BMM (MFP)	B a L (P and L)	1. (1 <sup>st</sup> )
IV	BMM (MFP)	STP (SNF)	2. (2 <sup>nd</sup> )
V	BMM (MFP)	T, B a L (F, P and L)	4. (4 <sup>th</sup> )
VI	BMM (MFP)	T, B, L, STP a S (F, P, L, SNF and S)	5. (5 <sup>th</sup> )

(Tab. 1 a Tab. 2), v důsledku změněných faktorů genetiky (šlechtění skotu), výživy a zdravotního stavu krav, ke změně relativního účinku laktózy a tuku a bílkovin na tvorbu BMM z 53,8 na 55,0 % (vzrůst o 1,2 %) a z 6,9 na 6,63 % (pokles o 0,27 %). Stejně tak vliv citrátů celkem klesl mírně z 3,3 na 3,24 % a vliv iontů celkem z 30,4 na 29,7 %. Aktuální kalkulace osmotických zdrojů kryobodu v mléce krav a malých přežvýkavců pro podmínky střední Evropy může mít význam při odhadech reálných limitních hodnot pro detekci případného zvodnění syrového mléka a tím pro podporu kvality této potravinové suroviny.

**B)** Průměr BMM bazénových vzorků u ovcí byl  $-0,559 \pm 0,029$  °C. MACEK et al. (2008) a HANUŠ et al. (2009) uvedli v České republice pro bazénové vzorky ovčího mléka jednoho stáda průměr  $-0,605$  °C a JANŠTOVÁ et al. (2013) hodnotu  $-0,617 \pm 0,052$  °C. Střední hodnoty za laktační sezónu (kalendářní rok) celkem jsou v Tab. 3. Vysoké korelace byly mezi BMM a mléčnými složkami:  $-0,228$ ,  $-0,231$ ,  $-0,219$  ( $P < 0,01$ ),  $-0,497$  a  $-0,341$  ( $P < 0,001$ ) pro tuk, bílkoviny, laktózu, sušinu tukuprostou a sušinu celkovou. Průměrný rozdíl mezi BMM a EBMM byl malý ( $0,005$  °C; Tab. 3), přesto nezanedbatelný. Tato diference je ovšem snadno eliminovatelná případnou kalibrací, popřípadě prostou kalkulací. Uvedené znamená určitou změnu posunu příslušné kalibrační regresní přímky a je to pouze otázka statistiky a přístrojového software. Jak ukazují výsledky regresního metodického vztahu mezi BMM a EBMM, 89,4 % variability v hodnotách EBMM je determinováno variací v jeho referenčním kryoskopickém určení (BMM). Korelace tohoto vztahu  $0,945$  ( $P < 0,001$ ) je významná a zároveň vyšší než stejná korelace u kravského mléka ( $0,43$ ;  $P < 0,01$ ; TOMÁŠKA et al., 2014). To naznačuje, že metoda měření EBMM může být u tohoto druhu mléka úspěšnější pro možnost kontroly kvality (ZM) potravinářské suroviny. U kravského mléka jen 18,7 % variací v EBMM bylo podmíněno variabilitou v referenční kryoskopické metodě (BMM). Dále byla regrese mezi BMM a EBMM určena v intervalu hodnot BMM, který podle konvenčního statistického odhadu odpovídá oboru možného hledání hodnot limitu pro podezření ze ZM u ovcí podle BMM, a sice nad  $-0,511$  °C. Tento vztah poskytl

významný metodický korelační koeficient  $0,992$  ( $P < 0,001$ ). To znamená, že 98,5 % variací v EBMM bylo určeno variabilitou v referenčních hodnotách BMM. Výsledek je nadějný pro metodické použití EBMM rutinně pro odhalování případného ZM u ovcí, neboť vztah referenční a nepřímé metody je velmi těsný.

**C)** Přídavek 1 % cizí vody (ZM) zvyšuje BMM o  $0,006$  (HANUŠ et al., 2012) a  $0,0072$  °C u krav

a ovcí (metodika a) při kryoskopické metodě stanovení (BMM). U nepřímé metody tento vztah naznačuje v ovčím mléce zvýšení EBMM o  $0,0056$  °C (koeficient korelace  $r = 0,993$  ( $P < 0,001$ )), tedy hodnotu metodicky srovnatelnou. Závislost pro BMM lze znázornit lineárním regresním vztahem:  $y = 0,0072x - 0,5686$  (počet bodů  $n = 6$ ; koeficient determinace  $R^2 = 0,9994$ ;  $r = 1$  ( $P < 0,001$ )). Změny v obsahu tuku (např. potenciální chyba odběru vzorku) v ovčím mléce (C, A až E; Obr. 1) se stejnou maticí od 4,3 do 10,05 (o 5,75) % změnilo (snížilo) BMM u ovcí o  $0,005$  °C (b). Vztah průměrného PSB k průměrným obsahům tuku v souborech vzorků mléka C, A až E během manipulace s obsahem tuku byl reprezentován korelačním koeficientem ( $r$ ) 1 ( $n = 5$ ;  $P < 0,001$ ) a průměrného tuku k průměrnému BMM u ovcí byl  $0,894$  ( $n = 5$ ;  $P > 0,05$ ). Uvedené znamená, že s případnou menší chybou odběru vzorku mléka a korespondující změnou obsahu tuku, např. až 1 %, souvisí změna BMM jen metodicky zanedbatelně, jiné to ovšem může být již u velké chyby odběru, např.  $> 2$  %.

