

Univerzita Karlova  
Pedagogická fakulta  
Katedra chemie a didaktiky chemie

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Proteinové markery sloužící pro rozlišení rostlinných náhražek mlék

Protein markers used to distinguish plant-based milk substitutes

Jessica Kailová

Vedoucí práce: doc. Mgr. Ing. Štěpánka Kučková, Ph.D.

Studijní program: Chemie se zaměřením na vzdělávání

Studijní obor: B CH-VZ 20

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Proteinové markery sloužící pro rozlišení rostlinných náhražek mléka potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Praha 15.4.2024

Ráda bych poděkovala paní doc. Ing. Mgr. Štěpánce Kučkové, Ph.D., za její odborné a vstřícné vedení a ochotu vždy pomoci a poradit. Dále patří mé poděkování Laboratoři aplikované proteomiky na VŠCHT za možnost provedení experimentální části této práce a jejím členům za nápomocné rady.

## **ABSTRAKT**

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda lze hmotnostní spektrometrií MALDI TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*) získat peptidové markery pro identifikaci a diferenciaci vybraných druhů rostlinných náhražek mléka.

Teoretická část této práce se zabývá popisem jednotlivých rostlinných materiálů, které se využívají pro výrobu kokosové, mandlové, ovesné, rýžové a sójové náhražky mléka. Dále obsahuje proces zpracování těchto materiálů a inovativní metody, které mohou napomoci k produkci stabilnějších a nutričně hodnotnějších produktů. Následující kapitoly se zabývají nutričními vlastnostmi a motivací spotřebitelů k upřednostňování rostlinných náhražek mléka. V závěru teoretické části jsou uvedeny studie, které se zabývaly analýzou proteinů v rostlinných alternativách mlék.

V experimentální části bylo analyzováno šest druhů komerčně vyráběných rostlinných alternativ mléka a k nim příslušné suroviny. Vzorčky byly měřeny pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF a vyhodnoceny v programech mMass 5.5.0 a PostgreSQL, ke kterému se přistupovalo s použitím nástroje pgAdmin. Takto byly získány charakteristické hodnoty  $m/z$  pro suroviny, které sloužily pro diferenciaci rostlinných náhražek. Kokosová a ovesná alternativa mléka byla jednoznačně identifikována, jelikož vykazovaly vysoký počet shod charakteristických hodnot s odpovídajícím rostlinným materiálem. U mandlových nápojů a sójové náhražky byly též získány peptidové markery k identifikaci. Shoda rýžové náhražky s unikátními hodnotami rýže byla nulová, tudíž jako jediná náhražka mléka nebyla prokazatelná.

Získané markery mohou být využity v dalších analýzách k diferenciaci rostlinných náhražek anebo k odhalení falsifikace těchto produktů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

hmotnostní spektrometrie, proteiny, rostlinné náhražky mléka

## **ABSTRACT**

The aim of this bachelor thesis was to determine whether MALDI TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight) mass spectrometry can be used to obtain peptide markers for the identification and differentiation of selected types of plant-based milk substitutes.

The theoretical part of this thesis describes various plant materials used in the production of coconut, almond, oat, rice, and soy milk substitutes. It also covers the processing of these materials and innovative methods that can contribute to the production of more stable and nutritionally valuable products. Subsequent chapters delve into the nutritional properties and consumer motivations for preferring plant-based milk substitutes. The theoretical part concludes with a review of studies that have analysed proteins in plant milk alternatives.

In the experimental part, six types of commercially produced plant-based milk substitutes and their corresponding raw materials were analysed. Samples were measured using a MALDI-TOF mass spectrometer and evaluated using mMass 5.5.0 and PostgreSQL, accessed using the pgAdmin tool. This provided characteristic m/z values for the raw materials, which were used for differentiating plant substitutes. Coconut and oat milk substitutes were clearly identified, as they showed a high number of matches with the corresponding plant material. Peptide markers for identification were also obtained for almond beverages and soy substitutes. The rice substitute did not match any unique rice values, making it the only milk substitute that could not be identified.

The obtained markers can be used in further analyses for differentiating plant substitutes or detecting falsification of these products.

## **KEYWORDS**

mass spectrometry, plant-based milks substitutes, proteins

## Obsah

Úvod.....	9
TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.1 Suroviny využívané pro výrobu alternativních mlék.....	10
1.1.1 Kokos.....	10
1.1.2 Mandle.....	11
1.1.3 Oves.....	11
1.1.4 Rýže.....	12
1.1.5 Sója.....	13
1.2 Výroba rostlinných náhražek mléka.....	14
1.2.1 Příprava surovin pro výrobu rostlinných alternativ živočišného mléka.....	14
1.2.2 Pražení.....	14
1.2.3 Loupání.....	14
1.2.4 Namáčení.....	15
1.2.5 Blanšírování.....	15
1.2.6 Extrakce.....	16
1.2.7 Oddělení pevných částí.....	16
1.2.8 Stabilizace produktu.....	16
1.2.9 Homogenizace.....	18
1.2.10 Vysokotlaká a ultra vysokotlaká homogenizace.....	18
1.2.11 Tepelné zpracování.....	19
1.2.12 Ultrazvuk.....	19
1.2.13 Pulzní elektrické pole.....	20
1.2.14 Ultrafialové záření.....	20

1.2.15	Superkritický oxid uhličitý.....	21
1.2.16	Studená atmosférická plazma, CAP.....	21
1.2.17	Ohmický ohřev.....	22
1.2.18	Fortifikace.....	22
1.2.19	Aseptické balení a skladování.....	22
1.3	Nutriční hodnoty.....	23
1.4	Spotřebitelé.....	26
1.4.1	Laktosová intolerance.....	27
1.4.2	Alergie na bílkoviny kravského mléka.....	27
1.4.3	Veganství.....	27
1.4.4	Environmentální aspekty.....	28
1.5	Metody analýzy proteinů.....	28
1.5.1	Gelová elektroforéza.....	29
1.5.2	Absorpční spektroskopie.....	30
1.5.3	Dumasova a Bradfordova metoda.....	30
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
2.1	Použité chemikálie a přístroje.....	32
2.2	Analyzované vzorky.....	32
2.3	Příprava vzorků.....	40
2.3.1	Objemy a navážky analyzovaných vzorků.....	40
2.3.2	Štěpení vzorků.....	41
2.3.3	Purifikace vzorků.....	41
	Popis procesu purifikace pomocí reverzní fáze C18.....	42
2.3.4	Příprava matrice pro MALDI-TOF.....	42
2.3.5	Přenesení vzorků na destičku.....	42
2.3.6	Nastavení přístroje a měření na MALDI-TOF.....	44

2.3.7	Vyhodnocení spekter.....	44
3	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	45
3.1	Vhodné množství a čas pro štěpení trypsinem .....	45
3.2	Získ unikátních hodnot.....	46
3.3	Analýza rostlinných náhražek mléka .....	47
3.3.1	Vyhodnocení kokosové náhražky mléka.....	48
3.3.2	Vyhodnocení mandlové náhražky mléka .....	49
3.3.3	Vyhodnocení mandlové náhražky z pražených mandlí.....	51
3.3.4	Vyhodnocení ovesné náhražky mléka.....	52
3.3.5	Vyhodnocení rýžové náhražky mléka .....	53
3.3.6	Vyhodnocení sójové náhražky mléka.....	55
4	ZÁVĚR.....	57
	Použitá literatura .....	58
	PŘÍLOHA.....	75



## Úvod

Alternativní mléka na rostlinné bázi jsou často mylně označována jako mléka (Reyes-Jurado a kol., 2023). Mlékem mohou být označeny jen výrobky, které byly vyprodukovány mléčnými žlázami zdravých savců (Chalupa-Krebzdak a kol., 2018). Správné označení je rostlinný nápoj, mléčné alternativy anebo rostlinná náhražka mléka. Rostlinné alternativy mléka jsou rostlinné extrakty luštěnin, obilovin, olejnin, ořechů, zeleniny nebo pseudoobilovin (tzv. pseudocereálií). Tyto extrakty jsou podobné mléku kravskému. Kravské mléko obsahuje proteiny, které mají vysokou nutriční hodnotu, dále lipidy, vitaminy a minerály, zejména pak vápník. Přestože je nutričně hodnotné, jeho spotřeba klesá. Pokles konzumace je spojen s obtížnější stravitelností, a to zejména u osob s laktosovou intolerancí anebo z důvodu alergie na hovězí bílkovinu obsaženou v mléce. Konzumace mléka je též ovlivněna životním stylem a alternativním stravováním jako je např. veganství a vegetariánství. Vyšší poptávka po rostlinných alternativách mléka je i součástí etických a environmentálních důvodů.

V této bakalářské práci jsou představeny rostlinné alternativy mléka, konkrétně alternativy kokosové, mandlové, ovesné, rýžové a sójové. První kapitola je zaměřena na suroviny, jež jsou nezbytné pro výrobu rostlinných náhražek mléka. Dále jsou popsány základní postupy a procesy zpracování rostlinných materiálů pro získání rostlinné náhražky mléka. Výroba je popsána od přípravy surovin až po klíčové procesy pro získání finálního stabilního produktu. V kapitole o nutričních hodnotách jsou jednotlivé produkty popsány z hlediska výživového složení. Kapitola je zaměřena na základní makroživiny a specifické látky, které mohou přispět k zdravému životnímu stylu. Následuje kapitola věnovaná spotřebitelům a jejich hlavním důvodům konzumace a preferenci rostlinných náhražek mléka. V závěru této části jsou uvedeny vybrané metody a k nim příslušné studie analýzy proteinů v rostlinných nápojích.

Na teoretickou část navazuje část experimentální, kde je popsána analýza proteinů v rostlinných náhražkách mléka pomocí hmotnostní spektrometrie. Tato analýza byla provedena s cílem získání proteinových markerů pro identifikaci a rozlišení vybraných druhů rostlinných náhražek mléka. Závěrem experimentální části jsou výsledky diferenciací kokosové, mandlové (z mandlí pražených a nepražených), ovesné, rýžové a sójové náhražky mléka. Též jsou uvedeny hodnoty peptidových markerů.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Suroviny využívané pro výrobu alternativních mlék

Dle surovin, ze kterých jsou rostlinné náhražky mléka vyráběny, můžeme dělit extrakty na bázi luštěnin, obilovin, ořechů, semen anebo pseudoobilovin (Sethi a kol., 2016). V této bakalářské práci bude pozornost zaměřena na kokosové, mandlové, ovesné, rýžové a sójové náhražky mléka.

### 1.1.1 Kokos

Kokosovník ořechoplodý, latinsky *Cocos nucifera*, je jednoděložná rostlina pěstovaná v tropických oblastech, zejména na asijském kontinentu (Ohler, 1999; Patil & Benjakul, 2018). *C. nucifera* patří do čeledi Palmaceae (Ohler, 1999). Rostlina se pravděpodobně vyvinula v oblasti zahrnující Malajský poloostrov, souostroví Nová Guinea a Bismarckovo souostroví. V současné době je známo rozšíření *C. nucifera* v západní a východní Africe, jihovýchodní Asii, Tichomořských ostrovech a v Severní, Střední a Jižní Americe (Prades a kol., 2016; Xiao a kol., 2017). Plodem této rostliny je kokosový ořech, který obsahuje jedlou tkáň nazývanou se endosperm (Lopes & Larkins, 1993). Vývoj plodu trvá přibližně jeden rok. Na začátku vývoje kokosového ořechu vzniká slupka, skořápka a embryonální dutina, která se značně zvětšuje a nakonec se vyplní tekutinou (Ohler, 1999). Z tohoto tekutého endospermu se postupně vytváří buněčná vrstva, která je nejprve rosolovitá a průhledná. V období zralosti endosperm ztvrdne, a tím vytvoří bílou dužinu (Janick & Paull, 2008). Kokos je hojně využíván při výrobě mnoha produktů jako je například kokosový olej, kokosová voda, kokosové maso a kokosová náhražka mléka (Tansakul & Chaisawang, 2006). Kokosová náhražka mléka se získává zpracováním bílé dužiny uvnitř kokosového ořechu. Lze ji připravit ručním strouháním a lisováním kokosového masa anebo v průmyslovém zpracování pro komerční produkty šroubovým nebo hydraulickým lisem (Patil & Benjakul, 2018). Kokosová náhražka mléka spadá stejně jako například nápoje z lískových a vlašských ořechů, mandlí a pistácií do kategorie alternativ na bázi ořechů (Sethi a kol., 2016). Výroba kokosového nápoje může být v komerčním měřítku energeticky náročná, proto se v ekologicky šetrnějších továrnách využívají i odpadní produkty jako jsou kokosové slupky a skořápky. Vzniklá biomasa je přeměněna na energii, a tak je výroba ekologicky udržitelnější (Tulashie a kol., 2022). U kokosového nápoje jsou zmiňovány potenciální benefity, které jsou spojeny s jeho konzumací. Kromě výhod pro osoby s laktosovou intolerancí nebo alergií na bílkovinu kravského mléka jsou v článku od Tulashieho,

Amenakpora a Atisey (2022) zmiňovány i antikarcinogenní a antimikrobiální účinky. Dále je hodnotný pro vysoký obsah antioxidantů, obzvláště vitamínu E.

### 1.1.2 Mandle

Mandle, latinsky *Prunus dulcis*, pochází ze střední Asie. Nyní se pěstují po celém světě zejména ve středomořských klimatických oblastech, kde je horko a sucho (Casas-Agustench a kol., 2011). Jedná se o domestikovanou dřevinu, z čeledi Rosaceae, která se pěstuje pro její jedlá jádra (Barreca a kol., 2020; Martínez-García a kol., 2012; Martínez-Gómez a kol., 2017). Tento opadavý strom se liší velikostí, tvarem, větvením a růstem dle jednotlivých kultur (Gülcan, 1985). Velikost stromů závisí na genotypu, ale vliv mají také půdně-klimatické podmínky, do kterých spadá například zavlažování, hnojení a řez (Gradziel, 2009). Mandlové jádro je semeno tvořeno dvěma kotyledony, které jsou pokryty slupkou a vnější slupkou s mezipláštěm, kterou jsou chráněny. Mandle se používají díky své výživové hodnotě, textuře a chuťovým vlastnostem v mnoha potravinářských výrobcích (Ahrens a kol., 2005). Zpracovávají se zejména jako pochutiny nebo přidávají do pekařských a cukrářských výrobků (Sang a kol., 2002). Mandle jsou též využívány pro výrobu rostlinných náhražek mléka. Mandlová náhražka mléka spadá pod kategorii rostlinných alternativ z ořechů (Sethi a kol., 2016). Mezi těmito nápoji je mandlové nejvíce zkoumané a jeho spotřeba je poměrně vysoká (Qamar a kol., 2020). V posledních letech jsou mandle v porovnání s ostatními ořechy hojně pěstovány a jsou tedy ekonomicky významné v celosvětovém potravinovém průmyslu (Barral-Martinez a kol., 2021; Faraloni a kol., 2023). Ze získaných mandlových jader je vyráběna mandlová náhražka mléka, která nabyla oblíbenosti zejména díky vysokému obsahu mononenasycených mastných kyselin, které pomáhají snížit hladinu nízkodenzitního lipoproteinu (low density lipoprotein, zkráceně LDL) (Vanga a kol., 2020). Obsahuje také prospěšné bioaktivní látky jako jsou například flavonoidy, polyaminy a vitamin E ve formě  $\alpha$ -tokoferolu, který si tělo nedokáže samo syntetizovat, a tudíž je přijímán ve stravě (Ferragut a kol., 2015; Sethi a kol., 2016).

### 1.1.3 Oves

*Avena sativa*, česky oves setý, je jedním z nejvýznamnějších druhů ovsa. Jako všechny obiloviny spadá oves do čeledi Poaceae (Magness a kol., 1971). Domestikovaná *A. sativa* má pravděpodobně asijský původ. Jejím předkem je divoký oves červený *Avena sterilis*, který byl plevelem mezi jinými obilovinami, konkrétně pšenicí a ječmenem (Magness a kol., 1971; Zhou a kol., 1999). Oves setý je jednoletá tráva dorůstající průměrně 1,5 m (Gibbs Russell a kol., 1990). Stonky ovsa jsou zakončeny květenstvím, rozptýlenou latou. Postranní stonek i odnož jsou zakončeny klasem, který se odstraňuje při zpracování této obilniny. Klas obsahuje dvě

zrna, výjimečně jedno, která jsou uzavřena tvrdým lemem a palistem. Odstraněním palistu a lemu se dostáváme k obilce neboli jádru ovsa. Jádro o délce 0,5 mm a šířce 0,125 mm obsahuje škrobový endosperm a embryo. Velikost semen se liší dle odrůdy. Obvykle 1 kilogram zrna odpovídá 30 000 semen (Gibbs Russell a kol., 1990; Magness a kol., 1971). Ze zpracovaného ovsa jsou vyráběny například cereálie a ovesné vločky, které se podávají většinou jako ovesná kaše. Pro pekařské výrobky se využívá ovesná mouka a vločky, ale z důvodu nedostatku lepku se oves nehodí pro výrobu chleba (Janick a kol., 1999). Dále se oves využívá pro výrobu rostlinných nápojů. Vodný extrakt z ovsa s hladkou mléčnou konzistencí je alternativou tradičního kravského mléka (Bocchi a kol., 2021; Sethi a kol., 2016). Přestože jsou živiny v rostlinném ovesném nápoji převážně stejné jako v ovsu, při zpracovávání se některé ztrácejí. Ovesný výrobek je proto vylepšen zdokonaleným technologickým zpracováním nebo fermentací (Sethi a kol., 2016). Rostlinná ovesná náhražka mléka patří do kategorie alternativních mlék z obilovin (Sethi a kol., 2016). Ovesný rostlinný nápoj má mléčnou chuť. Nejedná se ale o mléko, nýbrž o vodný výtažek z ovsa, který přispívá ke zdravému životnímu stylu (Bocchi a kol., 2021). Ovesná náhražka mléka je v současné době velmi úspěšnou komerční rostlinnou alternativou tradičního mléka z kategorie obilného typu (Xiong a kol., 2022). Ramsing a kol. (2023) ve svém článku zmiňují, že prodej ovesné alternativy mléka se v roce 2018 do roku 2019 zvýšil až o 700 %. První značku ovesného mléka s názvem Oatly vytvořili švédští vědci v 90. letech 20. století. Cílem bylo poskytnout odběratelům ekologicky šetrnou alternativu živočišného mléka (Krampe & Fridman, 2022).

#### 1.1.4 Rýže

*Oryza sativa* neboli rýže setá patří mezi nejdůležitější plodiny, které živí přes polovinu světové populace (Peng a kol., 1999). Jedná se o jednoletou travu, která patří do čeledi Poaceae (Chang, 1976; Li, 1979). Tato tráva má kloubovitá, kulatá a dutá stébla s laty. Hlavní stvol rýže má několik postranních palic. Ve vegetativní růstové fázi jsou listy vytvářeny meristémem neboli dělivým pletivem, z nichž vyrůstají palisty. Následuje fáze reprodukční a fáze zrání nebo také plnění zrna (Li, 1979). Druh *O. sativa* je pěstována po celém světě (Khush, 1997). Podle Changa (1976) se rod *Oryza* vyskytoval již před 130 miliony lety na superkontinentu Gondwaně, který se později rozpadl a rozdělil na Asii, Afriku, Ameriku, Austrálii a Antarktidu. *O. sativa* a zejména její odrůdy jsou hojně pěstovány. V současné době je rod *O. sativa* nejrozšířenější obilninou určenou pro výživu člověka (Kopáčová, 2007). Vysoká spotřeba rýže je dána také nutričními hodnotami. Rýže obsahuje vysoký obsah bílkovin, minerálních solí a komplexu vitamínů B. Tato obilovina je vhodná i pro osoby s celiakií, a proto je využívána pro výrobu

gluten-free produktů (Walter a kol., 2008). Z různých odrůd rýže se zpracovává i rýžová alternativa mléka (Karimidastjerd, 2020). Stejně jako ovesný nápoj patří rýže do náhražek mléka na bázi obilovin (Sethi a kol., 2016). Rýžový nápoj lze připravit z celé hnědé nebo bílé rýže anebo z rýžových otrub. Rýžové otruby jsou využívány z důvodu nedostatečného využití a také díky vysokému obsahu živin (Issara & Rawdkuen, 2016). K výrobě rýžového nápoje se též využívá koncentrát rýžové bílkoviny, olej z rýžových otrub, cukr a laktát vápenatý, který může vylepšit jeho nutriční hodnoty. Co se týče rýžové bílkoviny, ta je zejména výhodná svými hypoalergickými vlastnostmi, tudíž je tato mléčná alternativa vhodná pro osoby alergické na kravské mléko nebo sóju (Day, 2013). Podle Chalupa-Krebzdaka a kolektivu (2018) má ale rýžový nápoj v porovnání s ostatními rostlinnými mléčnými alternativy nejmenší obsah bílkovin, a to konkrétně 0,28 g na 100 ml. Kvůli velmi nízkému obsahu bílkovin není tato alternativa vhodná pro výživu dětí, které jsou odstavené od mateřského mléka. Záměna mateřského mléka za rýžovou alternativu již způsobila několik případů Kwashiorkoru, malnutrice způsobené proteinovým deficitem (Katz a kol., 2005; Mäkinen a kol., 2016).

