



CM40_2023

Postup nepřímého, rutinního, rychlého odhadu hodnoty titrační kyselosti mléka

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali:

Hana Nejeschlebová, Oto Hanuš, Marcela Klimešová, Jaroslav Kopecký,
Radoslava Jedelská, Ludmila Nejeschlebová

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

ISBN: 978-80-88390-08-4 (MILCOM)

Srpen 2023

Vydavatel:

Pro: Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. vydal MILCOM a.s.,
Ke Dvoru 12a, Praha 6, 16000

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce:

https://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/cm40_2023.pdf

1. Vydání 2023

ISBN: 978-80-88390-08-4 (MILCOM)

Podíl autorů, firem a projektů na tvorbě metodiky:

Hana Nejeschlebová (51 %), Oto Hanuš (15 %), Marcela Klimešová (13 %), Jaroslav Kopecký (12 %), Radoslava Jedelská (5 %), Ludmila Nejeschlebová (4 %)

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha (100 %)

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

- 1) Odborník z daného oboru: Ing. Libor Janů Ph.D., pracoviště: Everstar s.r.o. Šumperk, chemik, odborník na čisticí a dezinfekční roztoky a analýzy mléka, vedoucí laboratoře a technologie výroby;
- 2) Pracovník státní správy: Ing. Zdenka Majzlíková, pracoviště: Česká plemenářská inspekce, Praha – odborník v kontrole užitekosti zvířat a v mlékařství.

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení výzkumných projektů MZe NAZV ZEMĚ QK 21010212 s názvem: „Vývoj metod pro kontrolu manipulace kvality mléka určeného k dalšímu technologickému zpracování a zajištění jeho autenticity“ a QK 21020245 s názvem: „Vliv míry porušení chladírenského řetězce při odběru a transportu úředně odebraných vzorků na jejich mikrobiální profil“.

Projekty (podíly): MZe NAZV ZEMĚ QK 21010212 (70 %) a QK 21020245 (30 %).

Uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) k řešení rutinních systémů analytické laboratoře v kontrole kvality mléka k testaci vlastnosti bazénových vzorků mléka a pro zvýšení věrohodnosti analytických výsledků prostřednictvím validace postupu.

I) Cíl metodiky:

Cílem metodiky CM 40 2023 je podpora kontrolních metod a zajištění a zvýšení věrohodnosti výsledků a provozní jistoty managementu rutinních analytických laboratoří v systému kontroly kvality mléka (KKM; bazénové vzorky mléka – podpora kvality a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce) prostřednictvím validace modelů nepřímého stanovení titrační kyselosti mléka.

Náplň metodiky:

Náplň metodiky CM 40 2023 je implementace dosažených výsledků, získaných na základě předchozího a současného výzkumu a vývoje v rámci řešení projektů MZe NAZV ZEMĚ QK 21010212 a QK 21020245, do prostředí systému práce rutinních analytických laboratoří kontroly kvality mléka pro podporu spolehlivosti dat ke kontrole kvality a bezpečnosti počátku mléčného potravinového řetězce.

Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 01.10.2023.

II) Vlastní popis metodiky

Postup nepřímého, rutinního, rychlého odhadu hodnoty titrační kyselosti mléka

Struktura metodiky:

Nejčastěji použité zkratky

1) Úvod – literární podklady a současná situace

Obecné informační zázemí;

Vztahy TKM k faktorům mlékařské praxe a ostatním mléčným ukazatelům – zdroje přirozené (biologické, fyziologické a technologické) variability TKM;

Vztahy TKM ke zdravotnímu stavu krav v rámci patologické variability TKM;

Metody hodnocení a stanovení TKM;

Využití infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT) v mlékařství;

Současné podmínky mlékařského prostředí pro TKM.

2) Cíl metodiky vývoje a validace postupu pro rutinní stanovení titrační kyselosti mléka

3) Vlastní metodika pro rutinní stanovení titrační kyselosti mléka v kontrole kvality mléka

Materiál a metody

Validace aktuální, přirozené dynamiky TKM podle teploty a času pro nastavení parametrů přípravy referenční (kalibrační) sady vzorků;

Tvorba reprezentativní, základní kalibrační vzorkové sady;

Stabilizace a modifikace vzorkové kalibrační sady;

Analýzy a analytické postupy pro vzorky mléka;

Statistické postupy vyhodnocení.