**D)** Kvalifikovaný odhad měsíčních limitů BMM a složek pro ZM u ovcí byl proveden na základě uplatnění statistické konvence (95 % intervalu spolehlivosti pro hodnoty patřící do souboru) a platnosti předpokladu normální frekvenční distribuce dat (Laplaceovo-Gaussovo rozdělení) podle modelu: průměr ( $x$ ) + směrodatná odchylka ( $sd$ )  $\times 1,64$  pro BMM;  $x - sd \times 1,64$  (95 % jednostranného intervalu spolehlivosti) pro složky mléka. Tyto limitní hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4 podle Tab. 3. Aktuální hodnota BMM  $>$  tabulkový limit (Tab. 4) odpovídá podezření ze ZM. Aktuální hodnota složky  $<$  tabulkový limit (Tab. 4) odpovídá rovněž podezření ze ZM. Z těchto hodnot (Tab. 4) byly pomocí lineární regrese vypočteny limitní rovnice pro BMM a složky podle měsíců (sezóny, laktace). Tyto rovnice jsou shrnuty v Tab. 5 a Obr. 2, 3 a 4 podle Tab. 4. Korelační koeficienty rovnic svědčí o významných vztazích: pro BMM  $0,864$ ,  $P < 0,05$ ; pro T  $0,967$ ,  $P < 0,001$ ; pro B  $0,962$ ,  $P < 0,001$ ; pro L  $0,907$ ,  $P < 0,001$ ; pro STP  $0,897$ ,  $P < 0,001$ ; pro S  $0,948$ ,  $P < 0,001$ . Z důvodu praktické aplikovatelnosti těchto limitních rovnic byl vytvořen hierarchický model, který je shrnut v Tab. 6, včetně kvalifikovaného odhadu preferenčních hodnot, které

s klesajícím pořadím ukazují zvyšující se význam pro aplikaci při identifikaci ZM u ovcí. Hierarchický model byl vytvořen zejména pro redukci falešně pozitivních a negativních nálezů ZM u ovcí podle vztahů složek k BMM (Tab. 1 a 2). Limitní rovnice BMM (zohledňující variabilitu sezóny a laktace) je vždy v pozici základní (zohledňuje BMM a jeho přímý vztah ke ZM) a složkové limitní rovnice jsou v pozici doplňkové informace (podle vztahu konkrétní složky k BMM). Sestavy submodelů (I až VI) byly tvořeny podle praktických a logických vazeb. Např. bílkoviny byly před tukem preferovány pro menší riziko vlivu chyby odběru vzorku a laktóza před bílkovinami jednak pro ještě menší vliv rizika vlivu odběru vzorku, ale také pro její přímý a významný osmotický vliv na hodnotu BMM (Tab. 1 a 2), atp. Zmíněný postup tak obecně směřoval k posílení specifičnosti a sensitivity dané metody identifikace ZM.

## Závěr

Výsledky pokusů a sledování na ovčím mléce ukázaly, že realizovanými postupy (odhad podílů složek na BMM (A); stanovení středních hodnot a variability ve významných databázích mléčných vzorků a identifikace vztahů mezi BMM a složkami (B); určení a kvantifikace vybraných vlivů (zvodnění a tukových variací) na změny BMM (C)) bylo dosaženo zpřesnění detekčních hodnot bodu mrznutí a metody identifikace rizika pravděpodobného zvodnění ovčího mléka (D). Tyto detekční hodnoty a metodické postupy identifikace ZM u ovcí jsou použitelné v České republice, ačkoliv byly derivovány na základě výsledků slovenské referenční databáze, pro významnou podobnost středních hodnot a variability BMM u dojených ovcí (HANUŠ et al., 2015) v obou zemích.

## Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory projektů MZe NAZV KUS QJ1230044 a MZe RO 1416.

## Literární reference

- BAUCH, W.- HUBER, B.- BUCHBERGER J. (1993): Zum Einfluss einiger Parameter auf die Bestimmung des Gefrierpunktes von Milk mit den Cryostar II - LC. DMZ, Deutsche Milchwirtschaftliche Zeitschrift, *Lebens. Milchwirtsch.*, 114, 5, 112-114.
- BROUWER, T.(1981): Calculations concerning the determination of the freezing-point depression of milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 35.
- BUCHBERGER, J. (1990 a): Einfluss von Rasse, Laktationsstadium und Untersuchungsfehler auf den Gefrierpunkt der Milch. *Schule und Beratung*, 11/90, IV-9-11.
- BUCHBERGER, J. (1997 duben): Erfahrungen mit der Gefrierpunktuntersuchung der Milch. Sborník VÚCHS Rapotín "*Management chovu dojnic*".
- BUCHBERGER, J. (1991): Probleme auch ohne Fremdwasser? *Top Agrar*, 2, R24-R26.
- BUCHBERGER, J. (1990 b): Ursachen von Überschreitungen des Grenzwertes von -0,515 °C beim Gefrierpunkt der Milch. *Schule und Beratung*, 9-10, IV-8-10.