### 1.1.5 Sója

Sója luštinatá, latinsky *Glycine max*, patří mezi luštěniny. Jedná se o jednoletou teplomilnou rostlinu s vejčitými semeny nazývanými sójové boby (Dostálová, 2017). Zralá semena se skládají ze semenného obalu, embrya a struktury pro ukládání živin. Části se zásobovací funkcí – kotyledony jsou obsaženy v embryu. Embryo je chráněno obalem před plísněmi a bakteriální infekcí. Pokud je obal narušen, má semeno nízkou šanci vyklíčit (Liu, 2012). Po kukuřici, pšenici a rýži je sója nejpěstovanější plodinou. Pěstována je zejména v USA, Brazílii, Argentíně, Číně, Indii a Kanadě (Dostálová, 2017). Využití je mnoho, od jedlých výrobků jako je sójový olej, nápoje, veganské potraviny, krmivo pro zvířata až po nejedlé produkty, například bionaftu (Thrane a kol., 2017). Sója je využívána pro výrobu náhražek mléka a je ze všech nejrozšířenější. První komerčně úspěšné alternativy nápoje ze sóji byly uvedeny na trh v Hongkongu v roce 1940 (Chen, 1989). První zmínky o sójové náhražce mléka pochází z Číny přibližně před 2000 lety. Jedná se tedy o první známou rostlinnou alternativu mléka. Tento nápoj měl zajišťovat dostatek živin obyvatelům, kteří měli nedostatek mléka tradičního. Stejně jako arašídový, lupinový anebo nápoj z viny patří sója do rostlinných alternativ na bázi luštěnin (Sethi a kol., 2016). Její oblíbenost je dána zdravotními benefity a nezávadností pro část populace, kteří trpí laktosovou intolerancí nebo alergií na mléčné bílkoviny (Omoni & Aluko, 2005). Oblíbenost výrobků ze sóji je především způsobena vysokým obsahem bílkovin, které se mohou rovnat hodnotám v kravském mléce (Paul a kol., 2020).

## **1.2 Výroba rostlinných náhražek mléka**

Výroba alternativních mlék se obvykle zakládá na extrakci rostlinných surovin ve vodě (Mäkinen a kol., 2015). Proces se skládá z mokrého mletí, filtrace, přidávání přísad, sterilizace, homogenizace a aseptického balení. Tyto postupy jsou společné pro zpracování většiny surovin, ze kterých se rostlinné náhražky mléka vyrábí (Aydar a kol., 2020). K získání těchto extraktů můžeme využít dva postupy, z nichž první je namáčení surovin a následné mokré mletí. Druhá metoda spočívá v mletí suché suroviny a následné extrakce drtě ve vodě (Reyes-Jurado a kol., 2023).

### **1.2.1 Příprava surovin pro výrobu rostlinných alternativ živočišného mléka**

Předběžné úpravy surovin, které se využívají pro výrobu rostlinných nápojů, se mohou lišit. Rozdílná předúprava umožňuje lepší extrakci rostlinného materiálu, zvýší nutriční kvalitu výrobku anebo vylepší organoleptické vlastnosti, jako je například chuť a další senzorycké vlastnosti výsledného produktu (Reyes-Jurado a kol., 2023). Dle suroviny může předúprava zahrnovat kroky pražení (1.2.2), loupání (1.2.3), namáčení (1.2.4) a blanšírování (1.2.5).

### **1.2.2 Pražení**

Pražení suroviny zvýrazňuje smyslové vlastnosti výrobku, jako je například aroma či chuť produktu. Vysoká teplota ale může snížit rozpustnost bílkovin a výtěžnost extrakce (Hinds a kol., 1997; Rustom a kol., 1991). V článku od Aydarové a kolektivu (2020) zmiňují, že se pražení používá u arašídů, mandlí, sezamu, lískových oříšků a obilných surovin. Například u mandlí se využívá zpracování za sucha při teplotě 75 °C až 120 °C v časovém rozpětí 5 až 120 minut. Takto lze získat mandlovou náhražku mléka s nižším obsahem benzaldehydů a pyrazinů (Aydar a kol., 2020). Benzaldehyd je těkavá látka, která mandlovým produktům zvyšuje sladkou chuť (Vaikma a kol., 2021). Pointke a kolektiv (2022) ve svém článku potvrdili, že mandlové nápoje mají vysoký obsah benzaldehydu a proces pražení může mít vliv na přítomnost pyrazinu v syrových mandlích.

### **1.2.3 Loupání**

Loupání slouží k odstranění nežádoucích částí při předpřípravě surovin, které se skládají z více složek. Tato technická úprava surovin se používá zejména u luštěnin a obilovin (Mehany a kol., 2023). K izolaci požadovaných částic se využívají metody mletí za sucha nebo za mokra (Ghavidel & Prakash, 2007). Při procesu loupání se odstraňuje vláknina, což bylo dokázáno u několika druhů luštěninových mouk. Tím výrobcí docílí hladší texturu, která je méně zrnitá a

pro spotřebitele senzoričky hodnotnější (Ghavidel & Prakash, 2007; Saldanha do Carmo a kol., 2020; Vogelsang-O'Dwyer a kol., 2021).

#### **1.2.4 Namáčení**

Namáčením dochází k nabobtnání a změknutí rostlinných tkání. Využívá se pro arašídý, lískové ořechy, obiloviny, rýži, sezamová semínka, sójové boby a tygří ořechy (Aydar a kol., 2020). Procesy namáčení jsou přizpůsobeny dle druhu surovin. V článku od Alozie Yetunde a Udofia (2015) o výživových a senzoričkových vlastnostech mandlí, byly mandle namáčeny ve vodě po dobu 6 hodin při 4 °C. Při namáčení mandlí se zvyšuje obsah minerálů a vitaminů B6 a B12. Dále se zvyšuje obsah nerozpustné vlákniny a bioaktivních složek (Sharma a kol., 2018). V práci Kohliové a kolektivu (2017) připravovali sójový extrakt tak, že po roztržení a očištění nechali 500 g suché sóji namáčet po dobu 12 hodin v 1 litru vody. Rehydratované sójové boby byly oloupany a připraveny k rozemletí. Proces předpřípravy rýže pro získání rýžového extraktu popsali ve své práci Padma a kolektiv (2018). Očištěná, drcená rýže byla namáčena ve vodě v poměru 1:2 po dobu jedné hodiny. Namáčení urychlilo následné vaření pro změkčení jádra rýžového zrna.

#### **1.2.5 Blanšírování**

Suroviny se mohou namáčet ve studené vodě anebo blanšírovat v horké, rostlinný materiál je poté měkčí a lépe se odstraní nežádoucí ve vodě rozpustné složky (Pua a kol., 2022). Zahříváním mohou být lépe odstraněny nebo inaktivovány nežádoucí chutě a látky oproti namáčení, ale zvýšená teplota může ovlivnit funkci, chuť a nutriční hodnoty výsledného produktu (Ferawati a kol., 2021). Blanšírování se využívá pro inaktivaci inhibitorů trypsinu a lipoxygenas, které mají vliv na nežádoucí chuťové vlastnosti sójových nápojů (Reyes-Jurado a kol., 2023). Proces blanšírování u jednotlivých surovin popisuje článek od Aydarové (2020), kde jsou zmíněny studie, které se zabývají blanšírováním daného rostlinného materiálu pro následnou extrakci. Například pro blanšírování sójových bobů byly boby nejprve namáčeny po dobu 12 hodin v 0,5% NaHCO<sub>3</sub> a následně v ní povařeny po dobu 30 minut. Co se týče výroby mandlového nápoje, byly mandle blanšírovány ve vodní lázni při 90 °C po dobu 3 minut (Maghsoudlou a kol., 2016). Další příklad úpravy mandlí byl za použití parní lázně při 85 °C po dobu 5–30 minut (Makinde & Adebile, 2018). Kokosový ořech byl blanšírován ve vodě při 80 °C po dobu 10 minut (Seow & Gwee, 1997). Pro lepší zpracování rýžové náhražky mléka je rýže zahřívána při 80 °C 15 minut (Padma a kol., 2018).

### 1.2.6 Extrakce

Extrakční procesy mají zásadní vliv na zpracování surovin, které pak determinují jejich vlastnosti v dalších fázích zpracování výrobku (Yadav a kol., 2017). Pro podpoření vyšší extrakce se surovina namele, jelikož takto zmenší své části a zvětší se kontaktní plocha pro efektivnější a lepší extrakci. Pro rozdrčení materiálu se běžně nepoužívá suché mletí a jsou spíše zvoleny energeticky méně náročné procesy, jako je například mokré mletí. Přídavek vody k rostlinnému materiálu zkracuje dobu zpracování a vylepší tak proces mletí (Bocker & Silva, 2022). Množství přidané vody má vliv na koncentraci mléčné alternativy. Další aspekty, které ovlivňují vlastnosti výsledného produktu je pH, teplota a typ mletí (Seow & Gwee, 1997). Reyes-Juradová a kolektiv (2023) zmiňují, že během extrakce je nutné alkalické prostředí z důvodu zvýšení extrahovatelnosti proteinů. Tudíž lze v procesu extrakce zvýšit pH pomocí NaOH nebo hydrogenuhličitanů. Efektivnější extrakce může být docílena též použitím enzymů nebo zvýšením teploty, která zvyšuje extrahovatelnost tuků, ale může způsobit denaturaci bílkovin (Reyes-Jurado a kol., 2023). Proto jsou vyvíjeny a používány inovativní procesy, které tomu mohou zabránit. K extrakci se mohou využívat i enzymy, které naruší buněčnou stěnu rostlinného materiálu, která je složena z celulosy, hemicelulosy a pektinu. Narušení polysacharidů a proteinů vede k větší extrahovatelnosti a po procesu homogenizace napomáhá k lepší stabilitě výsledného produktu (Jyotika & Preeti, 2021).

### 1.2.7 Oddělení pevných částí

Nedílnou součástí procesu výroby rostlinných nápojů je filtrace. Separací hrubých částic filtrace, dekantací nebo centrifugací je získán extrakt a rostlinné zbytky (Penha a kol., 2021; Yadav a kol., 2017). Množství rostlinného odpadu se liší dle surovin. Rostlinný zbytek ze sójových bobů se nazývá okara. Ta se využívá například jako krmivo pro zvířata anebo se spaluje (O'Toole, 1999). Zbytkem průmyslového mletí obilovin jsou otruby, které obsahují řadu významných živin, jako jsou například vitaminy, minerální látky, lipidy, proteiny, rozpustná a nerozpustná vláknina (Issara & Rawdkuen, 2014). Jelikož procesem mletí a následnou filtrace přichází rostlinný produkt o mnoho mikroživin i makroživin a vyprodukuje velké množství zbytků, snaží se výrobci hledat inovativní a ekologičtější metody, jak rostlinný odpad využít, a tak zároveň snížit negativní dopad na životní prostředí (Penha a kol., 2021).

### 1.2.8 Stabilizace produktu

Spotřebitelé často očekávají, že rostlinné náhražky mléka budou mít podobné senzorické vlastnosti jako kravské mléko (McClements a kol., 2019). Těmito vlastnostmi je myšlena nízká viskozita, neprůhledný, krémově bílý vzhled a charakteristický chuťový profil (Schiano a kol.,



2017). Tyto vizuální, texturní a chuťové vlastnosti jsou ovlivněny mléčným tukem (McCarthy, Lopetcharat, a kol., 2017; Phillips a kol., 1995). Aby výrobci docílili podobných vlastností i u rostlinných alternativ, jsou využívána takzvaná olejnatá tělíska, která jsou získávána z rostlinných materiálů, jako jsou například semena rostlin nebo ořechy (McClements a kol., 2019). Uvnitř semen funguje olejnaté tělísko jako organela, která ukádá triacylglyceroly, které jsou zásobními látkami pro klíčení a růst semenáčků. Olejnatá tělíska jsou kulovitěho tvaru, které obsahují převážně TAG, které jsou obklopeny vrstvou fosfolipidů a proteinů oleosinů (Tzen a kol., 1993). Tato tělíska jsou strukturou velmi podobná mléčným tukovým kapénkám (Michalski, 2009). V článcích od McClementse a kolektivu (2019) a Doa a kolektivu (2018) zmiňují i alternativu k přírodním olejovým tělískům, kdy je možné zkonstruovat umělé tukové kapénky pomocí homogenizačních technologií. Tato směs olejové a vodní fáze se společně homogenizuje a pomocí hydrofilního emulgátoru vytváří emulzi, která napodobuje organoleptické vlastnosti kravského mléka, jako je vzhled, viskozita, stabilita a chuťové vlastnosti.

K rostlinným náhražkám mléka se přidávají další složky jako jsou tuky, zahušťovadla, stabilizátory, barviva, emulgátory, aromata a živiny (McClements a kol., 2019). Emulgátory jsou využívány při zpracování rostlinných náhražek mléka a jeho vhodný výběr má rozhodující vliv na zpracování, trvanlivost a senzorycké vlastnosti produktu (McClements, 2015a). Jsou nedílnou součástí mnoha potravin a tekutin na bázi vody a oleje (Halmos a kol., 2019). Emulgátory mají schopnost přilnout k povrchu kapének, které vznikají během homogenizačního procesu, což jim brání v agregaci s jinými kapénkami (Zang a kol., 2023). Mezi výčet emulgátorů spadají biosurfaktanty, polysacharidy a proteiny. Získávají se z různých rostlinných materiálů, například ze sóji, pšenice, rýže, ova, hrachu a dalších (McClements, 2020). Shlukování kapének může ovlivnit prostředí, například změna pH, teploty nebo koncentrace. McClements a kolektiv (2019) uvádí příklad, kdy luštěninové bílkoviny jsou vysoce nestabilní v blízkosti jejich isoelektrického bodu u hodnot pH 5, iontové síle vyšší než 50 mM a vysokých teplot nad 70 °C. V porovnání zmiňují rostlinné saponiny a polysacharidy, například arabskou gumu, které jsou za stejných podmínek stabilní. Příkladem jiného emulzátoru lecitin. Lecitiny se mohou izolovat jak z živočišných tkání tak i z rostlinných. Rostlinné lecitiny se získávají z olejnatých semen například ze sójových bobů, slunečnicových jader a řepky. Jedná se o fosfolipidy, zejména fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin a fosfatidylinositol (van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008).

K lepším funkčním vlastnostem výrobci využívají zahušťovadla. Jedná se o biopolymery, které ovlivňují texturní a chuťové vlastnosti produktu a zabraňují sedimentaci nerozpustných látek. Při výrobě rostlinných nápojů by se měla využívat jen zahušťovadla rostlinného typu, mezi které patří například škrob, pektin, kukuřičná vláknina a karabová guma. Využívají se i biopolymery z mořských řas, jako je například alginát a karagen. Dále se používá xantanová guma, která je komerčně získávána mikrobiální fermentací (McClements, 2020).

### **1.2.9 Homogenizace**

Rostlinné náhražky mléka jsou koloidní suspenze, které jsou připravovány z extrahovaného rostlinného materiálu (Yadav a kol., 2017). Tyto extrakty obsahují nerozpustné částice, mezi které patří například bílkoviny, škrob a vláknina. Zmiňované částice mají větší hustotu než voda, tudíž snadno sedimentují, a tím se produkt stává nestabilním. K docílení stabilní substance slouží homogenizace, která zlepšuje stabilitu náhražek snížením velikosti částic. Za účelem lepší rozpustnosti se též používají přísady jako jsou hydrokoloidy a emulgátory (Mäkinen a kol., 2016). Při výrobě rostlinných alternativ mlék se využívají a inovují metody, které mohou minimalizovat potřebu těchto přísad a zároveň ochránit fyzikální stabilitu konečného produktu (Bernat a kol., 2014). Metody a zařízení, která jsou využívána pro zlepšení fyzikálně chemických a organoleptických vlastností jsou například vysokotlaký homogenizátor, ultra vysokotlaký homogenizátor, ultrazvuk, pulzní elektrické pole, ultrafialové záření, superkritický oxid uhličitý, mikrofiltrace, mikrofluidizéry, nízkoteplotní plazma, ozon a další (Mehany a kol., 2023).

### **1.2.10 Vysokotlaká a ultra vysokotlaká homogenizace**

Vysokotlaká homogenizace patří mezi netepelné metody zpracování rostlinných náhražek mléka. Je založena na principu vysokého tlaku o hodnotách 100–1000 MPa (Bocker & Silva, 2022). Při ultravysokotlaké homogenizaci jsou tvořeny fyzikální jevy, jako je turbulence, kavitace, smyk a kolaps. Tyto jevy vedou k lepším disperzním schopnostem, jelikož vytvářejí silné interakce mezi makromolekulami ve vodné fázi. Také zmenšují velikost tukových kapének a ničí mikrobiální buňky (Briviba a kol., 2016). Vysokotlakým ošetřením nedochází k porušení kovalentních vazeb u proteinů. Dále nepřispívá ke znehodnocení extraktu eliminací vitaminů a antioxidantů. Zároveň inaktivuje endogenní enzymy a snižuje mikrobiální zatížení (Bocker & Silva, 2022).

### 1.2.11 Tepelné zpracování

Součástí výroby komerčních rostlinných alternativ živočišného mléka je tepelné ošetření. Metodami tepelného zpracování dochází u rostlinných nápojů k prodloužení trvanlivosti výrobku. Jedná se o metody sterilizace, pasterizace a o úpravu vysokoteplotní, používanou pod zkratkou UHT (*ultra-high temperature*) (Fredrikson a kol., 2001; Mäkinen a kol., 2016). Ošetřením výrobku UHT nebo pasterizací dochází k inaktivaci mikroorganismů (Munekata a kol., 2020). Teplota využívaná při pasterizaci se pohybuje od 65 °C až do 85 °C, sterilizací se teploty dostanou nad 100 °C a u UHT až ke 138 °C (Fredrikson a kol., 2001). Při úpravě za vysokých teplot se zvyšuje rozpustnost živin a jejich výtěžnost, nicméně může též ovlivnit i denuraci bílkovin (Yadav a kol., 2017). Vysoké teploty mohou ovlivnit vlastnosti bílkovin tak, že dojde ke změnám stability, chutě, vůně a barvy rostlinného nápoje (Kwok & Niranjana, 1995; Rustom a kol., 1996). U rostlinných nápojů s vysokou koncentrací škrobu se pro prodloužení trvanlivosti doporučuje ošetření netepelné (Sethi a kol., 2016). Proto se vyvíjejí a využívají nové alternativy k tepelnému ošetření, jako je například použití vysokého tlaku, ultrafialová sterilizace, pulzní elektrické pole a ultrazvuk (Silva a kol., 2020).

### 1.2.12 Ultrazvuk

Ultrazvukové přístroje jsou využívány jako ultrazvukové homogenizátory pro standardizaci velikosti částic a modifikaci bílkovin (Abdullah a kol., 2018; Mehany a kol., 2023). Cílem je zlepšení homogenity emulze (Mehany a kol., 2023). Zmenšením velikosti částic jsou extrakty rostlinných surovin více tekuté a stabilní (Abdullah a kol., 2018). Ultrazvukem asistovaná technologie má mnoho výhod, jako je nižší spotřeba organických rozpouštědel, kratší doba extrakce, využívání nižších teplot a významnější šetrnost k životnímu prostředí (Penha a kol., 2021). Benefitem vysoce intenzivního ultrazvuku u rostlinných náhražek mlék je nízká ztráta živin (Maghsoudlou a kol., 2016). Ultrazvuk je též používán k inaktivaci patogenních mikroorganismů a endogenních enzymů (Maghsoudlou a kol., 2016; Mehany a kol., 2023). Hlavním mechanismem ošetření ultrazvukem je kavitace (Taha a kol., 2023). Jedná se o jev, kde průchodem ultrazvukové vlny dochází k tvorbě a rozpadu kavitačních mikrobublin v ošetřovaném systému. Toto mechanické působení podporuje přenos látek mezi vzorkem a rozpouštědlem, tedy dochází ke zvýšení účinnosti extrakce organických sloučenin (Penha a kol., 2021; Taha a kol., 2023). Zvuková vlna odpovídá frekvenci mezi 20 kHz až 100 MHz. Metody používané v potravinářství se dělí na nízkofrekvenční od 16 do 100 kHz a vysokofrekvenční od 100 kHz až do 1 MHz (Soria & Villamiel, 2010). Ultrazvukové vlny vytváří bubliny, které se přiblíží k buněčným stěnám a v jejich blízkosti prasknou a vytvoří

tlakový rozdíl. Tento proces může, jak již bylo zmíněno, usnadnit extrakci a inaktivaci patogenů (Mehany a kol., 2023; Vanga a kol., 2020). Ultrazvuk prodlužuje dobu skladování, minimalizuje ztrátu chuťových vlastností v porovnání s tepelným zpracováním, zlepšuje fyzikální stabilitu a viskozitu (Paul a kol., 2020; Silva a kol., 2020). Zároveň je tato metoda energeticky méně náročná (Silva a kol., 2020).