Výsledky a diskuse

Technické omezení rutinních metod stanovení TKM;

Charakteristiky základních vzorkových kalibračních (referenčních) sad;

Výsledky korelační analýzy kalibračních modelů TKM pro MIR-FT;

Výsledky validace kalibračních korelačních modelů TKM pro MIR-FT;

Diskuse vybraných aspektů odhadu TKM kalibračním modelem pro MIR-FT.

4) Závěr metodiky pro rutinní stanovení titrační kyselosti mléka

Projektové zdůvodnění potřeby doplňkového řešení CM 40 2023.

5) Použité jiné literární prameny při tvorbě metodiky

6) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci metodiky

Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech

Předchozí tematicky relevantní metodiky k problematice stanovení složek a vlastností mléka metodou infračervené spektroskopie a kontroly kvality mlékařských analýz

7) Přílohové materiály s podklady pro validaci kalibračních modelů odhadu TKM pomocí MIR-FT v rámci metodiky

Nejčastěji použité zkratky:

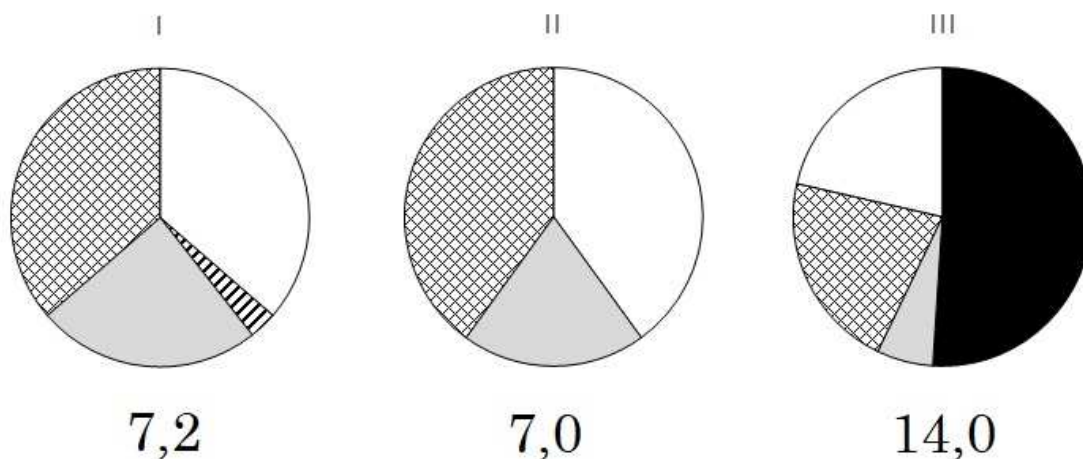
BMM = bod mrznutí mléka;
CF nebo C = České strakaté;
COB = koliformní bakterie;
CPM = celkový počet mezofilních mikroorganismů;
ČMSCH a. s. = Českomoravská společnost chovatelů;
ČR = Česká republika;
H = Holštýn;
HB = obsah hrubých bílkovin;
KAS = obsah kaseinu;
KKM = kontrola kvality mléka;
KTJ = CFU = kolonii tvořící jednotka;
L = obsah monohydrátu laktózy;
LRM = laboratoř rozborů mléka;
MIR-FT = technologie infraanalýzy mléka s celým spektrem pomocí Michelsonova interferometru a s využitím Fourierových transformací;
MM = celková mikroflóra mléka;
MOC = koncentrace močoviny;
pH = aktivní kyselost;
PPM = psychrofilní mikroorganismy;
PSB = počet somatických buněk;
PTM = psychrotrofní mikroorganismy;
RIL = rezidua inhibičních látek;
STP = obsah sušiny tukuprosté;
T = obsah tuku;
TCM = celkový počet mezofilních mikroorganismů;
TKM (SH) = titrační kyselost mléka;
TRB = termorezistentní bakterie;
TRS = termorezistentní sporulující bakterie;
VOD = vodivost (konduktivita) mléka;
VMK = obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku;
VÚM = Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha.