- BUCHBERGER, J. (1994): Zum Gefrierpunkt der Milch: Bewertung und Interpretation. *Dtsch. Milchwirtsch. Zeitschr.*, 115, 8, 376-383.
- CROMBRUGGE VAN, J. M. (2003): Freezing Point. *Bulletin of IDF*, 383, 15-22.
- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- TOMÁŠKA, M.- VYLETĚLOVÁ, M.- GENČUROVÁ, V.- KUČERA, J.- TRÍNÁCTÝ, J. (2010): The analysis of relationships between chemical composition, physical, technological and health indicators and freezing point in raw cow milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 55, 1, 11-29.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- KUČERA, J.- TRÍNÁCTÝ, J. (2009): The effects of milk indicators of sheep mammary gland health state on some milk composition and properties. *Folia Veter.*, 53, 4, 208-216.
- HANUŠ, O.- HANUŠOVÁ, K.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPEC, T.- JANŮ, L.- KOPECKÝ, J.(2012): Selected abiotic factors influencing raw cow milk freezing point depression. *Acta Vet. Brno*, 81, 1, 49-55.
- HANUŠ, O.- TOMÁŠKA, M.- HOFERICOVÁ, M.- VYLETĚLOVÁ 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. *J. Food Nutr. Res.*, 54, 4, ISSN 1336-8672, 281-288.
- HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ, M.- TOMÁŠKA, M.- SAMKOVÁ, E.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J. (2011 a): The effects of sample fat value manipulation on raw cow milk composition and indicators. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, ISSN 1211-8516, LIX, 1, 101-112.
- HANUŠ, O.- ZHANG, Y.- BJELKA, M.- KUČERA, J.- ROUBAL, P.- JEDELSKÁ, R.(2011 b): Chosen biotic factors influencing raw cow milk freezing point. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, ISSN 1211-8516, LIX, 5, 65-82.
- JANŠTOVÁ, B.- NAVRÁTILOVÁ, P.- KRÁLOVÁ, M.- VORLOVÁ, L. (2013): The freezing point of raw and heat treated sheep milk and its variation during lactation. *Acta Vet. Brno*, 82, 187-190.
- MACEK, A.- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.(2008): The relations of sheep s and cow s freezing point of milk to its composition and properties. *Sci. Agric. Boh.*, 39, 4, 329-334.
- NAVRÁTILOVÁ, P.- JANŠTOVÁ, B.- GLOSSOVÁ, P.- VORLOVÁ, L.(2006): Freezing point of heat-treated milk in the Czech Republic. *Czech J. Food Sci.*, 24, 4, 156-163.
- PARK, Y. W.- JUAREZ, M.- RAMOS, M.- HAENLEIN, G. F. W. (2007): Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rum. Res.*, 68, 1-2, 88-113.
- PAVIČ, V.- ANTUNAC, N.- MIOČ, B.- IVANKOVIČ, A.- HAVRANEK, L. (2002): Influence of stage of lactation on the chemical composition and physical properties of sheep milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 47, 80-84.
- ROHM, H.- PLESCHBERGER, C.- FOISSY, F.(1991): Der Gefrierpunkt pasteurisierter Milch in Österreich. *Ernährung / Nutrition*, 15, 11/12, 667-671.
- ROUBAL, P.- SNÁŠELOVÁ, J.- BUCHVALDKOVÁ, T (2004): The freezing point of the raw and heat treated cow milk. (In Czech) Proceeding of seminar VÚCHS Rapotín: *The actual problems of management in the cattle keeping*, 71-76.
- TOMÁŠKA, M.- HANUŠ, O.- HOFERICOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- CHRACHALOVÁ, K.- KOLOŠTA, M. (2014): Prediction of adulteration of sheep s milk with water - testing of the selected model on cow's milk. Celostátní přehlídka sýrů, *Mléko a sýry*, VŠCHT v Praze, 129-132.
- WALSTRA, P.- JENNESS, R.: Dairy Chemistry and Physics, 1984, New York - Chichester - Brisbane - Toronto - Singapore.
- WIEDEMANN, M.- BUCHBERGER, J.- KLOSTERMEYER, H. (1993): Ursachen für anomale Gefrierpunkte der Rohmilch. *Dtsch. Milchwirtsch. Zeitschr.*, 1. und 2. Mitteilung, 114, 1993, 22, 634-644, 114, 23, 656-663.

Přijato do tisku: 14. 10. 2016

Lektorováno: 13. 11. 2016