### **1.2.13 Pulzní elektrické pole**

Pulzní elektrické pole je technikou netepelného zpracování extraktů pro výrobu rostlinné náhražky mléka, která je využívána pro inaktivaci mikroorganismů a deaktivaci enzymů (Barba a kol., 2015; Mehany a kol., 2023). Při ošetření se výrobek vystaví krátkým pulzům s velmi vysokým napětím (Mehany a kol., 2023). Ošetřovací komoru tvoří dvě elektrody, které mají rozdílný potenciál, a tak vytváří elektrické pole (Heinz a kol., 2001). Mezi elektrodami je výrobek vystaven krátkým pulzům v časových hodnotách milisekund až mikrosekund, obvykle 1–5  $\mu$ s (Munekata a kol., 2020; Puértolas a kol., 2016; Venkateswara Rao a kol., 2023). V článku od Mune Katy a kolektivu (2020) zmiňují, že proces probíhá při vysokém napětí 1 až 80 kV/cm. Venkateswara Rao a kolektiv (2023) uvádějí hodnoty od 10 až 50 kV/cm a frekvenci 200 až 400 Hz. K poškození nebo zániku buněk dochází v případech, kdy jsou překročeny hodnoty indukce membránového potenciálu vytvořené elektrickým polem (Silva a kol., 2020). Při kritických hodnotách tvoří transmembránový potenciál póry v buněčných strukturách mikroorganismů, a to zajišťuje permeabilitu buněčných membrán tzv. elektroporaci. Tento proces narušuje proteiny a lipidovou dvojvrstvu membrán mikroorganismů, které jsou dále vystavovány extracelulárním složkám, a tak dochází k jejich rozpadu (Bocker & Silva, 2022; Novickij a kol., 2020). Použitím metody pulzního elektrického pole se u rostlinných náhražek mlék zvyšuje koloidní stabilita a je též účinná pro zmenšení částic v rostlinném extraktu (Manassero a kol., 2016).

### **1.2.14 Ultrafialové záření**

Ultrafialová sterilizace je ošetřující metodou založenou na germicidním působení pomocí ultrafialového záření. Tato technologie využívá záření o vlnové délce od 200 do 280 nm (Bocker & Silva, 2022; Mehany a kol., 2023). Záření způsobuje mutační změny deoxyribonukleové kyseliny mikroorganismů, a tím ovlivní jejich morfológickou strukturu a reprodukční funkci (Atilgan a kol., 2021).

### 1.2.15 Superkritický oxid uhličitý

Technologie se superkritickým oxidem uhličitým, anglicky *supercritical carbon dioxide technology*, je založena na kombinaci oxidu uhličitého a tlaku. Touto metodou lze zničit patogeny bez ovlivnění nutričních hodnot a organoleptických vlastností výrobku (Jiménez-Sánchez a kol., 2017). Superkritický oxid uhličitý ovlivňuje permeabilitu buněčné membrány. Proniknutím superkritické kapaliny přes membránu dojde uvnitř buňky ke snížení pH, a tím k usmrcení mikroorganismů (Mehany a kol., 2023)

### 1.2.16 Studená atmosférická plazma, CAP

Pro antimikrobiální ošetření se využívá i aplikace studené atmosférické plazmy, v cizojazyčné literatuře používána zkratka CAP, cold atmospheric plasma (Wu a kol., 2020). Skupenství rozdělujeme na pevné, kapalné a plynné, čtvrtým skupenstvím je plazma, což je částečně nebo plně ionizovaný plyn složený z iontů kladných, záporných, volných radikálů a neutrálních částic. Průchodem elektrického proudu přes neutrální plyn dochází k disociaci plynných molekul (Kiš a kol., 2020; Wielogorska a kol., 2019). Mechanismus této metody je založen na produkci vysoce reaktivních forem kyslíku a dusíku v plazmatu v průlomovém napětí (Hojnik a kol., 2021; Kiš a kol., 2020). K rozvoji plazmových systémů není potřeba použití vakuových zařízení ani drahých nosných plynů (Hojnik a kol., 2021). Netermální plazma může být generovaná s nízkou spotřebou energie za atmosférického tlaku v okolních teplotních podmínkách (Moreau a kol., 2008). V potravinářství je ošetření studenou plazmou schopno inaktivovat mikroorganismy a houby produkující mykotoxiny. Principem je schopnost plazmy díky volným radikálům, reaktivním formám a záření v rozmezí od ultrafialového (Huvarová) až po viditelné (Dwyer a kol.) inaktivovat komplexy biochemicky aktivních částic. Volné radikály způsobují leptání povrchu spor, volatilizaci sloučenin ze spor a ničení mikrobiální DNA ultrafialovým zářením. Zmiňované reaktivní formy jsou spojovány s přímými oxidačními účinky na vnější povrch mikrobiální buňky (Hamad a kol., 2023; Mehany a kol., 2023; Wang a kol., 2023). Tato indukovaná oxidace může zvýšit propustnost membrán a poškození buněčných stěn, tím dochází k fragmentaci a úniku DNA, zničení buněčných proteinů, apoptóze buněk a deformaci myceliálních spor. Všechny tyto destrukce mohou zajistit stabilnější substance rostlinných náhražek mléka. Nízkoteplotní plazma je tedy další inovativní možností k stabilnější produkci rostlinných nápojů než nám mohou poskytnout tepelné metody (Mehany a kol., 2023).

### **1.2.17 Ohmický ohřev**

Ohmický ohřev spadá do netradičních tepelných technologií při zpracování rostlinných nápojů. Mechanismem ohmického ohřevu je procházení elektrického proudu o frekvenci 50–60 Hz potravinovou matricí, přičemž dochází díky elektrickému odporu k uvolňování tepelné energie. Elektrická energie přiváděná do systému je transportována prostřednictvím rezistivního prostředí, zvyšuje pohyblivost molekul, a tím se podporuje uvolňování tepla (Saxena a kol., 2017; Wattanayon a kol., 2021). Tepelným účinkem ohmické energie je rychlý a rovnoměrný ohřev, účinkem netepelným je tzv. elektropermeabilizace (Cho & Kang, 2023). Rovnoměrný ohřev média poškozuje buněčné membrány mikroorganismů, a tak snižuje patogenní zátěž produktu. Zvýšení celkové teploty média a rovnoměrný ohřev nikterak mechanicky produkt nepoškozuje. Ohmický ohřev odstraňuje kovové ionty z metaloenzymů, což způsobuje denaturaci enzymů (Atuonwu a kol., 2020; Li a kol., 2015). Podle studie Lua a kolektivu (2015), kde použili ohmické topné zařízení na výrobu sójové náhražky mléka, je ohmický ohřev rychlou a energeticky účinnou technologií. Ohmický ohřev měl jak tepelné účinky, tak i elektrochemické. V porovnání s indukčním vařičem a elektrickým sporákem urychlil ohmický ohřev při střídavém proudu 220 V a 50 Hz aktivaci inhibitorů trypsinu a chymotrypsinu. Zahřívání ale mírně zvýšilo agregaci proteinů.

### **1.2.18 Fortifikace**

Mnoho spotřebitelů se snaží omezit nebo plně eliminuje konzumaci živočišných produktů. Je proto nutné zajistit nejen fyzikálně-chemické a sensorické vlastnosti živočišných náhražek, ale i nutriční. Potencionálním problémem u rostlinné stravy je nedostatek vápníku, vitamínu B12, vitamínu D a  $\omega$ -3 mastných kyselin (McClements, 2020). Proto v přípravě rostlinných nápojů dochází k fortifikaci. Jedná se o proces přidávání živin do poživatin za účelem obohacení produktu a prevence z nedostatku živin či vyvážení celkového profilu živin ve stravě (Dwyer a kol., 2015). Bioaktivní látky se přidávají dle jejich interakce s vodou. Pokud byla rostlinná náhražka mléka zpracována homogenizací olejové a vodní fáze, lze hydrofobní bioaktivní látky rozpustit v olejové fázi před vytvořením požadované emulze. V případě, že se jedná o živiny hydrofilní povahy, mohou být přidány do produktu před emulgací nebo po ní (McClements, 2015b, 2018).

### **1.2.19 Aseptické balení a skladování**

Výsledný produkt se běžně balí do kartónových obalů, z nichž nejznámější je Tetra Pak a nebo do plastových lahví a je skladován při teplotě 4 °C (Aydar a kol., 2020; Reyes-Jurado a kol.,

2023). Rostlinné náhražky mléka mohou být i v sušené formě, kdy je v tekuté formě náhražka stabilizována a pak sušena na stabilní prášek (Reyes-Jurado a kol., 2023).

### 1.3 Nutriční hodnoty

Hodnoty makroživin vybraných rostlinných náhražek mléka (tab.1) jsou získány z potravinářské databáze v USDA (U.S. Department of Agriculture, 2024). V této bakalářské práci slouží uvedený přehled pro přibližnou představu obsahu nutrientů v rostlinných alternativách mléka, jelikož u každé značky se mohou hodnoty nepatrně lišit. Jak již bylo zmíněno v kapitole Sója (1.2.5), v obsahu proteinů se může sójová náhražka rovnat mléku kravskému. Ostatní zmíněné alternativy mají hodnoty proteinů velmi nízké, a to zejména náhražka kokosová a rýžová. Optimálně by se mohly rostlinné náhražky mléka nutričně podobat mléku kravskému, a proto jsou zpracovávány luštěninové bílkovinné koncentráty a izoláty, které by mohly formulovat rostlinné alternativy s hodnotnějším nutričním profilem (Vogelsang-O'Dwyer a kol., 2021). Například Chalupa-Krebdak a kolektiv (2018) zmiňují, že jeden z pěti zkoumaných mandlových nápojů v jejich studii byl obohacen hrachovou a rýžovou bílkovinou, aby byl vylepšen proteinový profil výrobku. Rýžový nápoj má jemně nasládlou chuť, jelikož obsahuje nejvyšší hodnoty sacharidů. Samotná rýže obsahuje velké množství škrobu a kvůli stabilitě rýžové alternativy mléka se škrob štěpí enzymatickou hydrolyzou (Silva a kol., 2020). Co se týče celkového obsahu lipidů, nejvyšší hodnoty se vyskytují u ovesa a kokosu. Podrobnější popsaní jejich lipidových profilů je zmíněno níže.

**Tabulka 1.** Nutriční hodnoty vybraných rostlinných náhražek mléka (U.S. Department of Agriculture, 2024)

Nutriční hodnoty vztažené na 100 g produktu					
druh rostlinné náhražky mléka	voda (g)	proteiny (g)	lipidy (g)	sacharidy (g)	vláknina (g)
kokosová	94,57	0,21	2,5	2,08	0
mandlová	97,4	0,55	1,22	0	<0,45
ovesná	92,6	0,8	2,75	2,32	<0,75
rýžová	89,28	0,28	0,97	5,28	0,3
sójová	92,4	3,55	2,12	0,56	<0,45

## **Kokos**

Kokosová náhražka mléka je díky vysokému obsahu tuků nedílnou součástí při přípravě mnoha pokrmů, kde se využívá jako zahušťovadlo (Sethi a kol., 2016). Kokosové alternativy mléka obsahují triacylglyceroly se středně dlouhým řetězcem, které mohou přispívat k regulaci tělesné hmotnosti, optimalizovat hladiny vysokodenzitních lipoproteinů (high density lipoprotein, zkráceně HDL), snižovat LDL a cholesterol a mít příznivé účinky pro citlivost na inzulin (Chalupa-Krebzdak a kol., 2018). Triacylglyceroly se středně dlouhými řetězci jsou snadněji stravitelné a v porovnání s jinými rostlinnými alternativy, které mají mastné kyseliny s dlouhými řetězci, se lépe vstřebávají a metabolizují v játrech. Vzniklé metabolity, ketolátky, přispívají k lepšímu fungování mozku a mohou být prospěšné pro osoby s počínajícími poruchami paměti nebo již rozvinutou Alzheimerovou chorobou (Fernando a kol., 2015). Z těchto mastných kyselin je zmiňována zejména kyselina laurová, která v podobě monolaurinu má antimikrobiální účinky. Dále je spojována se snížením rizika kardiovaskulárních onemocnění (Alyaqoubi a kol., 2015). Dalším benefitem jsou antioxidační účinky díky vitamínu E (Sethi a kol., 2016). Kokosová náhražka mléka je sice bohatá obsahem lipidů, ale pokud se jedná o bílkoviny, patří tato alternativa k těm s nejmenším množstvím bílkovin. Kokosový endosperm obsahuje bílkoviny, které jsou z 80 % globuliny a albuminy. Tento typ bílkovin převažuje i v kokosové alternativě mléka (Seow & Gwee, 1997).

## **Mandle**

Mandlová náhražka mléka je koloidní disperze, která vznikne smícháním vody s namletými nebo pastovanými mandlemi (Vanga & Raghavan, 2018). Mandle tvoří z 35 až 52 % lipidy (Maria & Victoria, 2018). Mandle jsou složeny převážně z triacylglycerolů, značný podíl ale tvoří i polynenasycené a mononenasycené mastné kyseliny, z nichž nejvíce zastoupená je kyselina olejová (Robbins a kol., 2011). Mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) pomáhají při snižování LDL při regulaci hmotnosti (Vanga & Raghavan, 2018). Obsah bílkovin se pohybuje kolem 22–25 %, z nichž se hlavní protein nazývá amandin, ten se řadí do leguminové skupiny semenových proteinů (Grundy a kol., 2016; Maria & Victoria, 2018). Kromě zmiňovaných lipidů a proteinů je mandlové jádro bohaté na vitaminy a minerální látky. Obsahuje vitamin E, jehož složkou je  $\alpha$ - tokoferol se silnými antioxidačními účinky. Dále mandle obsahují fytosteroly, které též jako MUFA mohou snižovat hodnoty LDL, a tak přispívat k prevenci kardiovaskulárních onemocnění (Grundy a kol., 2016). Stabilitu mandlové náhražky mléka zajišťují přidané emulgátory jako například lecitin. Bílkoviny mají emulgační



schopnosti, ale v mandlovém vodném extraktu nestačí k docílení stabilního mandlového produktu (Silva a kol., 2020).

### **Oves**

Díky vyváženým nutričním hodnotám ovsu je ovesná náhražka mléka zdrojem různých bioaktivních živin. Kromě bílkovin, lipidů, vlákniny a vitaminů obsahuje látky jakou jsou flavonoidy, tokoferoly a avenanthramidy (Yu a kol., 2023). Oves je zdrojem rozpustné vlákniny  $\beta$ -glukanu, který je významný především ve schopnosti snižovat cholesterol a tento účinek byl prokázán i u ovesných nápojů (Sang & Chu, 2017; Zang a kol., 2023). Onningová a kolektiv (1999) prokázali, že denní konzumace ovesné náhražky mléka, která obsahuje 0,5 g  $\beta$ -glukanu na 100 g snižuje hladinu LDL v séru. Pro spotřebitele může být poněkud obtížné zjištění obsahu  $\beta$ -glukanu v ovesném nápoji, jelikož se tyto hodnoty často na etikety napřímo neuvádí (Chalupa-Krebsdak a kol., 2018). Oves také produkuje fytochemikálie, konkrétně steroidní saponiny a již zmiňované avenanthramidy. Jedná se o alkaloid s protizánětlivými a antioxidantními účinky (Sang & Chu, 2017; Yu a kol., 2023). V porovnání s kravským mlékem má ovesná náhražka vlákninu a alkaloidy, které jsou prospěšné pro lidský organismus, avšak kravské mléko je bohatší na aminokyseliny, vápník a vitamin A. Z těchto důvodů není vhodné zcela nahradit mléčné výrobky v období vývoje dítěte do věku 5 let (Sethi a kol., 2016; Yu a kol., 2023). Během komerčního zpracování ovsu pro ovesný nápoj ztrácí některé živiny, a proto jsou tyto alternativy mléka obohacovány, aby výsledný produkt splňoval nutriční požadavky. Přidáván je například vitamin A ve formě esteru. Vitamin D je dodáván v podobě D2 anebo D3 ve formě, kdy je dispergován ve vodě nebo tucích (Zang a kol., 2023).

### **Rýže**

Rýže je velmi dobrým zdrojem energie, jelikož obsahuje téměř 90 % škrobu a přibližně 10 % bílkovin, avšak má nízký obsah lipidů (Jiang a kol., 2016; Silva a kol., 2020). Dále obsahuje minerální látky, například fosfor, hořčík, draslík a železo, které se hojně vyskytuje v otrubách (Paul a kol., 2020; Silva a kol., 2020). Přestože má rýže značné množství železa, při zpracování rýžové náhražky mléka se otruby odstraňují, a tak musí být výsledný produkt železem fortifikován. Proto se výrobci zaměřují na výrobu rýžového nápoje z otrub (Paul a kol., 2020). Při odstranění otrub nepřichází rýžová náhražka mléka jen o železo, ale také o  $\gamma$ -oryzanol, bioaktivní sloučeninu se schopností snižovat cholesterol v organismu (Silva a kol., 2020). Namáčením rýže před následným zpracováním mohou výrobci docílit zvýšení hodnot minerálních látek a vitaminů v náhražce, konkrétně B6 a B12 (Paul a kol., 2020).

## **Sója**

Sójová náhražka mléka obsahuje esenciální mononenasyčené a polynenasycené mastné kyseliny jako je například kyselina linolová a kyselina linolenová (Sethi a kol., 2016; Silva a kol., 2020). Sójové boby a izolované sójové bílkoviny obsahují značné množství isoflavonů, které spadají do skupiny nesteroidních estrogenů, ale chemickou strukturou a vlastnostmi jsou estrogenům podobné. Nejvíce se strukturně, tak i funkčně podobají estrogeneru savců estradiolu, proto jsou také označovány jako fytoestrogeny (Omoni & Aluko, 2005; Setchell a kol., 2002). Sójové boby jsou bohatým zdrojem izoflavonů (Omoni & Aluko, 2005). Genistein je nejrozšířenějším izoflavonem v sóji, je velmi biologicky aktivní a nejrozsáhleji zkoumaný. Izoflavony se dokáží vázat na estrogenové receptory a jejich účinky jsou dle typu tkáně, ve které působí, hormonální či nehormonální (Omoni & Aluko, 2005; Setchell a kol., 2002). Izoflavony mohou mít pro lidské tělo mnoho příznivých účinků. Zmiňovány jsou například preventivní účinky před kardiovaskulárními chorobami, osteoporóze anebo rakovině (Sethi a kol., 2016). Obsah nutričních látek se může změnit procesem zpracování. Při zpracování sóji můžeme odstranit nežádoucí antinutrienty, avšak při vysokých teplotách může dojít k Maillardově reakci, která sníží obsah aminokyselin (Rizzo & Baroni, 2018). V práci od Kudeřkové a kolektivu (2021) autoři analyzovali aminokyselinový profil u sójových bobů a sójových výrobků zahrnující i sójový nápoj. V porovnání těchto profilů nebyly zjištěny žádné rozdíly.

### **1.4 Spotřebitelé**

Poptávka po rostlinných nemléčných produktech stále roste (McCarthy, Parker, a kol., 2017). Důvodů, proč tomu tak je, existuje celá řada. Rostlinné náhražky mléka mohou být vhodnou volbou pro osoby s laktosovou intolerancí anebo s alergií na mléčnou bílkovinu (Mäkinen a kol., 2016). Dalším důvodem je životní styl a stále více populární veganství (Aydar a kol., 2020). Výběr náhražek může být též odůvodněn obavou spotřebitelů, že produkty živočišného druhu obsahují rezidua růstových hormonů a antibiotik (Mäkinen a kol., 2016). Kromě zdravotních aspektů roste zájem o ochranu životního prostředí. Zvýšené povědomí o environmentálních dopadech živočišné produkce přiměla některé spotřebitele k přechodu na rostlinnou stravu (Jeske a kol., 2018). Problém by ale mohl nastat u osob, zejména u dětí ve vývoji, které zcela nahradí mléčné produkty za rostlinné. U těchto osob se může projevit deficiencie některých živin. Příkladem může být vápník, který není v rostlinných nefortifikovaných náhražkách tak hojně zastoupený jako v kravském mléce (Chalupa-Krebzdek a kol., 2018).

### **1.4.1 Laktosová intolerance**

Mnoho spotřebitelů nahrazuje mléčné výrobky rostlinnými alternativy z důvodu laktosové intolerance. Laktosa je disacharid složený z D-glukosy a D-galaktosy, která se běžně vyskytuje v savčím mléce (Szilagyi & Ishayek, 2018). Tento mléčný cukr je štěpen v trávicím traktu enzymem  $\beta$ -galaktosidasou, který produkuje kartáčový lem enterocytů. Takto je disacharid rozštěpen na monosacharidy glukosu a galaktosu, které se díky sodíkodraslíkové pumpě nebo difuzí transportují do enterocytů, z nichž se dále portálním oběhem dostávají do jater (Hynek a kol., 2022; Lata a kol., 2011). Osoby s nedostatečnou aktivitou  $\beta$ -galaktosidasy mají tzv. laktosovou intoleranci. Laktosa se v tenkém střevě nemůže vstřebat, zkvasí, a tak způsobuje zažívací obtíže (Hynek a kol., 2022). Symptomy meteorismu jsou způsobeny intraluminálními osmotickými silami, které závisí na množství nevstřebané laktosy (He a kol., 2008). Kromě zmíněné plynatosti jsou dalšími příznaky nauzea, zvracení, řídká stolice, borborygmy a bolesti břicha (Vesa a kol., 2000).