1) Úvod – literární podklady a současná situace

Obecné informační zázemí

Titrační kyselost mléka je důležitým kvalitativně-hygienickým a technologickým ukazatelem nakupovaného syrového mléka, ale také mezistupňových vzorků při zpracování mléka na mléčné potraviny (praktická analýza, příloha 1). Titrační kyselost (TKM, nebo SH; PIJANOWSKI, 1977; KLÍČNÍK, 1978; DOLEŽAL et al., 2000; SAMKOVÁ et al., 2012; NAVRÁTILOVÁ et al., 2012) se stanovuje titračně-neutralizačním postupem podle normy ČSN 57 0530. TKM se vyjadřuje ve stupních Soxhlet-Henkela ($^{\circ}\text{SH}$, titrace roztokem NaOH v ml $0,25 \text{ mol} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ (v ml $\times 2,5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$)). Podle zemí existuje historicky a tradičně více jednotek pro vyjádření TKM (cca 5), nicméně princip stanovení TKM je stále stejný. TKM je ukazatelem kyselosti složek mléka (primární, nativní SH) a pak, po uložení mléka, také získané kyselosti (sekundární, získané SH) nestandardními procesy. Tyto jsou představovány rozkladem, tedy kysnutím mléka, např. při skladování a vyšší bakteriální kontaminaci. To je obvykle důsledkem zhoršené hygieny dojení nebo uložení a transportu mléka. Zkrátka a dobře, historicky, mléko při prodeji na trhu kyselé být nesmělo již dávno dříve (KADEČKA a ROZMAN, 2006), platí to dodnes a bude platit nesporně i nadále. Hodnotu TKM (SH) standardního mléka určuje i nyní již nezávazná, dřívější, ale dobrá norma ČSN 57 0529 od 6,2 do 7,8 $^{\circ}\text{SH}$. Např. (HANUŠ, 1992), v nasávací oblasti mlékárny s poradenským systémem ke kvalitě mléka činila TKM $6,49 \pm 0,4$ $^{\circ}\text{SH}$ (pět zimních měsíců, 1 866 vzorků bazénového mléka z 230 stájí 30 podniků). Nativní TKM je tvořena ze 2/5 kaseinem (PIJANOWSKI, 1977; KRATOCHVÍL, 1984; BOROŠ et al., 1988), ze 2/5 minerálními látkami a stopami organických kyselin a z 1/5 sekundární reakcí připadající na fosfáty (Obr. 1).

Obr. 1 Hypotetické grafické znázornění možné dynamiky titrační kyselosti ($^{\circ}\text{SH}$) mléka (proporcionální zdroje kyselosti).



Vysvětlivky:

I = mléko zdravé (nemastitidní), čerstvě nadojené, syrové, bazénové do 0,5 hodiny po nadojení (primární, nativní kyselost);

II = mléko zdravé (nemastitidní), syrové, bazénové, dobře chladově uložené (6 $^{\circ}\text{C}$), odstáté, 3 až 6 hodin po nadojení (primární, původní kyselost);

III = mléko zdravé (nemastitidní), syrové, bazénové, chybně uložené (10 a více $^{\circ}\text{C}$, snížená hygiena) více než 6 hodin po nadojení (sekundární, získaná kyselost);

šrafovaná plocha = kysličník uhličitý; bílá plocha = bílkoviny (kasein); mřížkovaná plocha = minerální kyselé složky a organické kyseliny (citráty, včetně původní kyseliny mléčné, ostatní minoritní organické kyseliny); šedá plocha = skluzová reakce průběžně uvolněné kyselosti fosfátů chemickou reakcí při alkalické titraci; černá plocha = získaná (sekundární) kyselost jako kyselina mléčná z bakteriálního rozkladu laktózy prostřednictvím původních acidogenních mikroorganismů.