### **1.4.2 Alergie na bílkoviny kravského mléka**

Alergie na bílkoviny kravského mléka patří v populaci mezi jedny z nejčastějších alergií. Jelikož se mléko v potravinářství hojně využívá, je tedy tato bílkovina obsažena v nespočtu potravinových výrobků (Villa a kol., 2018). U potravinových alergií se jedná o opakované imunitní reakce při expozici s určitou potravinou. Většina potravin vyvolává reakce v syrovém stavu, avšak u některých složek se může dostavit imunitní reakce i po tepelné úpravě. Důležité je nezaměňovat alergii na kravskou bílkovinu s intolerancí na mléko. U intolerance se jedná o neschopnost trávit mléčný cukr laktosu viz kapitola Laktosová intolerance (1.4.1), zatímco alergie na kravské mléko je v důsledku imunologické reakce na bílkovinu obsaženou v mléce (Boyce a kol., 2010). Ve 100 ml kravského mléka jsou přibližně 3 gramy bílkovin tvořeny minimálně 25 druhy. Všechny tyto proteiny mohou působit jako antigeny a vyvolat alergickou reakci (Martorell-Aragonés a kol., 2015). Proteiny obsažené v mléce se dělí do dvou skupin, z nichž první jsou kaseiny a druhé sérové bílkoviny. Jako hlavní alergen je považován kasein,  $\beta$ -laktoglobulin a  $\alpha$ -laktalbumin a též bílkoviny, které se vyskytují sice v menším množství, ale mají také velký význam při vyvolání alergických reakcí, laktoferin, imunoglobuliny a hovězí sérový albumin (Villa a kol., 2018).

### **1.4.3 Veganství**

Veganem je osoba, která se rozhodne žít veganským životním stylem, kdy nekonzumuje žádné produkty živočišného původu. V jídelníčku tedy vynechává červené maso, ryby, drůbež, vejce, mléko a produkty z mléka. Veganství může být etickým rozhodnutím související s právy zvířat.

Tento životní styl může být také motivován environmentálními aspekty, jelikož konzumace masa má negativní dopad na životní prostředí. To může vést k jeho znečištění, nadměrné spotřebě vody, odlesňování a vzniku emisí oxidu uhličitého a metanu. Odpírání živočišných produktů může mít pro vegany přínos z hlediska kvality života a předcházení některých civilizačních onemocnění (Silva a kol., 2020).

#### **1.4.4 Environmentální aspekty**

Suová a kolektiv (2024) se ve své studii zabývali tím, co přiměje spotřebitele ke koupi rostlinných náhražek mléka. Sledovali faktory, které ovlivňují ochotu zákazníků zaplatit za tyto produkty. Právě environmentální přínosy měly nejvýznamnější vliv, který současně koreluje i s důvody etickými pro dobré životní podmínky zvířat. Z jejich výsledků vychází, že spotřebitelé, kteří upřednostňují zdravý životní styl, mají větší tendenci oceňovat rostlinné náhražky mléka pro nižší dopad na životní prostředí. Nynější produkce, distribuce a spotřeba potravin způsobují třetinu emisí skleníkových plynů ovlivněnou antropogenní činností (Crippa a kol., 2021). Záměna rostlinné stravy za živočišnou by mohla mít pozitivní vliv na ekosystémy, díky uvolnění půdních ploch, které jsou využívány pro krmivo hospodářských zvířat. Prostor mohou osídlit ostatní organismy a menší konzumace živočišných produktů by mohla zajistit snížení skleníkových plynů (Carlsson Kanyama a kol., 2021). Carlsson Kanyamová a kolektiv (2021) srovnávali literaturu o klimatických změnách a porovnávali živočišné mléko s rostlinnými náhražkami. Sledovali parametry emisí skleníkových plynů, emise způsobující acidifikaci, eutrofizaci a látky poškozující ozonovou vrstvu. Dále spotřebu půdy, vody a energie. Z výsledků jejich výzkumu vyplývá, že rostlinné alternativy mléčných výrobků mají téměř ve všech aspektech minimální nebo nižší dopady na životní prostředí.

#### **1.5 Metody analýzy proteinů**

V této kapitole jsou uvedeny vybrané metody a k nim příslušné studie pro analýzu rostlinných náhražek mléka. Jedná se o metody, které v rostlinných náhražkách mléka stanovují celkové zastoupení bílkovin ve vzorku, jako je například mikročipová gelová elektroforéza (Balogh-Hartmann a kol., 2023) nebo Dumasova a Bradfordova metoda (Roland a kol., 2023). Zmíněna je též metoda analýzy proteinů, která stanovuje složení aminokyselin pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti detergentu dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) (Bonke a kol., 2020). Tato kapitola obsahuje rovněž studii, která se zabývá rozlišením rostlinných náhražek mléka a kravského mléka pomocí absorpční spektroskopie (Stefanakis a kol., 2022).

### 1.5.1 Gelová elektroforéza

Jednou z metod stanovení proteinů může být gelová elektroforéza, jejímž principem je rozdělení analyzovaných nabitých látek dle jejich pohybu gelem vyvolaným působením elektrického pole, který je ovlivněn velikostí molekul. Nejčastěji se využívá polyakrylamidový anebo agarosový gel. Ve srovnání efektivity rozdělení molekul dochází v gelové elektroforéze k účinnější separaci než v roztocích (Hynek a kol., 2022).

#### Mikročipová gelová elektroforéza

Studie Balogh-Hartmannové a kolektivu (2023) byla založena na analýze proteinů pomocí mikročipové gelové elektroforézy (*microchip gel electrophoretic method*, MGE). Konkrétně se jednalo o simultánní stanovení proteinových složek a stanovení celkového zastoupení proteinů v rostlinných alternativách mléka. Cílem jejich studie bylo analyzovat proteinové frakce a komplexní profil proteinových složek. Následně byla tato data porovnána s hodnotami uvedenými na etiketách. Také porovnávali obsah bílkovin výrobků ze stejného rostlinného materiálu od různých výrobců s odlišným datem spotřeby. Analýza proteinů pomocí metody MGE v rostlinných náhražkách mléka byla provedena pomocí soupravy LabChip, která obsahuje mikročipy a činidla potřebná pro analýzu a pomocí Agilent bioanalyzer s laserem indukovanou fluorescencí. MGE byla v článku zhodnocena jako velmi vhodná metoda pro stanovení proteinových frakcí a celkové koncentrace proteinů, jelikož se jedná o rychlou metodu, která kromě fluorescenčního značení nevyžaduje žádný jiný krok přípravy vzorku. Metoda kvantifikovala relativní množství proteinových frakcí a umožnila rozlišení proteinů na základě jejich elektroforetického profilu. Elektroforetické profily se u jednotlivých druhů rostlinných alternativ mléka lišily. V případě porovnání stejných typů rostlinných náhražek dle značek, se ale proteinové profily významně nelišily.

### 1.5.2 HPCE a SDS-PAGE

Bonkeová a kolektiv (2020) se zabývali ve své studii kombinací rostlinných materiálů pro nové rostlinné náhražky mléka k dosažení lepšího aminokyselinového profilu. Kombinovali rostlinné nápoje s vysokým obsahem ovsu a luštěnin, konkrétně s hrachem setým a čočkou jedlou. Z nich bylo připraveno osm směsných rostlinných alternativ a tři jednosložkové ve třech různých variantách, aby bylo otestováno ošetření. Před samotnou analýzou pomocí vysokoúčinné kapilární elektroforézy (*The High Performance Capillary Electrophoresis*, HPCE) byly vzorky lyofilizovány a hydrolyzovány. Pro derivatizaci vzorků bylo použito Sangerovo činidlo, následně byly vzorky zahřáty a zanalyzovány. Metoda byla nastavena pro

derivatizované vzorky, UV detekci při 360 nm, teplotě 50 °C, napětí 18 kV a času 75 minut. Doba nástřiku byla zvolena na dvě sekundy při tlaku 50 mbar.

V této studii také využili gelovou elektroforézou SDS-PAGE (*sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) pro kvalitativní hodnocení proteinů. Jedná se o elektroforézu, která probíhá v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti detergentu dodecylsírany sodného. Analyzovali jak supernatant tak sediment vzorků rostlinných náhražek mléka na třech různých gelech. Celkovým výsledkem studie bylo zjištění, které směsi o různém procentuálním poměru ovesné, hrachové a čočkové bílkoviny mají nejlepší složení esenciálních aminokyselin ve srovnání s doporučeným denním příjmem.

### **1.5.2 Absorpční spektroskopie**

Ve studii Stefanakisové a kolektivu (2022) autoři rozlišovali kravské mléko a rostlinné alternativy mléka pomocí absorpční spektroskopie, konkrétně s využitím UV/VIS/NIR spektrofotometru. Soubor vzorků byl složen z komerčně dostupných homogenizovaných kravských mlék a rostlinných alternativ mléka. Vybraná mléka a rostlinné náhražky byly porovnány a rozlišeny pomocí analýzy hlavních komponentů a kvadratickou diskriminační analýzou. Také se podařilo rozlišit původ rostlinných alternativ mléka pomocí absorpčního koeficientu. Například bylo zjištěno, že sójové náhražky mléka mají nižší hodnoty absorpčního koeficientu než kokosové náhražky. To může být způsobeno tím, že sójová alternativa mléka má v porovnání s kokosovým značně vyšší obsah tuků a bílkovin.

### **1.5.3 Dumasova a Bradfordova metoda**

Porovnání rostlinných náhražek mléka dle kvality proteinů se zabývá studie od Rolandové a kolektivu (2023). Rostlinné alternativy oproti kravskému mléku mají nižší obsah bílkovin a kvalitu bílkovin může ovlivnit i vysoké zpracování produktů z rostlinného materiálu. V této studii se analyzovalo 17 čerstvě vyrobených rostlinných alternativ mléka. Tím byly myšleny výrobky s dlouhou dobou trvanlivosti, které v době nákupu nebyly starší než čtyři týdny a výrobky s krátkou dobou trvanlivosti, které nebyly starší více jak dva týdny. Nejprve byl v laboratoři stanoven obsah bílkovin Dumasovou metodou, kdy je obsah bílkovin stanoven pomocí celkového obsahu dusíku. Tato metoda byla provedena pomocí přístroje Dumatherm. Dále byla koncentrace bílkovin stanovena Bradfordovým testem. V tomto testu byla využívána mikrotitrační destička obsahující 96 jamek. Vzorky rostlinných náhražek mléka byly naředěny na základě deklarovaného obsahu bílkovin. Ke vzorkům bylo přidáno barvivo Coomassie Brilliant Blue a následně byla destička inkubována po dobu 10 minut. Poté byla naměřena

absorbance při 595 nm. Výsledné hodnoty obou těchto metod byly srovnány s hodnotami uvedených na etiketách produktů. Toto porovnání bylo podstatné pro získání validované hodnoty obsahu bílkovin a k určení úrovně proteinových markerů, které vznikají během zpracování. Výsledkem porovnání bylo, že skoro u všech rostlinných náhražek, které byly změřeny Bradfordovým testem, byly hodnoty nižší, než jaké výrobci deklarují. Výjimkou je sójová náhražka mléka, která u všech měření vykazovala podobný obsah bílkovin. Ve zmiňované studii usuzují, že tím, že většina produktů rostlinných alternativ mléka byla při zpracování ošetřena metodou UHT, mohlo dojít k denaturaci bílkovin, a tudíž i k agregaci a precipitaci bílkovin, což mohlo ovlivnit jejich schopnost vázat barvivo a tím mohlo dojít k ovlivnění výsledků testu. V sójové náhražce mléka mohlo dojít k nižší agregaci, a tudíž se proteiny mohly na barvivo navázat. Dále dle porovnání hodnot deklarovaných s hodnotami naměřenými usuzují, že v průmyslu se stanovuje obsah bílkovin pomocí Dumasovy metody anebo jiných metod založených na obsahu dusíku ve vzorcích. Na tomto principu je založena i Kjeldahlova metoda.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této bakalářské práce byla zpracována na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze v Laboratoři aplikované proteomiky. V této laboratoři byly připraveny a naměřeny vzorky známých rostlinných náhražek mléka a jejich příslušných surovin pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*).

### 2.1 Použité chemikálie a přístroje

#### Chemikálie

- 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB) – Sigma-Aldrich, USA
- acetonitril (ACN) – Sigma-Aldrich, USA
- enzym trypsin – Pierce™ Trypsin Protease, MS-Grade; Thermo Fisher Scientific, USA
- hydrogenuhličitan amonný ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) – Lachema, ČR
- peptide calibration standard II (PEP II) – Bruker Daltonics, Německo
- trifluoroctová kyselina (TFA) – Sigma-Aldrich, USA

#### Přístroje

- analytické váhy ABT 120-5DM – KERN, Německo
- centrifuga MiniSpin – Eppendorf, Německo
- hmotnosti spektrometr MALDI-TOF – Bruker, Autoflex Speed, Německo
- pipetovací špičky ZIP-TIP obsahující revezní fázi  $\text{C}_{18}$  – Millipore Corporation, Merck KGaA, Německo
- termomixer – Eppendorf, Německo

### 2.2 Analyzované vzorky

#### Příslušné suroviny k rostlinným alternativám mléka

Nejprve byly analyzovány suroviny odpovídající rostlinným materiálům, které jsou základem extrakce a následného zpracování dané rostlinné náhražky mléka. Jednalo se o kokosový ořech, mandle pražené a nepražené, ovesné vločky, rýži a sójové boby (tab. 2). V této experimentální části byly v laboratoři analyzovány pouze ovesné vločky, rýže a sójové boby. Hodnoty  $m/z$  suroviny, z nichž jsou vyráběny rostlinné nápoje na bázi ořechů, tedy kokosový ořech, mandle



pražená a nepražená, byly převzaty z bakalářské práce na téma Využití hmotnostní spektrometrie při proteinové analýze vybraných skořápkových plodů (Kadeřábková, 2022).

**Tabulka 2.** Popis analyzovaných surovin, ze kterých jsou vyráběny rostlinné náhražky mléka

Surovina	Prodejce	Popis
Kokosový ořech*	Albert	Mletá, sušená dužina
Mandle*	Mixit	Blanširovaná jádra
Mandle pražené**	Mixit	Mandle upravené při teplotě 180°C po dobu 10 minut
Ovesné vločky	Lidl	Celozrnné ovesné vločky
Rýže	Penny	Rýže dlohozrnná loupaná
Sójové boby	Aktin	Bio sójové boby

(\*převzato z práce Kadeřábkové (2022), \*\* informace byly sdíleny během procesu analýzy pražených skořápkových plodů)

### Rostlinné alternativy mléka

Pro zpracování experimentální části byly vybrány komerční výrobky rostlinných alternativ mléka (tab. 3). Pro analýzy bylo zvoleno šest druhů rostlinných náhražek od různých výrobců. Jednalo se o produkty kokosové, mandlové, mandlové z mandlí pražených, ovesné, rýžové a sójové. Všechny výrobky byly baleny v nápojových kartónech Tetra Pak o objemu 1 litr. Jednotlivé rostlinné alternativy mléka byly přelity do zkumavek pro jednodušší manipulaci se vzorky.

**Tabulka 3.** Popis analyzovaných rostlinných náhražek mléka

Druh rostlinné náhražky	Název produktu	Značka	Dodavatel	Prodejce
Kokosová	Coconut no sugars	Alpro	Danone a.s.	Kaufland
Mandlová	Bio Mandel Drink	Take it veggie	QUARGENT S.P.A., Italie	Kaufland
Mandle pražená	Mediterranean Roasted Almond	Alpro	Danone a.s.	Kaufland
Ovesná	Veganer Hafer Drink	Take it veggie	Hohenloher Molkerei eG, Německo	Kaufland
Rýžová	Organic Rice Drink	Take it veggie	QUARGENT S.P.A., Italie	Kaufland
Sójová	Soya Drink	Nature promise	Almas, Itálie	Albert

## 1) Kokosová náhražka mléka

Popis produktu: Kokosový nápoj obohacený vápníkem a vitaminy (tab. 4, obr. 1)

Složení produktu: pitná voda, kokosové mléko 7 % (kokosový krém, pitná voda), kokosová voda 2,6 %, fosforečnan vápenatý, přírodní kokosové aroma, stabilizátory guma guar, xanthan, guma gellan; mořská sůl, vitaminy B12 a D2. Může obsahovat stopy ostatních skořápkových plodů (ne arašídy). Bez lepku, přirozeně bez laktosy.

**Tabulka 4.** Výživové hodnoty kokosového nápoje

Kokosová náhražka mléka	
Výživové hodnoty na 100 ml	
Energetická hodnota	56 kJ/14 kcal
Tuky	1,2 g
Nasyčené mastné kyseliny	1,1 g
Sacharidy	0 g
Z toho cukry	0 g
Vláknina	0 g
Bílkoviny	0,1 g
Sůl	0,07 g
Vitamin D	0,75 µg
Vitamin B12	0,38 µg
Vápník	120 mg



**Obrázek 1.** Fotografie obalu zkoumaného kokosového nápoje

## 2) Mandlová náhražka mléka

Popis produktu: Bio mandlový nápoj (tab. 5, obr. 2)

Složení produktu: voda, mandle 2,3 %, mořská sůl, stabilizátor: karobová mouka, guma gellan; emulgátor slunečnicový lecitin. Výrobek může obsahovat ostatní skořápkové plody, obiloviny obsahující lepek (oves) a sóju.

**Tabulka 5.** Výživové hodnoty mandlového nápoje

Mandlová náhražka mléka	
Výživové hodnoty na 100 ml	
Energetická hodnota	56 kJ/14 kcal
Tuky	1,2 g
Nasycené mastné kyseliny	0,1 g
Sacharidy	<0,5 g
Z toho cukry	<0,5 g
Vláknina	<0,5 g
Bílkoviny	0,1 g
Sůl	0,15 g
<b>Obsah laktosy nižší než 0,01 g/100 ml</b>	



**Obrázek 2.** Fotografie obalu zkoumaného mandlového nápoje

### 3) Náhražka mléka z pražených mandlí

Popis produktu: Mandlový nápoj, zdroj vápníku a vitamínů (tab. 6, obr. 3)

Složení produktu: pitná voda, mandle 2,3 %, cukr, vápník – fosforečnan vápenatý, mořská sůl, stabilizátory karubin, guma gellan, emulgator lectiny, přírodní aroma, vitaminy B2, B12, E, D2. Může obsahovat stopy skořápkových plodů (ne arašídů). Bez lepku. Přirozeně bez laktosy.

**Tabulka 6.** Výživové hodnoty nápoje z pražených mandlí

<b>Mandlová náhražka mléka (pražená)</b>	
<b>Výživové hodnoty na 100 ml</b>	
Energetická hodnota	93 kJ/22 kcal
Tuky	1,1 g
Nasycené mastné kyseliny	0,1 g
Sacharidy	2,4 g
Z toho cukry	2,4 g
Vláknina	0,4 g
Bílkoviny	0,4 g
Sůl	0,14 g
Vitamin D2	0,75 µg
Vitamin B12	0,38 µg
Vitamin E	1,8 mg
Vitamin B2	0,21 mg
Vápník	120 mg



**Obrázek 3.** Fotografie obalu zkoumaného nápoje z pražených mandlí

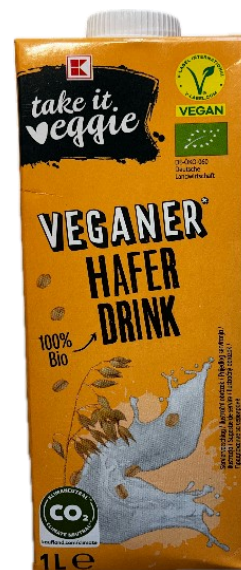
#### 4) Ovesná náhražka mléka

Popis produktu: Bio ovesný nápoj, ošetřeno UHT (tab. 7, obr. 4)

Složení produktu: pitná voda, oves 11,5 %, slunečnicový olej, mořská sůl.

Tabulka 7. Výživové hodnoty ovesného nápoje

Ovesná náhražka mléka	
Výživové hodnoty na 100 ml	
Energetická hodnota	165 kJ/39 kcal
Tuky	1,3 g
Nasycené mastné kyseliny	0,2 g
Sacharidy	6,2 g
Z toho cukry	4,2 g
Bílkoviny	0,4 g
Sůl	0,12 g



Obrázek 4. Fotografie obalu zkoumaného ovesného nápoje

## 5) Rýžová náhražka mléka

Popis produktu: Bio rýžový nápoj, neslazený, ošetřeno UHT (tab. 8, obr. 5)

Složení produktu: pitná voda, rýže 13 %, slunečnicový olej, jedlá sůl. Obsahuje přirozeně se vyskytující cukry. Výrobek může obsahovat skořápkové plody, obiloviny obsahující lepek (oves) a sóju.

**Tabulka 8.** Výživové hodnoty rýžového nápoje

Rýžová náhražka mléka	
Výživové hodnoty na 100 ml	
Energetická hodnota	204 kJ/48kcal
Tuky	1,0 g
Nasycené mastné kyseliny	0,2 g
Sacharidy	9,7 g
Z toho cukry	7,3 g
Vláknina	<0,5 g
Bílkoviny	<0,5 g
Sůl	0,05 g



**Obrázek 5.** Fotografie obalu zkoumaného rýžového nápoje

## 6) Sójová náhražka mléka

Popis produktu: Bio sójový nápoj, neslazený, ošetřeno UHT (tab. 9, obr. 6)

Složení výrobku: pitná voda, sójové boby 8 %, jedlá mořská sůl. Bez přídavku cukru. S nízkým obsahem soli. Obsahuje přirozeně se vyskytující cukry. Přirozeně bez lepku. Neobsahuje mléko.

**Tabulka 9.** Výživové hodnoty sójového nápoje

Sójová náhražka mléka	
Výživové hodnoty na 100 ml	
Energetická hodnota	161 kJ/39 kcal
Tuky	1,9 g
Nasycené mastné kyseliny	0,3 g
Sacharidy	1,3 g
Z toho cukry	0,7 g
Bílkoviny	3,6 g
Sůl	0,10 g



**Obrázek 6.** Fotografie obalu zkoumaného sójového nápoje

## 2.3 Příprava vzorků

### 2.3.1 Objemy a navážky analyzovaných vzorků

Pro analýzu bylo připraveno 27 vzorků, z nichž je 18 vzorků ze šesti druhů rostlinných náhražek mléka (každé měření bylo provedeno ve třech opakováních). Dle předešlého měření a vyhodnocení byl zvolen jednotný objem 30  $\mu$ l, který byl odpipetován automatickými pipetami do plastových mikrozkušavek. Jednalo se o šest druhů rostlinných náhražek mléka ve třech opakování. Vzorky byly označeny identifikačním písmenem pro rostlinný nápoj a číslicí značící replikaci viz tabulka 10.

**Tabulka 10.** Označení vzorků rostlinných náhražek mléka

Náhražka mléka	Vzorky		
Kokosová	K1	K2	K3
Mandlová	M1	M2	M3
Mandle pražená	PM1	PM2	PM3
Ovesná	O1	O2	O3
Rýžová	R1	R2	R3
Sójová	S1	S2	S3

Pro přípravu tří vzorků surovin (ovesných vloček, rýžových zrn, sójových bobů) byla zvolena hmotnost 0,25 mg  $\pm$  0,05 mg. Každá surovina byla navážena třikrát. Rozdrcené vzorky byly naváženy na analytických vahách viz tabulka 11.

**Tabulka 11.** Navážení vzorků surovin

Surovina	Vzorky		
Ovesné vločky	OP1	OP2	OP3
Množství v mg	0,261	0,252	0,257
Rýžové zrno	RP1	RP2	RP3
Množství v mg	0,251	0,257	0,259
Sójové boby	SP1	SP2	SP3
Množství v mg	0,258	0,252	0,258



### 2.3.2 Štěpení vzorků

Nejprve byl připraven roztok trypsinu pro naštěpení proteinových struktur. Trypsin, který je skladován v mrazničce, kvůli autolýze, byl za pokojové teploty rozmrazen. Do čisté zkumavky bylo odpipetováno 200  $\mu\text{l}$  50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a byly přidány 4  $\mu\text{l}$  trypsinu. Roztok trypsinu byl přidán po 10  $\mu\text{l}$  do všech 18 zkumavek se 30  $\mu\text{l}$  vzorků rostlinných náhražek mlék (tab. 10). Následně byly mikrozkušavky vloženy do termomixeru, kde byly vzorky štěpeny při teplotě 37 °C po dobu 6 hodin. Teplota i zásadité pH jsou vhodné pro aktivitu enzymu trypsinu. Po 6 hodinách byl proces štěpení zastaven vyjmutím vzorků z termomixeru a přidáním 1  $\mu\text{l}$  10% TFA, která změnila pH na lehce kyselé a tím zastavila štěpení.

Suroviny (ovesné vločky, rýže, sójové boby) (tab. 11) byly štěpeny roztokem trypsinu, který byl připraven z 1  $\mu\text{l}$  trypsinu a 100  $\mu\text{l}$  50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Rostlinný materiál o hmotnosti 0,25 mg  $\pm$  0,05 mg většinu roztoku absorboval, tudíž bylo ke každému vzorku přidáno 10  $\mu\text{l}$  připraveného roztoku a následně 40  $\mu\text{l}$  50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a 1  $\mu\text{l}$  trypsinu. Vzorky byly štěpeny v termomixeru po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C. Poté bylo štěpení zastaveno přidáním 1  $\mu\text{l}$  10% TFA.

### 2.3.3 Purifikace vzorků

Před procesem přečištění vzorků pomocí ZIP-TIP reversní fáze C18 byly vzorky odstředěny na centrifuze po dobu 2 minut, o rychlosti otáček  $13,4 \times 1000$  rpm a poloměru otáčení 6 cm, z důvodu možného zanesení špičky pevnými částicemi. Dále byl špičkou nasáván pouze vzniklý supernatant, a ne sediment. Přečištění vzorků procesem ZIP-TIP lze rozdělit do tří částí: wetting, ekvilibrace a eluce. Pro 18 vzorků rostlinných náhražek mlék byla připravena jedna zkumavka o objemu 1 ml pro wetting, čtyři pro ekvilibraci a dvě pro eluci.

#### Příprava roztoků pro purifikaci

- wetting: 100% ACN
- ekvilibrace: 0,2 % roztok TFA ve vodě
- eluce: 100% ACN + 0,1% roztok TFA v poměru 1:1

### **Popis procesu purifikace pomocí reverzní fáze C18**

1. Prvním krokem bylo zvlhčení neboli wetting reverzní fáze. Roztok pro wetting byl 10× nasáván do 1. polohy automatickou pipetou nastavenou na objem 10 µl. Tím došlo k aktivaci reverzní fáze. Tento úkon se prováděl pouze na začátku procesu purifikace. Před přečistěním jednotlivých vzorků se již neopakuje.
2. Roztokem ekvibrace byla připravena fáze pro dobré zachycení žádoucích peptidů. Roztok ekvibrace byl nasát o objemu 10 µl do ZIP-TIP špičky a vypuštěn poté do odpadu. Tento postup se opakuje 10 ×.
3. Třetím krokem bylo zachycení peptidů na reverzní fázi, tak, že špičkou byl 10 × nasáván supernatant vzorku. Tento proces byl proveden velmi pomalu a pečlivě, aby bylo docíleno dobrého záchytu peptidů.
4. Ve 4. kroku byl opakován postup s ekvilibračním roztokem, kde byla špička promyta 10 × 10 µl a pokaždé vypouštěna do odpadu.
5. Automatická pipeta byla nastavena na objem 8 µl a odpipetován eluční roztok a přenesen do čisté mikrozkušavky. Tam byl tento roztok nasáván 10 × do 1. polohy pipety a na závěr vypuštěn v této zkumavce.
6. Posledním krokem je pročištění špičky elučním roztokem 10 × 10 µl a pokaždé vypuštěn do odpadu.

Pro pročištění dalšího vzorku se postup opakoval znovu od druhého bodu.

### **2.3.4 Příprava matrice pro MALDI-TOF**

Pro analýzu vzorků pomocí MALDI-TOF byla připravena matrice DHB. Matrice DHB byla připravena ze 150 µl ACN, 250 µl 0,2% TFA, 100 µl destilované H<sub>2</sub>O a 8,3 mg DHB, která byla zvážena na analytických vahách.

### **2.3.5 Přenesení vzorků na destičku**

Pro analýzu na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF byly vzorky přeneseny na destičku (obr. 7).

Obrázek 7. Ocelová měřicí destička pro analýzu vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF), která byla následně vložena do přístroje. 2 µl vzorku byly v čisté zkumavce smíchány s 5 µl připravené matrice DHB. Výsledný roztok byl po 2 µl přenesen na čistý spot na destičce pomocí automatické pipety, kdy byl nasátý objem vypuzen tak, aby se špička nedotýkala spotu a vzorek byl nanesen přímo doprostřed vyhraněného místa. Z každého vzorku byly nanесeny tři spoty. Místa nanесení konkrétního vzorku a jeho

replikací bylo zapsáno pomocí souřadnic na destičce, kde jsou zapsána písmena označující řadu spotů a číslice značící sloupce. Byl nanesen i standard pro kalibraci přístroje. Kalibrační roztok byl připraven z 1  $\mu\text{l}$  kalibrantu PEP II a 5  $\mu\text{l}$  připravené matrice s DHB. Po zaschnutí všech spotů byla destička již připravena pro měření.



**Obrázek 7.** Ocelová měřicí destička pro analýzu vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

### 2.3.6 Nastavení přístroje a měření na MALDI-TOF

Pro analýzu peptidů ve vzorcích byl využit hmotnostní spektrometr MALDI-TOF značky Bruker, Autoflex Speed. Destička byla vložena do hmotnostního spektrometru a následně ukotvena v přístroji pro ovládání spektrometru pomocí programu flexControl. Po nastavení žádoucí metody RP\_900-4500\_Da\_PM\_2023.par a kontroly napětí mohl být přístroj zkalibrován pomocí standardu. V programu u grafického znázornění destičky byl zvolen spot se standardem, který byl změřen a v kolonce Calibration a zde byly určeny identifikační peptidy. Následně mohly být změřeny všechny požadované vzorky. Jednotlivé vzorky byly měřeny určením spotu, který byl následně zobrazen kamerou pro výběr místa k ozařování laserem. Vybírána byla převážně místa na okraji spotu, kde se nacházel největší počet krystalů. Laser byl nastaven na 1000 shots neboli laserových pulsů a spuštěn pomocí ikony start. Naměřená spektra se zobrazila v pravé části obrazovky v podobě jednotlivého spektra tzv. Single spectrum nebo posledních sekvencí snímků pod ikonou Sum spectrum. Spektrum na ose  $x$  zobrazuje hodnoty  $m/z$  a na ose  $y$  hodnoty intenzity. Snímky spekter jsou přidávány do sekvence a při hodnotách okolo 20 000 snímků ukládány do společné složky s označením měřeného vzorku na spotu. Pro začátek nového měření na jiném spotu byla pomocí ikony Clear sum vymazána mezipaměť, a tak mohlo být zahájeno nové měření. Po naměření všech spotů bylo měření ukončeno stisknutím ikony na Switched off u vysokého napětí a byla vysunuta deska.

### 2.3.7 Vyhodnocení spekter

Vyhodnocení spekter bylo provedeno v programu mMass 5.5.0. Tento program sloužil k označení píků, a tím byly získány potřebné hodnoty  $m/z$  pro následné zpracování. Pomocí insertů byla data  $m/z$  u jednotlivých surovin vložena do databázového programu PostgreSQL (verze 14.2), kde nástrojem pgAdmin byly vygenerovány unikátní (charakteristické) hodnoty  $m/z$ . Tyto vygenerované hodnoty jsou unikátní jen pro danou surovinu, tudíž se tyto hodnoty neopakují v žádném jiném rostlinném materiálu. Takto byly získány peptidové markery rostlinných materiálů, které slouží pro diferenciaci rostlinných náhražek mléka.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem experimentální části bylo určit pomocí hmotnostní spektrometrie typu MALDI-TOF, zda jsou rostlinné náhražky mléka vyrobeny z deklarovaného rostlinného materiálu uvedeného na etiketách. Analyzováním rostlinných náhražek mléka a jejich příslušných surovin byly určeny peptidové markery  $m/z$ , které byly specifické pro danou surovinu a mohly být porovnávány s daty naměřenými u rostlinných náhražek.

#### 3.1 Vhodné množství a čas pro štěpení trypsinem

Prvotně bylo podstatné určit jaký objem vzorků rostlinných náhražek mléka bude využit pro analýzu. Dále bylo podstatné vybrat nejvhodnější čas pro štěpení trypsinem, aby bylo docíleno co nejlepšího výtěžku neštěpených peptidů. Tyto údaje byly určeny na dvou druzích rostlinného nápoje. Konkrétně se jednalo o kokosovou a sójovou mléčnou alternativu. Tyto vzorky byly analyzovány v objemech 20 a 30  $\mu\text{l}$ . Pro určení doby štěpení byly zvoleny časy 2, 4, 6, 22 a 30 hodin. Po změření vzorků na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF byla výsledná spektra vyhodnocena. Vyhodnocením byl získán počet peptidů vzorků kokosové náhražky (tab. 12) a sójové náhražky mléka (tab. 13). Byl zvolen nejvhodnější shodný objem (30  $\mu\text{l}$ ) a čas (6 h) dle nejvyššího průměrného počtu nalezených peptidů. Přestože vzorky ze třetího měření 6 hodin a objemu 30  $\mu\text{l}$  nebyly vyhodnoceny z důvodu nedostačeného množství vzorku pro nanesení třetího spotu, byly tyto podmínky zvoleny jako vyhovující pro štěpení všech vzorků rostlinných náhražek.

**Tabulka 12.** Počet peptidů v kokosové náhražce mléka

Vzorek	Kokosová náhražka mléka									
	2 hodiny		4 hodiny		6 hodin		22 hodin		30 hodin	
Čas štěpení	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$
Objem	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$
1. měření	114	93	136	96	111	154	120	130	151	162
2. měření	95	98	117	94	123	140	111	145	139	138
3. měření	90	107	X	90	X	X	X	138	160	132
Průměr	100	99	127	93	117	147	116	138	150	144
Směrodatná odchylka	13	7	13	3	8	10	6	8	11	16

X = vzorky nebyly naměřeny

**Tabulka 13.** Počet peptidů v sójové náhražce mléka

Vzorek	Sójová náhražka mléka									
	2 hodiny		4 hodiny		6 hodin		22 hodin		30 hodin	
Čas štěpení	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l
<b>1. měření</b>	52	91	107	100	118	150	143	129	92	107
<b>2. měření</b>	70	109	111	104	125	145	171	144	94	117
<b>3. měření</b>	53	108	112	99	X	X	140	123	87	98
<b>Průměr</b>	58	103	110	101	122	148	151	132	91	107
<b>Směrodatná odchylka</b>	10	10	3	3	5	4	17	11	4	10
X = vzorky nebyly naměřeny										

### 3.2 Zisk unikátních hodnot

Po naměření všech 54 vzorků (včetně replikátů – vše bylo změřeno 3x) rostlinných náhražek mléka (kokosová, mandlová, mandlová pražená, ovesná, rýžová a sójová) a 27 vzorků (opět včetně replikátů) a k nim odpovídajících surovin (kokos, mandle, mandle pražená, ovesné vločky, rýže a sójové boby) na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF byla spektra vyhodnocena v programu mMass 5.5.0. Následně byly hodnoty  $m/z$  vloženy do databázového programu PostgreSQL (verze 14.2), ke kterému se přistupovalo pomocí nástroje pgAdmin. Pomocí insertů vložených do programu pgAdmin byly vygenerovány unikátní neboli charakteristické hodnoty  $m/z$  pro daný rostlinný materiál. Unikátní hodnoty byly vygenerovány v nejpřísnější možné podobě, jelikož se jednalo o hodnoty  $m/z$ , které se v daném rostlinném materiálu objevily ve všech vzorcích a jejich replikátech, tudíž ve všech 9 spektrech z 9 pro každou analyzovanou surovinu a každou náhražku mléka (3 vzorky rostlinného materiálu ve 3 opakováních). Hodnoty proteinových markerů byly upraveny s odchylkou  $\pm 0,3 m/z$  a useknuty na celá čísla (tab.14).

**Tabulka 14.** Charakteristické hodnoty  $m/z$  pro suroviny

Kokos	Mandle celková	Oves	Rýže	Sója
947	1075	685	769	682
975	1095	697	871	688
1018	1169	926	884	689
1031	1170	926	905	704
1035	1178	930	929	705
1058	1225	944	970	928
1062	1308	973	971	936
1104	1316	974	1026	964
1141	1348	991	1156	980
1256	1381	992		988
1270	1386	1004		993
1340	1387	1047		1014
1396	1436	1124		1092
1426	1478	1185		1106
1495	1491	1206		1108
1497	1494	1251		1114
1525	1794	1302		1128
1555	1843	1333		1129
1559		1391		1130
1565		1518		1146
1627		1532		1152
1713		1592		1172
1749		1593		1175
1832		1614		1292
1857		1652		1298
1873				1334

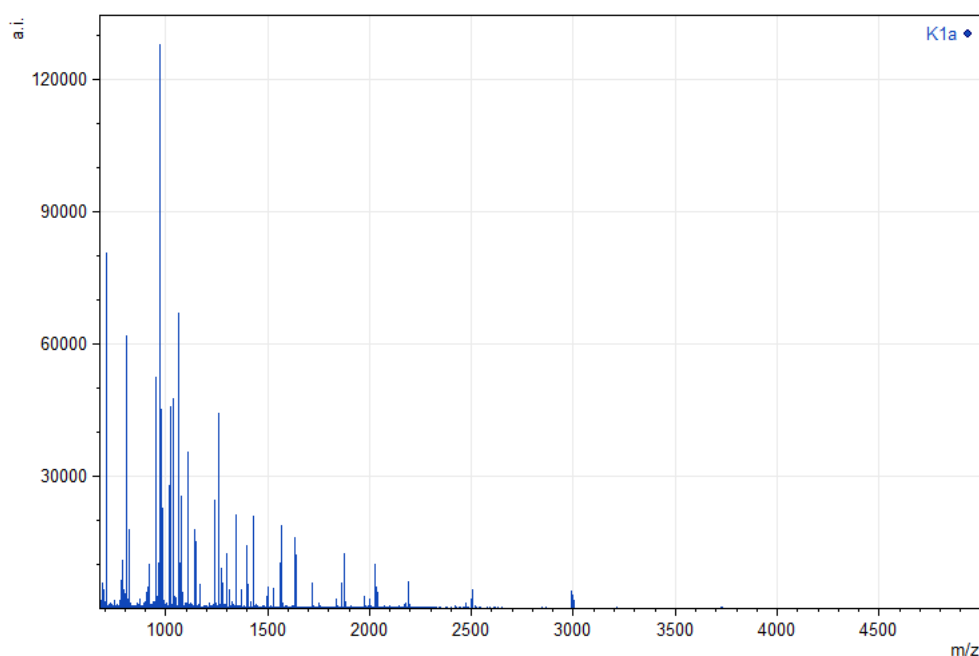
### 3.3 Analýza rostlinných náhražek mléka

Cílem analýzy rostlinných náhražek mléka bylo zjistit, zda je možné určit, pomocí unikátních hodnot  $m/z$  surovin, o jakou rostlinnou náhražku se jedná a rozlišit je od sebe. Naměřené hodnoty  $m/z$  všech 56 vzorků rostlinných náhražek mléka z programu mMass 5.5.0 byly

jednotlivě vyhodnoceny sledováním shod s referenčním materiálem (kokosovým ořechem, mandlí praženou a nepraženou, ovsem, rýží, sójovými boby). Bez ohledu na úpravu byly mandle pražené i napražené sloučeny. V programu pgAdmin byly pro ně vygenerovány unikátní hodnoty. Při vyhodnocení jsou tyto charakteristické hodnoty označeny jako mandle celková. Pro vyhodnocení byla použita excelová tabulka, kde byla získána data o počtu shod. Tyto hodnoty byly následně zapsány do tabulek níže (tab. 15–20).

### 3.3.1 Vyhodnocení kokosové náhražky mléka

Přestože měla kokosová náhražka mléka v porovnání s ostatními nejmenší proteinové zastoupení 0,1 g na 100 ml, tedy v přepočtu na měřený vzorek 25  $\mu\text{g}$  bílkovin, byla výsledná spektra hladká bez šumu a s vysokým výskytem peptidů – píků (obr. 8). V průměru byl počet peptidů na jedno spektrum 116.



**Obrázek 8.** Spektrum vzorku kokosové náhražky mléka (K1a)

Kokosová náhražka mléka má s kokosem průměrný počet shod  $18 \pm 4$  hodnot  $m/z$  (tab. 15). Vzorky K1a a K3c vykazují nejvyšší počet shod, a to 23. Naopak nejmenší počet shod má vzorek K1b s počtem 12. Nejvyšší počet shod s jiným, než deklarovaným materiálem je s mandlí celkovou s průměrným počtem shod  $4 \pm 1$  a s ovsem též  $4 \pm 1$ . Tato shoda mohla být způsobena přítomností i jiných proteinových materiálů v kokosové náhražce než jen přídavkem mandlových proteinů, a vzhledem k nízkému počtu shodných hodnot ji můžeme považovat za náhodnou či způsobenou přítomností nějaké neznámé kontaminace.