Původní, primární TKM kolísá v souborech individuálních vzorků mléka obou plemen (Holštýn (H) a České strakaté (C) – převažující populace dojníc v ČR) kolem průměrů $7,52 \pm 0,89$ a $7,62 \pm 0,97$ a $7,27 \pm 0,9$ a $7,28 \pm 1,03$ °SH (plemeno C, vysoká a nízká mléčná užitkovost a plemeno H, totéž). Variační koeficienty tak činily 11,8 %, 12,7 a 12,4 a 14,1 % (HANUŠ et al., 2007 a; JANŮ et al., 2007 b; SOJKOVÁ et al., 2010 a, b). U bazénových vzorků mléka lze přirozeně očekávat variabilitu TKM nižší, poloviční až třetinovou oproti vzorkům individuálním, nebo čtvrtovým. Ve výsledcích je jasně patrné, vyšší obsah bílkovin a vyšší nativní SH, podle plemen i uvnitř plemen podle dojivosti. Rovněž byl nalezen významný ($P < 0,01$) pozitivní korelační koeficient mezi TKM a obsahem bílkovin 0,52 (GENČUROVÁ et al., 1997). Shodný ($P < 0,01$), ale méně těsný vztah ($r = 0,16$), byl potvrzen u dojníc plemen české strakaté a černostrakaté nížinné ve střední fázi laktace (individuální vzorky mléka, $n = 288$) také ke kaseinovému číslu (HANUŠ et al., 1995). Výše uvedené ohledně variability SH bazénového mléka mohou doložit výsledky $7,14 \pm 0,54$ °SH ($n = 1331$, vzorky odebírány měsíčně po jeden rok, plemena C a H, cca 100 stád) a $6,62 \pm 0,38$ °SH ($n = 216$), kdy variační koeficienty činily 7,6 a 5,8 % (GENČUROVÁ et al., 1993, 1997).

Titrační kyselost mléka (TKM) je, od doby vzniku průmyslového mlékárenství, zejména ve Švýcarsku, jednou z prvních a nejdéle hodnocených vlastností mléka, spolu s obsahem tuku. Často byla stanovována pro kontrolu kvality mléka (složení a hygienické způsobilosti) a to až do konce osmdesátých let minulého století. Tedy až do doby plošného nasazení resazurinového testu (od 60. až 70. let, v ČR) nebo zavedení stanovení pyruvátu (kyseliny pyrohroznové; např. v Bavorsku). TKM byla využívána primárně ke kontrole mikrobiologické kvality mléka, tedy indikaci nežádoucího zkysnutí.

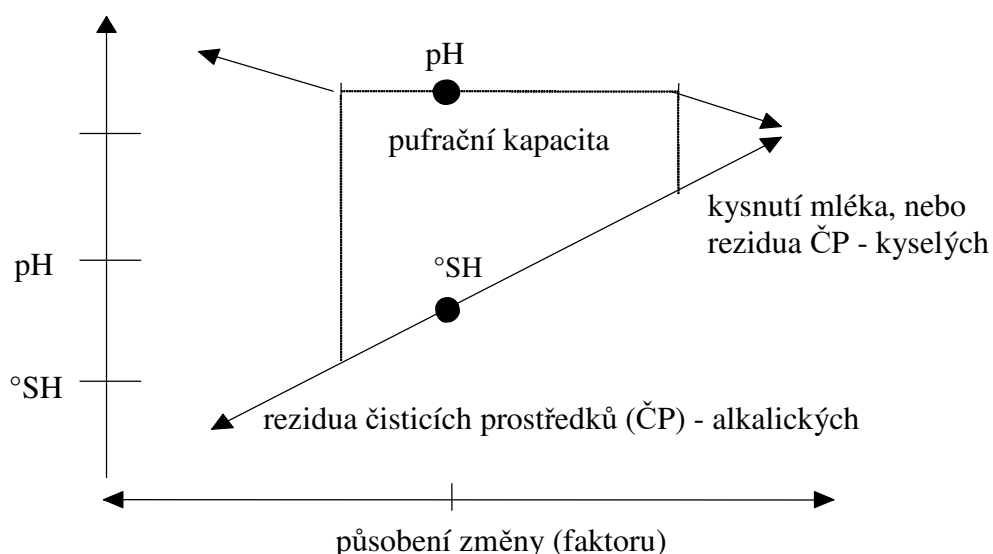
V ČR byla TKM stanovována a intenzivně studována až do 90. let, jak svědčí četné práce. Pak již, i když stanovení TKM v technologii v mlékárnách nevymizelo docela dodnes, byla tato analýza kvality při hodnocení syrového mléka nahrazena jinými, podstatou souvisejícími, ale náročnějšími, a více vypovídajícími postupy. V souhrnu se jedná rámcově o stanovení celkového počtu mikroorganismů, stanovení skupin technologicky nežádoucích mikroorganismů, stanovení elektrické konduktivity, bodu mrznutí, počtu somatických buněk, obsahu bílkovin (resp. kaseinu) a dnes i volných mastných kyselin mléčného tuku. Tuto náhradu umožnil výzkum, vývoj a nástup modernějších analytických metod v mlékařství.