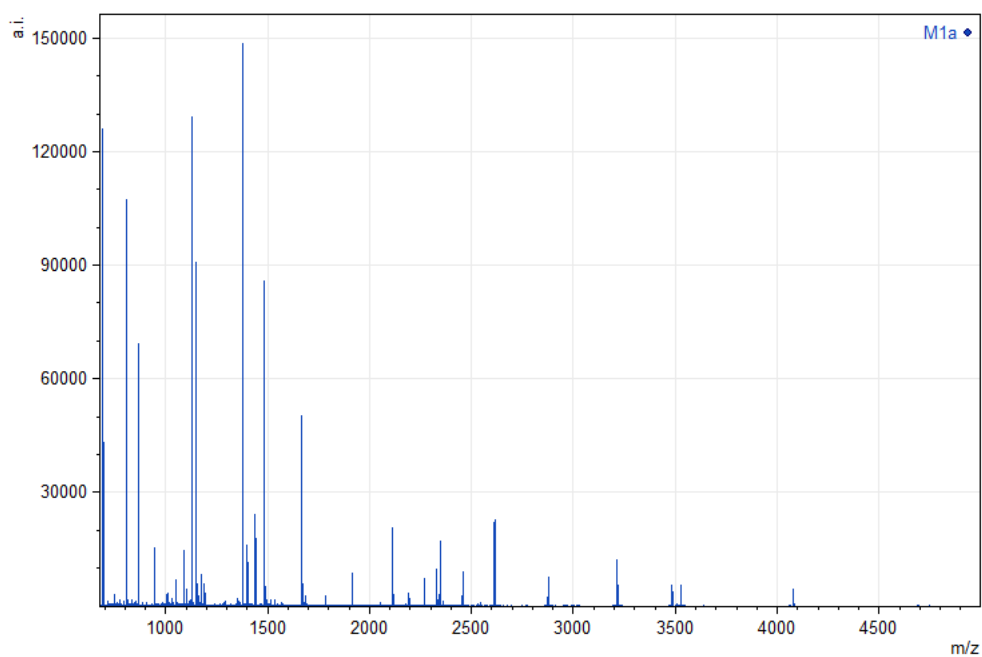


**Tabulka 15.** Počet shod kokosové náhražky mléka s kokosem

Počet shod						
Rostlinná náhražka mléka	Vzorek	Shoda kokos	Shoda mandle celková	Shoda oves	Shoda rýže	Shoda sója
Kokosová	K1a	23	2	3	3	3
	K1b	12	5	3	2	3
	K1c	13	4	3	2	3
	K2a	16	4	4	2	2
	K2b	18	4	4	3	2
	K2c	17	6	5	3	4
	K3a	21	3	5	2	2
	K3b	20	4	3	2	3
	K3c	23	4	4	2	3
<b>průměr</b>		18	4	4	2	3
<b>směrodatná odchylka</b>		4	1	1	1	1

### 3.3.2 Vyhodnocení mandlové náhražky mléka

Pro mandlové produkty (mandlová náhražka mléka a náhražka z pražených mandlí) byly zvoleny jednotné charakteristické hodnoty spojené se syrovou mandlí a mandlí praženou, tudíž byl sledován parametr, zda lze prokázat výskyt mandlí ve vzorku bez ohledu na úpravu. V tabulce 16 jsou tyto markery označeny jako mandle celková. Jedná se o unikátní hodnoty, které se vyskytovaly ve všech vzorcích mandle i mandle pražené. Průměrný počet shod mandlové náhražky mléka s mandlí celkovou je  $6 \pm 0$  (tab. 16). Ve všech vzorcích bylo nalezeno šest stejných hodnot, kromě vzorku M1b, který měl o hodnotu méně. O polovinu méně shod měla mandlová alternativa mléka s ovsem  $3 \pm 0$ . S kokosem a sójou byly průměrné shody nízké  $2 \pm 0$ . Charakteristické hodnoty pro rýži se vyskytovaly v mandlové náhražce mléka minimálně. Dle výrobce mandlový nápoj může obsahovat ostatní skořápkové plody, oves a sóju. To může vysvětlovat shody s jinými rostlinnými materiály než s mandlí. Samozřejmě shody hodnot s jinými surovinami mohou být náhodné či způsobené přítomností nějaké neznámé kontaminace.



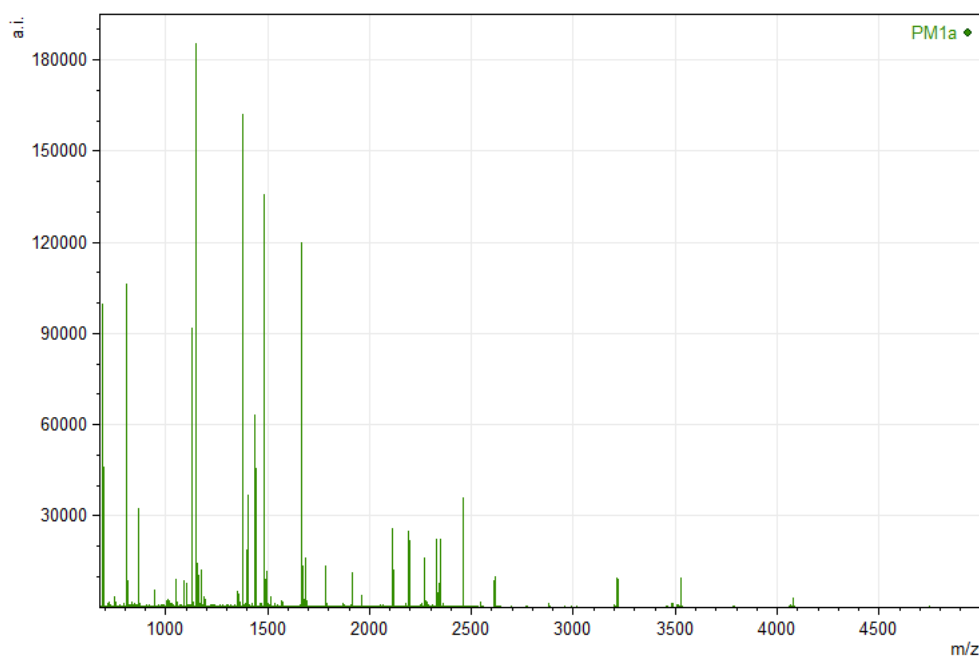
Obrázek 9. Spektrum mandlové náhražky mléka (M1a)

Tabulka 16. Počet shod mandlové náhražky mléka s mandlí celkovou

Počet shod						
Rostlinná náhražka mléka	Vzorek	Shoda kokos	Shoda mandle celková	Shoda oves	Shoda rýže	Shoda sója
Mandlová	M1a	2	6	3	1	2
	M1b	2	5	3	1	2
	M1c	2	6	3	1	3
	M2a	2	6	3	0	1
	M2b	1	6	3	1	1
	M2c	2	6	3	1	2
	M3a	1	6	3	0	1
	M3b	1	6	3	0	1
	M3c	1	6	3	0	1
<b>průměr</b>		2	6	3	1	2
<b>směrodatná odchylka</b>		1	0	0	1	1

### 3.3.3 Vyhodnocení mandlové náhražky z pražených mandlí

Průměrná shoda  $4 \pm 1$  mandlového mléka z mandlí pražených s mandlí celkovou byla nižší než u klasického mandlového nápoje (tab. 17). Z pohledu shod s jinými rostlinnými materiály není rozdíl tak velký, jelikož průměrná shoda s ovsem je  $3 \pm 1$ . Průměrné shody  $2 \pm 1$  se našly i u kokosu a sóji. Opět je možné se domnívat, že shody hodnot s jinými surovinami jsou náhodné a zapříčiněné obsahem jiných proteinových složek nebo kontaminacemi.



**Obrázek 10.** Spektrum náhražky mléka z pražených mandlí (PM1a)

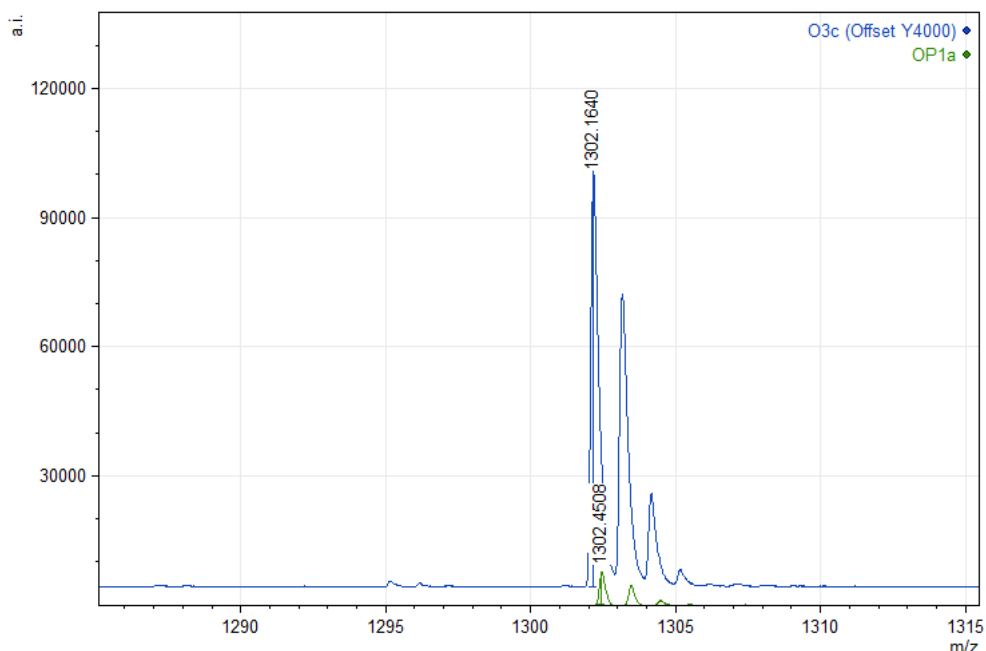
**Tabulka 17.** Počet shod náhražky mléka z pražených mandlí s mandlí celkovou

Počet shod						
Rostlinná náhražka mléka	Vzorek	Shoda kokos	Shoda mandle celková	Shoda oves	Shoda rýže	Shoda sója
Pražená mandle	PM1a	3	5	2	2	1
	PM1b	2	5	2	2	1
	PM1c	2	5	2	2	1
	PM2a	3	4	3	1	1
	PM2b	2	3	3	2	3
	PM2c	3	3	2	2	1
	PM3a	2	3	3	2	2
	PM3b	2	3	4	2	2
	PM3c	2	3	2	2	2
<b>průměr</b>		2	4	3	2	2
<b>směrodatná odchylka</b>		1	1	1	0	1

### 3.3.4 Vyhodnocení ovesné náhražky mléka

Průměrný počet shod ovesné náhražky mléka s ovsem je  $12 \pm 1$  (tab. 18). Charakteristické hodnoty ovsa byly tedy v ovesném mléku, který obsahuje 0,4 g proteinů na 100 ml produktu, hojně zastoupeny. Obrázek 11 znázorňuje příklad shody v hodnotách  $m/z$  1302 u vzorku ovesné náhražky mléka O3c (modré spektrum) a ovsa OP1a (zelené spektrum).

V porovnání ovsa s jinými referenčními materiály jsou shody velmi nízké, konkrétně u kokosu a mandle celkové  $2 \pm 1$ . U rýže ( $1 \pm 0$ ) a sóji ( $1 \pm 1$ ) jsou shody v poměru hodnotami ovsa zanedbatelné. U ovesné náhražky lze očekávat minimální shody s ostatními surovinami, protože oves patří k nejlevnější surovině, ze které se rostlinné nápoje vyrábí, a proto není důvod ho jinými surovinami nahrazovat. Oves rovněž obsahuje dostatečné množství proteinů (0,4 g/100 ml) a není je proto potřeba do nápoje dodávat z jiných zdrojů.



**Obrázek 11.** Znárodnění shody v hodnotě  $m/z$  1302 u vzorku ovesné náhračky (O3c) a vzorku ovsa (OP1a)

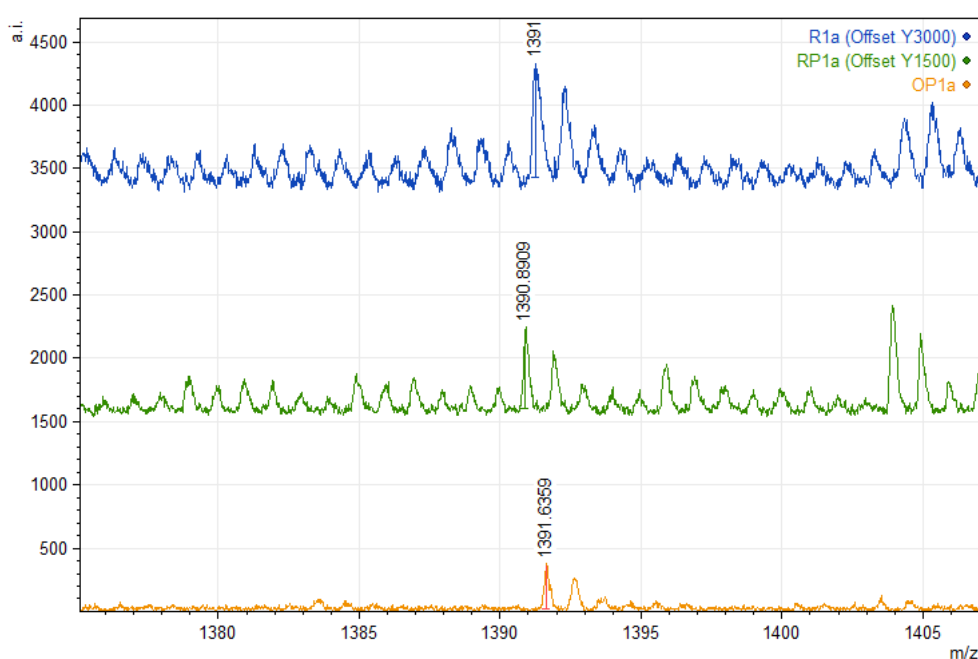
**Tabulka 18.** Počet shod ovesné náhračky mléka s ovsem

Počet shod						
Rostlinná náhračka mléka	Vzorek	Shoda kokos	Shoda mandle celková	Shoda oves	Shoda rýže	Shoda sója
Ovesná	O1a	1	1	11	1	0
	O1b	2	1	12	1	0
	O1c	2	1	11	1	1
	O2a	2	2	12	0	1
	O2b	1	2	12	1	1
	O2c	1	2	12	1	0
	O3a	2	2	12	1	0
	O3b	3	2	12	0	0
	O3c	3	2	13	1	2
<b>průměr</b>		2	2	12	1	1
<b>směrodatná odchylka</b>		1	1	1	0	1

### 3.3.5 Vyhodnocení rýžové náhračky mléka

Rýžová náhračka mléka měla nulové shody s charakteristickými hodnotami pro rýži (tab. 19) Možné důvody neadekvátních shod mohou souviset s nízkým obsahem proteinů v rýžové náhražce mléka, u které je na etiketě uvedeno <0,5 g na 100 ml. Proteiny mohou být též ovlivněny ošetřením pomocí UHT, která je též uvedena na obalu produktu. Překvapivě bylo

v průměru u rýžové náhražky  $5 \pm 1$  shod s charakteristickými hodnotami ovsa. Na etiketě je oves uveden pouze ve větě, že může být obsažen, tedy pouze varování o možné kontaminaci produktu během zpracování. Nulové hodnoty mohly být též zapříčiněny přísným kritériem pro unikátní hodnoty, respektive hodnoty vyskytující se ve všech 9 spektrech z 9 vzorků analyzované suroviny. Na obrázku 12 je zobrazena oblast spektra, kde v hodnotě  $m/z$  1391 jsou peptidy jak u rýžové náhražky mléka R1a (modré spektrum) a rýže RP1a (zelené spektrum), tak i u ovsa OP1a (oranžové spektrum), pro který byla tato hodnota charakteristická. Shody se vyskytly i s referenčními hodnotami sóji v průměru  $3 \pm 1$ . Hodnoty pro kokos a mandli celkovou se v rýžové náhražce vyskytly pouze v průměru  $1 \pm 1$ .



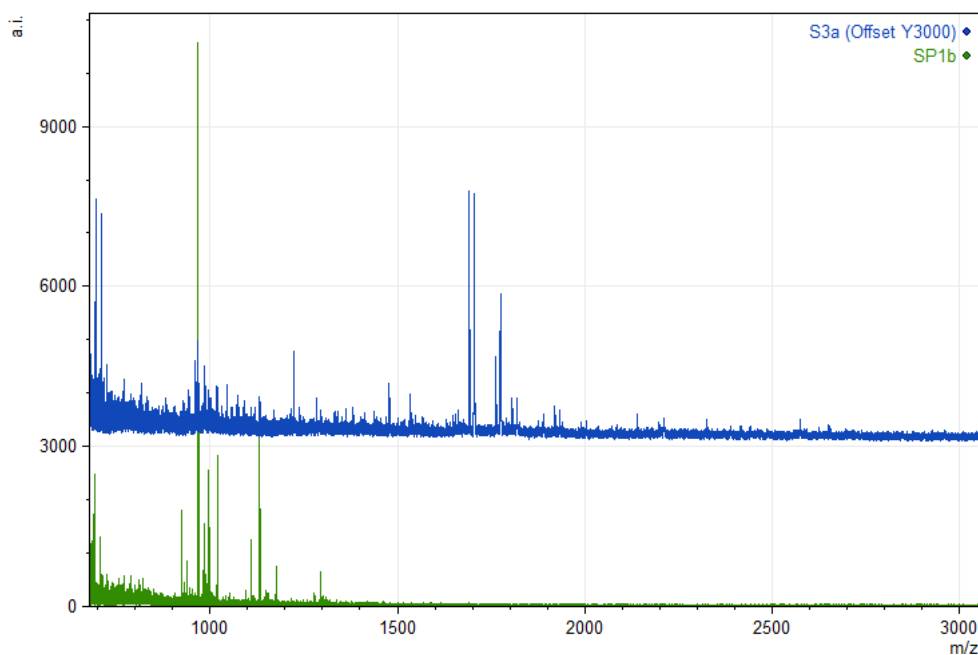
**Obrázek 12.** Zobrazení spekter rýžové náhražky mléka (R1a), rýže (RP1a) a ovsa (OP1a) v hodnotách  $m/z$  1391

**Tabulka 19.** Počet shod rýžové náhražky mléka

Počet shod						
Rostlinná náhražka mléka	Vzorek	Shoda kokos	Shoda mandle celková	Shoda oves	Shoda rýže	Shoda sója
Rýžová	R1a	1	0	5	0	2
	R1b	0	0	5	0	2
	R1c	1	0	2	0	3
	R2a	0	2	5	0	3
	R2b	1	1	4	0	2
	R2c	1	1	6	0	3
	R3a	0	2	4	0	2
	R3b	1	2	6	0	3
	R3c	1	2	6	0	3
<b>průměr</b>		1	1	5	0	3
<b>směrodatná odchylka</b>		1	1	1	0	1

### 3.3.6 Vyhodnocení sójové náhražky mléka

Spektra sójové náhražky mléka i sóji se vyhodnocovala obtížněji než ostatní z důvodu přítomnosti vysokého šumu. Obě spektra vzorku sójové náhražky mléka S3a (modré spektrum) a sójových bobů SP1b (zelené spektrum) jsou zobrazena na obrázku 13 v oblasti 0 až 3000  $m/z$ .



**Obrázek 13.** Spektra sójové náhražky mléka (S2a) a sójových bobů (SP1b)

Sójová náhražka mléka má průměrnou shodu se sójou pouze  $3 \pm 1$  (tab. 20). Shoda s charakteristickými hodnotami pro oves ve vzorcích sójové náhražky mléka je v průměru  $2 \pm 1$ . Zanedbatelné shody se vyskytovaly u ořechů, konkrétně  $1 \pm 1$  u kokosu a  $1 \pm 0$  u mandle celkové.

Sójová náhražka mléka má dle výrobce poměrně vysoký obsah proteinů 3,6 g/100 ml, ale přesto se ve výrobku nepodařilo jednoznačně prokázat přítomnost sójových proteinů. Je možné, že to bylo způsobeno nekvalitně naměřeným spektry sójové náhražky (spektra obsahovala vysoký šum), je ale také možné, že spektra sójových bobů mohla být změřena lépe, kdy mohl být získán vyšší počet píků (hodnot  $m/z$ ) například delší dobou jejich štěpení enzymem trypsinem. Nízký počet peptidů ve spektru sójových bobů je patrný na obr. 13, píky se zde nachází pouze do oblasti 1300  $m/z$ . Sójové bílkoviny jsou sice dobře stravitelné, ale až ve výrobcích, které jsou tepelně ošetřené. Tepelně neošetřené mohou být hůře stravitelné, a proto ani trávicí enzym trypsin, který byl v této práci použit při přípravě vzorků, pravděpodobně nedokázal sójové bílkoviny dobře rozštěpit.

**Tabulka 20.** Počet shod sójové náhražky mléka se sójou

Počet shod						
Rostlinná náhražka mléka	Vzorek	Shoda kokos	Shoda mandle celková	Shoda oves	Shoda rýže	Shoda sója
Sójová	S1a	0	0	1	0	4
	S1b	0	0	0	0	2
	S1c	2	1	2	0	2
	S2a	0	1	1	0	3
	S2b	0	1	2	0	2
	S2c	2	1	2	0	3
	S3a	2	1	3	1	3
	S3b	1	1	3	1	3
	S3c	2	1	3	0	2
<b>průměr</b>		1	1	2	0	3
<b>směrodatná odchylka</b>		1	0	1	0	1



## 4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo určit, zda lze pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF rozlišit šest komerčně vyrobených rostlinných náhražek mléka. Jednalo se o náhražku kokosovou, mandlovou, mandlovou z pražených mandlí, ovesnou, rýžovou a sójovou. K rostlinným alternativám mléka byly analyzovány i příslušné rostlinné materiály, které jsou deklarovány na obalech těchto mléčných alternativ. Suroviny zahrnovaly kokosový ořech, mandle pražené a nepražené, ovesné vločky, rýži a sójové boby. Pro naměření 56 vzorků rostlinných náhražek a 18 vzorků surovin byl využit hmotnostní spektrometr MALDI-TOF Bruker, Autoflex Speed. Spektra všech vzorků byla vyhodnocena programem mMass 5.5.0, díky němuž byly získány peptidy v hodnotách  $m/z$ . Tyto hodnoty byly insertovány do databázového programu PostgreSQL a následně zpracovány programem pgAdmin pro získání unikátních/charakteristických hodnot surovin. Hodnoty  $m/z$  vzorků rostlinných náhražek mléka vyhodnocené v programu mMass 5.5.0 byly poté jednotlivě porovnávány s charakteristickými hodnotami surovin. Shodující se hodnoty  $m/z$  rostlinné náhražky mléka s příslušnou surovinou jsou považovány za proteinové markery. Jednoznačně prokazatelná byla kokosová a ovesná náhražka mléka, jelikož průměrný počet shod u kokosové  $18 \pm 4$  a ovesné  $12 \pm 1$  s deklarovaným materiálem značně převyšoval shody s jinými surovinami v těchto náhražkách mléka. Za rozlišitelné mohou být považovány i mandlové alternativy mléka jak ze syrových mandlí, tak z pražených. Počet shod se sójovými boby  $3 \pm 1$  u sójové alternativy mléka byl sice nejvyšší v porovnání se shodnými hodnotami jiných surovin, ale přesto nemůže být tato diference považována za jednoznačnou. Rýžová náhražka mléka se s příslušnými hodnotami rýže neshodovala ani v jednom případě vyhodnocení vzorků. Nejvyšší počet shod měla rýžová alternativa s ovsem, konkrétně  $5 \pm 1$ . Výrobci neuvádějí v popisu produktů kombinaci více rostlinných materiálů a pouze u některých zmiňují, že mohou obsahovat stopy jiné suroviny z důvodu upozornění spotřebitele na možné alergeny. Tudíž by neměly být využity pro obohacení proteinového profilu. Při vyhodnocení mohly tedy být shody hodnot zapříčiněny podobností peptidů s neznámými kontaminujícími složkami.

V této práci byly získány proteinové markery rostlinných materiálů odpovídající k jejich příslušné rostlinné náhražce mléka viz příloha 1–5. Tyto markery mohou být využity v dalších analýzách k diferenciaci rostlinných náhražek. Využity mohou být například při analýze složení rostlinných náhražek anebo k odhalení falsifikace těchto produktů.

## Použitá literatura

- Abdullah, Z., Taip, F. S., Mustapa Kamal, S. M. & Abdul Rahman, R. Z. (2018). Effect of sodium caseinate concentration and sonication amplitude on the stability and physical characteristics of homogenized coconut milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(11), e13773. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.13773>
- Ahrens, S., Venkatachalam, M., Mistry, A. M., Lapsley, K. & Sathe, S. K. (2005). Almond (*Prunus dulcis* L.) protein quality. *Plant Foods for Human Nutrition* 60(3), 123-128. <https://doi.org/10.1007/s11130-005-6840-2>
- Alozie Yetunde, E. & Udofia, U. S. (2015). Nutritional and sensory properties of almond (*Prunus amygdalu* Var. *Dulcis*) seed milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 10(2), 117-121.
- Alyaqoubi, S., Abdullah, A., Samudi, M., Abdullah, N., Addai, Z. R. & Musa, K. H. (2015). Study of antioxidant activity and physicochemical properties of coconut milk (Pati santan) in Malaysia. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(4), 967-973.
- Atilgan, M. R., Yildiz, S., Kaya, Z. & Unluturk, S. (2021). 2.16 - Kinetic and process modeling of UV-C irradiation of foods. In K. Knoerzer & K. Muthukumarappan (Eds.), *Innovative Food Processing Technologies* (pp. 227-255). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22972-7>
- Atuonwu, J. C., Leadley, C., Bosman, A. & Tassou, S. A. (2020). High-pressure processing, microwave, ohmic, and conventional thermal pasteurization: Quality aspects and energy economics. *Journal of Food Process Engineering*, 43(2), e13328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpe.13328>
- Aydar, E. F., Tutuncu, S. & Ozcelik, B. (2020). Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. *Journal of Functional Foods*, 70, 103975. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103975>
- Balogh-Hartmann, F., Páger, C., Bufa, A., Madarász né Horváth, I., Verzár, Z., Marosvölgyi, T. & Makszin, L. (2023). Microfluidic analysis for the determination of protein content in different types of plant-based drinks. *Molecules*, 28(18), 6684. <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/18/6684>

- Barba, F. J., Parniakov, O., Pereira, S. A., Wiktor, A., Grimi, N., Boussetta, N., Saraiva, J. A., Raso, J., Martin-Belloso, O., Witrowa-Rajchert, D., Lebovka, N. & Vorobiev, E. (2015). Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International*, 77, 773-798. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.015>
- Barral-Martinez, M., Fraga-Corral, M., Garcia-Perez, P., Simal-Gandara, J. & Prieto, M. A. (2021). Almond by-products: Valorization for sustainability and competitiveness of the industry. *Foods*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/foods10081793>
- Barreca, D., Nabavi, S. M., Sureda, A., Rasekhian, M., Raciti, R., Silva, A. S., Annunziata, G., Arnone, A., Tenore, G. C., Süntar, İ. & Mandalari, G. (2020). Almonds (*Prunus dulcis* Mill. D. A. Webb): A source of nutrients and health-promoting compounds. *Nutrients*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/nu12030672>
- Bernat, N., Cháfer, M., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2014). Hazelnut milk fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and inulin. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(12), 2553-2562. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.12585>
- Bocchi, S., Rocchetti, G., Elli, M., Lucini, L., Lim, C.-Y. & Morelli, L. (2021). The combined effect of fermentation of lactic acid bacteria and in vitro digestion on metabolomic and oligosaccharide profile of oat beverage. *Food Research International*, 142, 110216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110216>
- Bocker, R. & Silva, E. K. (2022). Innovative technologies for manufacturing plant-based non-dairy alternative milk and their impact on nutritional, sensory and safety aspects. *Future Foods*, 5, 100098. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100098>
- Bonke, A., Sieuwerts, S. & Petersen, I. L. (2020). Amino acid composition of novel plant drinks from oat, lentil and pea. *Foods*, 9(4), 429. <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/4/429>
- Boyce, J. A., Assa'ad, A., Burks, A. W., Jones, S. M., Sampson, H. A., Wood, R. A., Plaut, M., Cooper, S. F., Fenton, M. J., Arshad, S. H., Bahna, S. L., Beck, L. A., Byrd-Bredbenner, C., Camargo, C. A., Jr., Eichenfield, L., Furuta, G. T., Hanifin, J. M., Jones, C., Kraft, M., . . . Schwaninger, J. M. (2010). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(6), 1105-1118. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.008>

- Briviba, K., Gräf, V., Walz, E., Guamis, B. & Butz, P. (2016). Ultra high pressure homogenization of almond milk: Physico-chemical and physiological effects. *Food Chemistry*, *192*, 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.063>
- Carlsson Kanyama, A., Hedin, B. & Katzeff, C. (2021). Differences in environmental impact between plant-based alternatives to dairy and dairy products: A systematic literature review. *Sustainability*, *13*(22), 12599. <https://www.mdpi.com/2071-1050/13/22/12599>
- Casas-Agustench, P., Salas-Huetos, A. & Salas-Salvadó, J. (2011). Mediterranean nuts: origins, ancient medicinal benefits and symbolism. *Public Health Nutrition*, *14*(12A), 2296-2301. <https://doi.org/10.1017/S1368980011002540>
- Crippa, M., Solazzo, E., Guizzardi, D., Monforti-Ferrario, F., Tubiello, F. N. & Leip, A. (2021). Food systems are responsible for a third of global anthropogenic GHG emissions. *Nature Food*, *2*(3), 198-209. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00225-9>
- Day, L. (2013). Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, *32*(1), 25-42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.005>
- Do, D. T., Singh, J., Oey, I. & Singh, H. (2018). Biomimetic plant foods: Structural design and functionality. *Trends in Food Science & Technology*, *82*, 46-59. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.010>
- Dostálová, R. (2017). *Sója a výrobky ze sóji*. Sdružení českých spotřebitelů, z. ú.
- Dwyer, J. T., Wiemer, K. L., Dary, O., Keen, C. L., King, J. C., Miller, K. B., Philbert, M. A., Tarasuk, V., Taylor, C. L., Gaine, P. C., Jarvis, A. B. & Bailey, R. L. (2015). Fortification and health: Challenges and opportunities. *Advances in Nutrition*, *6*(1), 124-131. <https://doi.org/10.3945/an.114.007443>
- Faraloni, C., Albanese, L., Chini Zittelli, G., Meneguzzo, F., Tagliavento, L. & Zabini, F. (2023). New route to the production of almond beverages using hydrodynamic cavitation. *Foods*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/foods12050935>
- Ferawati, F., Hefni, M., Östbring, K. & Witthöft, C. (2021). The application of pulse flours in the development of plant-based cheese analogues: Proximate composition, color, and texture properties. *Foods*, *10*(9), 2208. <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/9/2208>
- Fernando, W. M. A. D. B., Martins, I. J., Goozee, K. G., Brennan, C. S., Jayasena, V. & Martins, R. N. (2015). The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's

- disease: potential mechanisms of action. *British Journal of Nutrition*, 114(1), 1-14.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114515001452>
- Ferragut, V., Valencia-Flores, D. C., Pérez-González, M., Gallardo, J. & Hernández-Herrero, M. (2015). Quality characteristics and shelf-life of ultra-high pressure homogenized (UHPH) almond beverage. *Foods*, 4(2), 159-172. <https://doi.org/10.3390/foods4020159>
- Fredrikson, M., Biot, P., Alminger, M. L., Carlsson, N.-G. & Sandberg, A.-S. (2001). Production process for high-quality pea-protein isolate with low content of oligosaccharides and phytate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1208-1212.  
<https://doi.org/10.1021/jf000708x>
- Ghavidel, R. A. & Prakash, J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 40(7), 1292-1299. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.08.002>
- Gibbs Russell, G. E., Watson, L., Koekemoer, M., Smook, L., Barker, N. P., Anderson, H. M. & Dallwitz, M. J. (1990). Grasses of Southern Africa: An identification manual with keys, descriptions, distributions, classification and automated identification and information retrieval from computerized data. *Memoirs of the Botanical Survey of South Africa* (58), 437.
- Gradziel, T. M. (2009). Almond (*Prunus dulcis*) breeding. In T. M. Gradziel (Ed.), *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species* (pp. 1-31). Springer New York.  
[https://doi.org/10.1007/978-0-387-71203-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-71203-1_1)
- Grundy, M. M.-L., Lapsley, K. & Ellis, P. R. (2016). A review of the impact of processing on nutrient bioaccessibility and digestion of almonds. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(9), 1937-1946.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.13192>
- Gülcan, R. (1985). Descriptor list for almond (*Prunus amygdalus*)(revised). *International Board of Plant Genetic Resources*
- Halmos, E. P., Mack, A. & Gibson, P. R. (2019). Review article: emulsifiers in the food supply and implications for gastrointestinal disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 49(1), 41-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/apt.15045>

- Hamad, G. M., Mehany, T., Simal-Gandara, J., Abou-Alella, S., Esua, O. J., Abdel-Wahhab, M. A. & Hafez, E. E. (2023). A review of recent innovative strategies for controlling mycotoxins in foods. *Food Control*, *144*, 109350. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109350>
- He, T., Venema, K., Priebe, M. G., Welling, G. W., Brummer, R.-J. M. & Vonk, R. J. (2008). The role of colonic metabolism in lactose intolerance. *European Journal of Clinical Investigation*, *38*(8), 541-547. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.01966.x>
- Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A. & Knorr, D. (2001). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields - Basic concepts for process design [Review]. *Trends in Food Science and Technology*, *12*(3-4), 103-111. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00064-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00064-4)
- Hinds, M. J., Beuchat, L. R. & Chinnan, M. S. (1997). Properties of a thermal-processed beverage prepared from roasted partially defatted peanuts. *International Journal of Food Science & Technology*, *32*(3), 203-211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1997.00402.x>
- Hojnik, N., Modic, M., Walsh, J. L., Žigon, D., Javornik, U., Plavec, J., Žegura, B., Filipič, M. & Cvelbar, U. (2021). Unravelling the pathways of air plasma induced aflatoxin B1 degradation and detoxification. *Journal of Hazardous Materials*, *403*, 123593. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123593>
- Huvarová, M. (2010). Nejpoužívanější středoškolské učebnice chemie na gymnáziích. *Bakalářská práce. Olomouc: UP*. <https://theses.cz/id/bmn3n5/110746-864158640.pdf>
- Hynek, R., Valentová, O. & Kodíček, M. (2022). *Biochemie* (3 ed.). VŠCHT.
- Chalupa-Krebzdak, S., Long, C. J. & Bohrer, B. M. (2018). Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. *International Dairy Journal*, *87*, 84-92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.018>
- Chang, T.-t. (1976). The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asian and African rices. *Euphytica*, *25*, 435-444.
- Chen, S. (1989). Preparation of fluid soymilk. *Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs, Singapore, October, 1988*, 341-352. <https://eurekamag.com/research/002/192/002192480.php>

- Cho, E.-R. & Kang, D.-H. (2023). Combination system of pulsed ohmic heating and 365-nm UVA light-emitting diodes to enhance inactivation of foodborne pathogens in phosphate-buffered saline, milk, and orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 83, 103250. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103250>
- Issara, U. & Rawdkuen, S. (2014). Organic rice bran milk: production and its natural quality attributes. Proceeding of 1st Joint ACS AGFD-ACS ICSCT symposium on agricultural and Food Chemistry,
- Issara, U. & Rawdkuen, S. (2016). Rice bran: A potential of main ingredient in healthy beverage. *International Food Research Journal*, 23, 2306-2318.
- Janick, J., Crops, A. f. t. A. o. I., Council, N. U., Crops, P. U. C. f. N. & Products, P. (1999). *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press.
- Janick, J. & Paull, R. E. (2008). *The encyclopedia of fruit & nuts*. CAB International: Wallingford, UK.
- Jeske, S., Zannini, E. & Arendt, E. K. (2018). Past, present and future: The strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. *Food Research International*, 110, 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.045>
- Jiang, S.-Y., Ma, A., Xie, L. & Ramachandran, S. (2016). Improving protein content and quality by over-expressing artificially synthetic fusion proteins with high lysine and threonine constituent in rice plants. *Scientific Reports*, 6(1), 34427. <https://doi.org/10.1038/srep34427>
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. (2017). Alternatives to conventional thermal treatments in fruit-juice processing. Part 1: Techniques and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 501-523. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.867828>
- Jyotika, D. & Preeti, K. (2021). Stability aspects of non-dairy milk alternatives. In Z. Małgorzata (Ed.), *Milk Substitutes* (pp. Ch. 3). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96376>
- Kadeřábková, L. (2022). *Využití hmotnostní spektrometrie při proteinové analýze vybraných skořápkových plodů* Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, Katedra chemie a didaktiky chemie]. Praha.

- Karimidastjerd, A. (2020). *Production of a casinomacropptide concentrate from sweet whey and usage in a milk-like drink* Fen Bilimleri Enstitüsü].
- Katz, K. A., Mahlberg, M. J., Honig, P. J. & Yan, A. C. (2005). Rice nightmare: Kwashiorkor in 2 Philadelphia-area infants fed Rice Dream beverage. *J Am Acad Dermatol*, 52(5 Suppl 1), S69-72. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.07.056>
- Khush, G. S. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. In T. Sasaki & G. Moore (Eds.), *Oryza: From Molecule to Plant* (pp. 25-34). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-5794-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-011-5794-0_3)
- Kiš, M., Milošević, S., Vulić, A., Herceg, Z., Vukušić, T. & Pleadin, J. (2020). Efficacy of low pressure DBD plasma in the reduction of T-2 and HT-2 toxin in oat flour. *Food Chemistry*, 316, 126372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126372>
- Kohli, D., Kumar, S., Upadhyay, S. & Mishra, R. (2017). Preservation and processing of soymilk: A review. 2, 66-70.
- Kopáčová, O. (2007). *Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům*. ÚZPI.
- Krampe, C. & Fridman, A. (2022). Oatly, a serious ‘problem’ for the dairy industry? A case study. *International Food and Agribusiness Management Review*, 25(1), 157-171. <https://doi.org/https://doi.org/10.22434/IFAMR2021.0058>
- Kudelka, W., Kowalska, M. & Popis, M. (2021). Quality of soybean products in terms of essential amino acids composition. *Molecules*, 26, 5071. <https://doi.org/10.3390/molecules26165071>
- Kwok, K.-C. & Niranjan, k. (1995). Review: Effect of thermal processing on soymilk. *International Journal of Food Science & Technology*, 30(3), 263-295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb01377.x>
- Lata, J., Bureš, J. & Vaňásek, T. (2011). *Gastroenterologie*. Galén.
- Li, F.-D., Chen, C., Ren, J., Wang, R. & Wu, P. (2015). Effect of ohmic heating of soymilk on urease inactivation and kinetic analysis in holding time. *Journal of food science*, 80(2), E307-E315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1750-3841.12738>



- Li, Y.-H. (1979). *Morphology and Anatomy of Grass Family Crops*. Shanghai Science and Technology Press.
- Liu, K. (2012). *Soybeans: chemistry, technology, and utilization*. Springer.
- Lopes, M. A. & Larkins, B. A. (1993). Endosperm origin, development, and function. *The Plant Cell*, 5(10), 1383.
- Lu, L., Zhao, L., Zhang, C., Kong, X., Hua, Y. & Chen, Y. (2015). Comparative effects of ohmic, induction cooker, and electric stove heating on soymilk trypsin inhibitor inactivation. *Journal of food science*, 80(3), C495-503. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12773>
- Maghsoudlou, Y., Alami, M., Mashkour, M. & Shahraki, M. H. (2016). Optimization of ultrasound-assisted stabilization and formulation of almond milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(5), 828-839. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.12661>
- Magness, J. R., Markle, G. M. & Compton, C. C. (1971). *Food and feed crops of the United States: A descriptive list classified according to potentials for pesticide residues*. New Jersey Agricultural Experiment Station.
- Makinde, M. F. & Adebile, V. T. (2018). Influence of processing treatments on quality of vegetable milk from almond (*Terminalia catappa*) kernels. *ACTA Sci. Nutr. Health*, 2(6), 37-42.
- Mäkinen, O. E., Uniacke-Lowe, T., O'Mahony, J. A. & Arendt, E. K. (2015). Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant-based milk substitutes and lactose free bovine milk. *Food Chemistry*, 168, 630-638. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.036>
- Mäkinen, O. E., Wanhalinna, V., Zannini, E. & Arendt, E. K. (2016). Foods for special dietary needs: Non-dairy plant-based milk substitutes and fermented dairy-type products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(3), 339-349. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761950>
- Manassero, C. A., Vaudagna, S. R., Sancho, A. M., Añón, M. C. & Speroni, F. (2016). Combined high hydrostatic pressure and thermal treatments fully inactivate trypsin inhibitors and lipoxigenase and improve protein solubility and physical stability of calcium-added soymilk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35, 86-95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.04.005>

- Maria, M. F. & Victoria, A. T. (2018). Influence of processing treatments on quality of vegetable milk from almond (*Terminalia catappa*) kernels. *Acta Scientific Nutritional Health*, 2(6), 37-42.
- Martínez-García, P. J., Dicenta, F. & Ortega, E. (2012). Anomalous embryo sac development and fruit abortion caused by inbreeding depression in almond (*Prunus dulcis*). *Scientia Horticulturae*, 133, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.10.001>
- Martínez-Gómez, P., Prudencio, A. S., Gradziel, T. M. & Dicenta, F. (2017). The delay of flowering time in almond: a review of the combined effect of adaptation, mutation and breeding. *Euphytica*, 213(8), 197. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1974-5>
- Martorell-Aragonés, A., Echeverría-Zudaire, L., Alonso-Lebrero, E., Boné-Calvo, J., Martín-Muñoz, M. F., Nevot-Falcó, S., Piquer-Gibert, M. & Valdesoiro-Navarrete, L. (2015). Position document: IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 43(5), 507-526. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.01.003>
- McCarthy, K. S., Lopetcharat, K. & Drake, M. A. (2017). Milk fat threshold determination and the effect of milk fat content on consumer preference for fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 1702-1711. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11417>
- McCarthy, K. S., Parker, M., Ameerally, A., Drake, S. L. & Drake, M. A. (2017). Drivers of choice for fluid milk versus plant-based alternatives: What are consumer perceptions of fluid milk? *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6125-6138. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12519>
- McClements, D. J. (2015a). Food Emulsions: Principles, practices, and techniques. *CRC Press, Third Edition (3rd ed.)*. <https://doi.org/10.1201/b18868>
- McClements, D. J. (2015b). Nanoscale nutrient delivery systems for food applications: Improving bioactive dispersibility, stability, and bioavailability. *Journal of food science*, 80(7), N1602-N1611. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12919>
- McClements, D. J. (2018). Enhanced delivery of lipophilic bioactives using emulsions: a review of major factors affecting vitamin, nutraceutical, and lipid bioaccessibility. *Food & Function* 9(1), 22-41. <https://doi.org/10.1039/c7fo01515a>
- McClements, D. J. (2020). Development of Next-Generation Nutritionally Fortified Plant-Based Milk Substitutes: Structural Design Principles. *Foods*, 9(4), 421. <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/4/421>

- McClements, D. J., Newman, E. & McClements, I. F. (2019). Plant-based milks: A review of the science underpinning their design, fabrication, and performance. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(6), 2047-2067. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12505>
- Mehany, T., Siddiqui, S. A., Olawoye, B., Olabisi Popoola, O., Hassoun, A., Manzoor, M. F. & Punia Bangar, S. (2023). Recent innovations and emerging technological advances used to improve quality and process of plant-based milk analogs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-31. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2183381>
- Michalski, M.-C. (2009). Specific molecular and colloidal structures of milk fat affecting lipolysis, absorption and postprandial lipemia. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(5), 413-431. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejlt.200800254>
- Moreau, M., Orange, N. & Feuilloley, M. G. J. (2008). Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances*, 26(6), 610-617. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.001>
- Munekata, P. E. S., Domínguez, R., Budaraju, S., Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Mallikarjunan, K., Roohinejad, S. & Lorenzo, J. M. (2020). Effect of innovative food processing technologies on the physicochemical and nutritional properties and quality of non-dairy plant-based beverages. *Foods*, 9(3), 288. <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/3/288>
- Novickij, V., Stanevičienė, R., Staigvila, G., Gruškieienė, R., Sereikaitė, J., Girkontaitė, I., Novickij, J. & Servienė, E. (2020). Effects of pulsed electric fields and mild thermal treatment on antimicrobial efficacy of nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. *LWT*, 120, 108915. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108915>
- O'Toole, D. K. (1999). Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Production A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 363-371. <https://doi.org/10.1021/jf9807541>
- Ohler, J. G. (1999). *Modern coconut management: palm cultivation and products*. Intermediate Technology Publications.
- Omoni, A. O. & Aluko, R. E. (2005). Soybean foods and their benefits: Potential mechanisms of action. *Nutrition Reviews*, 63(8), 272-283. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2005.tb00141.x>

- Onning, G., Wallmark, A., Persson, M., Akesson, B., Elmståhl, S. & Oste, R. (1999). Consumption of oat milk for 5 weeks lowers serum cholesterol and LDL cholesterol in free-living men with moderate hypercholesterolemia. *Annals of nutrition & metabolism*, 43, 301-309. <https://doi.org/10.1159/000012798>
- Padma, M., Jagannadarao, P., Edukondalu, L., Ravibabu, G. & Aparna, K. (2018). Physico-chemical analysis of milk prepared from broken rice. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(2), 426-428.
- Patil, U. & Benjakul, S. (2018). Coconut milk and coconut Oil: Their manufacture associated with protein functionality. *Journal of food science*, 83(8), 2019-2027. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1750-3841.14223>
- Paul, A. A., Kumar, S., Kumar, V. & Sharma, R. (2020). Milk analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), 3005-3023. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1674243>
- Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J. W., Gale, M. D. & Harberd, N. P. (1999). 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, 400(6741), 256-261. <https://doi.org/10.1038/22307>
- Penha, C. B., Santos, V. D. P., Speranza, P. & Kurozawa, L. E. (2021). Plant-based beverages: Ecofriendly technologies in the production process. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 72, 102760. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102760>
- Phillips, L. G., Mcgiff, M. L., Barbano, D. M. & Lawless, H. T. (1995). The influence of fat on the sensory properties, viscosity, and color of lowfat milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 1258-1266.
- Pointke, M., Albrecht, E. H., Geburt, K., Gerken, M., Traulsen, I. & Pawelzik, E. (2022). A Comparative analysis of plant-based milk alternatives part 1: composition, sensory, and nutritional value. *Sustainability*, 14(13), 7996. <https://www.mdpi.com/2071-1050/14/13/7996>
- Prades, A., Salum, U. N. & Pioch, D. (2016). New era for the coconut sector. What prospects for research? *OCL*, 23(6), D607. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/ocl/2016048>

- Pua, A., Tang, V. C. Y., Goh, R. M. V., Sun, J., Lassabliere, B. & Liu, S. Q. (2022). Ingredients, processing, and fermentation: addressing the organoleptic boundaries of plant-based dairy analogues. *Foods*, *11*(6), 875. <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/6/875>
- Puértolas, E., Koubaa, M. & Barba, F. J. (2016). An overview of the impact of electrotechnologies for the recovery of oil and high-value compounds from vegetable oil industry: Energy and economic cost implications. *Food Research International*, *80*, 19-26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.009>
- Qamar, S., Manrique, Y. J., Parekh, H. & Falconer, J. R. (2020). Nuts, cereals, seeds and legumes proteins derived emulsifiers as a source of plant protein beverages: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(16), 2742-2762. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1657062>
- Ramsing, R., Santo, R., Kim, B. F., Altema-Johnson, D., Wooden, A., Chang, K. B., Semba, R. D. & Love, D. C. (2023). Dairy and plant-based milks: Implications for nutrition and planetary health. *Current Environmental Health Reports*, *10*(3), 291-302. <https://doi.org/10.1007/s40572-023-00400-z>
- Reyes-Jurado, F., Soto-Reyes, N., Dávila-Rodríguez, M., Lorenzo-Leal, A. C., Jiménez-Munguía, M. T., Mani-López, E. & López-Malo, A. (2023). Plant-based milk alternatives: Types, processes, benefits, and characteristics. *Food Reviews International*, *39*(4), 2320-2351. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1952421>
- Rizzo, G. & Baroni, L. (2018). Soy, soy foods and their role in vegetarian diets. *Nutrients*, *10*.
- Robbins, K. S., Shin, E.-C., Shewfelt, R. L., Eitenmiller, R. R. & Pegg, R. B. (2011). Update on the healthful lipid constituents of commercially important tree nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(22), 12083-12092. <https://doi.org/10.1021/jf203187v>
- Roland, I. S., Aguilera-Toro, M., Nielsen, S. D.-H., Poulsen, N. A. & Larsen, L. B. (2023). Processing-induced markers in proteins of commercial plant-based drinks in relation to compositional aspects. *Foods*, *12*(17), 3282. <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/17/3282>
- Rustom, I. Y. S., López-Leiva, M. H. & Nair, B. M. (1991). A study of factors affecting extraction of peanut (*Arachis hypogaea* L.) solids with water. *Food Chemistry*, *42*(2), 153-165. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0308-8146\(91\)90031-I](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0308-8146(91)90031-I)

- Rustom, I. Y. S., López-Leiva, M. H. & Nair, B. M. (1996). Nutritional, sensory and physicochemical properties of peanut beverage sterilized under two different UHT conditions. *Food Chemistry*, 56(1), 45-53. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00153-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00153-0)
- Saldanha do Carmo, C., Silventoinen, P., Nordgård, C. T., Poudroux, C., Dessev, T., Zobel, H., Holtekjølen, A. K., Draget, K. I., Holopainen-Mantila, U., Knutsen, S. H. & Sahlstrøm, S. (2020). Is dehulling of peas and faba beans necessary prior to dry fractionation for the production of protein- and starch-rich fractions? Impact on physical properties, chemical composition and techno-functional properties. *Journal of Food Engineering*, 278, 109937. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109937>
- Sang, S., Cheng, X., Fu, H.-Y., Shieh, D.-E., Bai, N., Lapsley, K., Stark, R. E., Rosen, R. T. & Ho, C.-T. (2002). New type sesquiterpene lactone from almond hulls (*Prunus amygdalus* Batsch). *Tetrahedron Letters*, 43(14), 2547-2549. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)00327-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)00327-1)
- Sang, S. & Chu, Y. (2017). Whole grain oats, more than just a fiber: Role of unique phytochemicals. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(7), 1600715. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mnfr.201600715>
- Saxena, J., Ahmad Makroo, H. & Srivastava, B. (2017). Effect of ohmic heating on Polyphenol Oxidase (PPO) inactivation and color change in sugarcane juice. *Journal of Food Process Engineering*, 40(3), e12485. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpe.12485>
- Seow, C. C. & Gwee, C. N. (1997). Coconut milk: chemistry and technology. *International Journal of Food Science & Technology*, 32(3), 189-201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1997.00400.x>
- Sethi, S., Tyagi, S. K. & Anurag, R. K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3408-3423. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2328-3>
- Setchell, K. D. R., Brown, N. M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S. & Heubi, J. E. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(2), 447-453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ajcn/76.2.447>

- Sharma, N., Gayathri, R. & Priya, V. (2018). Assessment of nutritional value of overnight soaked cooked rice over un-soaked cooked rice. *Int. J. Res. Pharm. Sci*, 9, 616-619.
- Schiano, A. N., Harwood, W. S. & Drake, M. A. (2017). A 100-year review: Sensory analysis of milk. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9966-9986. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2017-13031>
- Silva, A. R. A., Silva, M. M. N. & Ribeiro, B. D. (2020). Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. *Food Research International*, 131, 108972. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108972>
- Soria, A. C. & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323-331. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>
- Stefanakis, M., Bassler, M. C., Böltzig, T., Ostertag, E., Allnoch, D., Zuber, R., Brecht, M. & Rebner, K. (2022). Improved process control by using the effective scattering coefficients to determine the fat content in homogenized cow-based milk with multivariate data modeling. *ACS Food Science & Technology*, 2(3), 548-557. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00435>
- Su, W., Zhang, Y. Y., Li, S. & Sheng, J. (2024). Consumers' preferences and attitudes towards plant-based milk. *Foods*, 13(1), 2. <https://www.mdpi.com/2304-8158/13/1/2>
- Szilagyi, A. & Ishayek, N. (2018). Lactose intolerance, dairy avoidance, and treatment options. *Nutrients*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/nu10121994>
- Taha, A., Mehany, T., Pandiselvam, R., Anusha Siddiqui, S., Mir, N. A., Malik, M. A., Sujayasree, O. J., Alamuru, K. C., Khanashyam, A. C., Casanova, F., Xu, X., Pan, S. & Hu, H. (2023). Sonoprocessing: mechanisms and recent applications of power ultrasound in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-39. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2161464>
- Tansakul, A. & Chaisawang, P. (2006). Thermophysical properties of coconut milk. *Journal of Food Engineering*, 73(3), 276-280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.035>
- Thrane, M., Paulsen, P. V., Orcutt, M. W. & Krieger, T. M. (2017). Chapter 2 - Soy protein: impacts, production, and applications. In S. R. Nadathur, J. P. D. Wanasundara, & L.

- Scanlin (Eds.), *Sustainable Protein Sources* (pp. 23-45). Academic Press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00002-0>
- Tulashie, S. K., Amenakpor, J., Atisey, S., Odai, R. & Akpari, E. E. A. (2022). Production of coconut milk: A sustainable alternative plant-based milk. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 6, 100206.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cscee.2022.100206>
- Tzen, J., Cao, Y., Laurent, P., Ratnayake, C. & Huang, A. (1993). Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiology*, 101(1), 267-276.  
<https://doi.org/10.1104/pp.101.1.267>
- U.S. Department of Agriculture, A. R. S. (2024). *FoodData Central* <https://fdc.nal.usda.gov>
- Vaikma, H., Kaleda, A., Rosend, J. & Rosenvald, S. (2021). Market mapping of plant-based milk alternatives by using sensory (RATA) and GC analysis. *Future Foods*, 4, 100049.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100049>
- van Nieuwenhuyzen, W. & Tomás, M. C. (2008). Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 472-486.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejlt.200800041>
- Vanga, S. K. & Raghavan, V. (2018). How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? *Journal of Food Science and Technology* 55(1), 10-20.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2915-y>
- Vanga, S. K., Wang, J., Orsat, V. & Raghavan, V. (2020). Effect of pulsed ultrasound, a green food processing technique, on the secondary structure and in-vitro digestibility of almond milk protein. *Food Res Int*, 137, 109523.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109523>
- Venkateswara Rao, M., C. K, S., Rawson, A., D. V, C. & N, V. (2023). Modifying the plant proteins techno-functionalities by novel physical processing technologies: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(19), 4070-4091.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1997907>
- Vesa, T. H., Marteau, P. & Korpela, R. (2000). Lactose intolerance. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(sup2), 165S-175S.



- Villa, C., Costa, J., Oliveira, M. & Mafra, I. (2018). Bovine milk allergens: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 137-164. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12318>
- Vogelsang-O'Dwyer, M., Zannini, E. & Arendt, E. K. (2021). Production of pulse protein ingredients and their application in plant-based milk alternatives. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 364-374. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.090>
- Walter, M., Marchezan, E. & Avila, L. A. d. (2008). Arroz: composição e características nutricionais. *Ciência Rural*, 38, 1184-1192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000400049>
- Wang, N., Wang, Y., Bai, L., Liao, X., Liu, D. & Ding, T. (2023). Advances in strategies to assure the microbial safety of food-associated ice. *Journal of Future Foods*, 3(2), 115-126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.12.003>
- Wattanayon, W., Udompijitkul, P. & Kamonpatana, P. (2021). Ohmic heating of a solid-liquid food mixture in an electrically conductive package. *Journal of Food Engineering*, 289, 110180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110180>
- Wielogorska, E., Ahmed, Y., Meneely, J., Graham, W. G., Elliott, C. T. & Gilmore, B. F. (2019). A holistic study to understand the detoxification of mycotoxins in maize and impact on its molecular integrity using cold atmospheric plasma treatment. *Food Chemistry*, 301, 125281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125281>
- Wu, D., Forghani, F., Daliri, E. B.-M., Li, J., Liao, X., Liu, D., Ye, X., Chen, S. & Ding, T. (2020). Microbial response to some nonthermal physical technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 95, 107-117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.012>
- Xiao, Y., Xu, P., Fan, H., Baudouin, L., Xia, W., Bocs, S., Xu, J., Li, Q., Guo, A., Zhou, L., Li, J., Wu, Y., Ma, Z., Armero, A., Issali, A. E., Liu, N., Peng, M. & Yang, Y. (2017). The genome draft of coconut (*Cocos nucifera*). *GigaScience*, 6(11). <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix095>
- Xiong, Y., Zhang, P., Warner, R. D., Shen, S. & Fang, Z. (2022). Cereal grain-based functional beverages: from cereal grain bioactive phytochemicals to beverage processing

- technologies, health benefits and product features. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(9), 2404-2431. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1853037>
- Yadav, D. N., Bansal, S., Jaiswal, A. K. & Singh, R. (2017). Plant based dairy analogues: an emerging food. *Agricultural and Food Sciences*. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.10.555781>
- Yu, Y., Li, X., Zhang, J., Li, X., Wang, J. & Sun, B. (2023). Oat milk analogue versus traditional milk: Comprehensive evaluation of scientific evidence for processing techniques and health effects. *Food Chemistry: X*, 19, 100859. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100859>
- Zang, E., Jiang, L., Cui, H., Li, X., Yan, Y., Liu, Q., Chen, Z. & Li, M. (2023). Only plant-based food additives: An overview on application, safety, and key challenges in the food industry. *Food Reviews International*, 39(8), 5132-5163. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2062764>
- Zhou, X., Jellen, E. N. & Murphy, J. P. (1999). Progenitor germplasm of domesticated hexaploid oat. *Crop Science*, 39(4). <https://doi.org/https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X003900040042x>

# PŘÍLOHA

## Příloha 1. Peptidové markery pro kokosovou náhražku mléka

Markery pro kokosovou náhražku mléka									
Vzorky	K1a	K1b	K1c	K2a	K2b	K2c	K3a	K3b	K3c
Počet shod	23	12	13	16	18	17	21	20	23
Markery	947	947	947	947	947	947	947	947	947
	1019	1018	1018	1018	1018	1018	1018	1018	1018
	1031	1031	1031	1031	1031	1031	1031	1031	1031
	1035	1035	1035	1035	1035	1035	1035	1035	1035
	1058	1058	1058	1058	1058	1058	1058	1058	1058
	1062	1062	1062	1062	1062	1062	1062	1062	1062
	1105	1104	1104	1104	1104	1104	1104	1104	1104
	1142	1141	1141	1141	1141	1141	1141	1141	1141
	1256	1713	1713	1525	1495	1525	1340	1340	1256
	1270	1749	1749	1565	1525	1555	1396	1396	1270
	1340	1857	1832	1627	1555	1565	1426	1495	1340
	1396	1873	1857	1713	1565	1627	1495	1525	1396
	1426		1873	1749	1627	1713	1525	1555	1426
	1495			1832	1713	1749	1555	1565	1495
	1525			1857	1749	1832	1565	1627	1525
	1555			1873	1832	1857	1627	1713	1555
	1565				1857	1873	1713	1749	1565
	1627				1873		1749	1832	1627
	1713						1832	1857	1713
	1749						1857	1873	1749
1832						1873		1832	
1857								1857	
1873								1873	
Průměrná shoda	<b>18</b>								
± směrodatná odchylka	<b>4</b>								

**Příloha 2. Peptidové markery pro mandlovou náhražku mléka**

<b>Markery pro mandlovou náhražku mléka</b>									
<b>Vzorky</b>	<b>M1a</b>	<b>M1b</b>	<b>M1c</b>	<b>M2a</b>	<b>M2b</b>	<b>M2c</b>	<b>M3a</b>	<b>M3b</b>	<b>M3c</b>
<b>Počet shod</b>	6	5	6	6	6	6	6	6	6
<b>Markery</b>	1169	1169	1170	1170	1170	1170	1170	1170	1170
	1316	1348	1316	1316	1316	1316	1316	1316	1316
	1348	1436	1348	1348	1348	1348	1348	1348	1348
	1436	1478	1436	1436	1436	1436	1436	1436	1436
	1478	1494	1478	1478	1478	1478	1478	1478	1478
	1494		1494	1491	1491	1491	1491	1491	1491
<b>Průměrná shoda</b>	<b>6</b>								
<b>± směrodatná odchylka</b>	<b>0</b>								

**Příloha 3. Peptidové markery pro náhražku mléka z pražených mandlí**

<b>Markery pro náhražku mléka z pražené mandle</b>									
<b>Vzorky</b>	<b>PM1a</b>	<b>PM1b</b>	<b>PM1c</b>	<b>PM2a</b>	<b>PM2b</b>	<b>PM2c</b>	<b>PM3a</b>	<b>PM3b</b>	<b>PM3c</b>
<b>Počet shod</b>	5	5	5	4	3	3	3	3	3
<b>Markery</b>	1170	1170	1170	1169	1169	1169	1169	1169	1169
	1316	1316	1316	1225	1347	1347	1347	1347	1347
	1348	1348	1348	1347	1478	1478	1478	1478	1478
	1436	1436	1436	1491					
	1478	1478	1478						
<b>Průměrná shoda</b>	<b>4</b>								
<b>± směrodatná odchylka</b>	<b>1</b>								

**Příloha 4. Peptidové markery pro ovesnou náhražku mléka**

<b>Markery pro ovesnou náhražku mléka</b>									
<b>Vzorky</b>	<b>O1a</b>	<b>O1b</b>	<b>O1c</b>	<b>O2a</b>	<b>O2b</b>	<b>O2c</b>	<b>O3a</b>	<b>O3b</b>	<b>O3c</b>
<b>Počet shod</b>	11	12	11	12	12	12	12	12	13
<b>Markery</b>	925	925	925	926	926	926	925	925	696
	973	944	973	945	944	974	944	973	925
	991	973	1003	974	974	992	973	1003	973
	1003	1003	1047	992	992	1004	1003	1046	991
	1185	1047	1185	1004	1004	1047	1185	1124	1003
	1302	1185	1302	1185	1185	1185	1206	1185	1124
	1391	1302	1391	1302	1302	1302	1302	1302	1185
	1518	1391	1518	1391	1391	1391	1391	1391	1302
	1532	1518	1532	1518	1518	1518	1518	1518	1391
	1592	1532	1592	1532	1532	1532	1532	1532	1518
	1652	1592	1652	1592	1592	1592	1592	1592	1532
		1652		1652	1652	1652	1652	1652	1592
								1652	
<b>Průměrná shoda</b>	<b>12</b>								
<b>± směrodatná odchylka</b>	<b>1</b>								

**Příloha 5. Peptidové markery pro sójovou náhražku mléka**

<b>Markery pro sójovou náhražku mléka</b>									
<b>Vzorky</b>	<b>S1a</b>	<b>S1b</b>	<b>S1c</b>	<b>S2a</b>	<b>S2b</b>	<b>S2c</b>	<b>S3a</b>	<b>S3b</b>	<b>S3c</b>
<b>Počet shod</b>	4	2	2	3	2	3	3	3	2
<b>Markery</b>	689	689	689	689	689	689	689	689	689
	705	705	1129	705	1129	705	1130	1129	1129
	1114			1130		1129	1292	1292	
	1129								
<b>Průměrná shoda</b>	<b>3</b>								
<b>± směrodatná odchylka</b>	<b>1</b>								