Popsaný vývoj proběhl podobně zejména v mlékařsky vyspělých zemích, tedy v západní a střední Evropě a na Islandu, v Severní Americe, Austrálii, na Novém Zélandu a v Jihoafrické republice. Další světové oblasti jako východní Evropa, Asie, Afrika, Oceánie a Jižní Amerika, které jsou obvykle geograficky a klimaticky náročnější, s extrémně velkou fluktuací počasí, s řidší sítí komunikací a většími vzdálenostmi, stejně jako déle trvajícím transporty (nezřídka s méně důkladným technologickým transportním vybavením) mléka ke zpracování, jsou kraje, kde je tento vývoj pomalejší a TKM je dodnes často využívanou hodnotou v mlékařství ke kontrole kvality syrového mléka. Stále jsou z tohoto pohledu velkou technologickou výzvou pro transport syrového mléka rozsáhlé horské, pouštní nebo severské končiny. Jak je patrné (ÖZDEMİR a KAHYAĞLU, 2020), v Turecku slouží hodnota TKM (vyjadřovaná jako % kyseliny mléčné) k hodnocení kvality syrového mléka i dnes. Podobné platí také o Ruské federaci. Aktuálně a obecně je tedy TKM stále důležitou technologickou vlastností. Proto docházelo i k dalšímu výzkumu a vývoji metod rychlého, nepřímého stanovení této hodnoty.

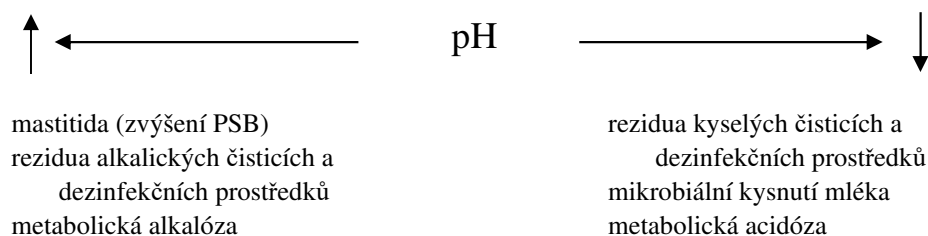
Vztahy TKM k faktorům mlékařské praxe a ostatním mléčným ukazatelům – zdroje přirozené (biologické, fyziologické a technologické) variability TKM

SH (TKM) je významné pro technologické zpracování mléka (pro sýrařství – koagulace, i pro fermentované mléčné výrobky), ale i pro trvanlivost mléka (konzumní mléko). Pufrací kapacita mléka je silnější v oblasti kyselé než alkalické. Proto když vzroste kyselost mléka, např. rozkladem laktózy bakteriální činností, zatímco hodnota pH ještě neklesá, hodnota SH již vzrůstá (Obr. 2). SH reaguje tedy citlivěji oproti pH. Proto někdy mezi kyselostmi pH a SH nemusí být příliš těsný vztah (Obr. 3). Pufrací kapacita mléka je, jak známo, chemicky determinována obsahy fosfátů, koloidního kalcium-fosfátu, citrátů, uhličitanů, proteinů a solí kyseliny mléčné v mléce (PIJANOWSKI, 1977; KLÍČNÍK, 1978; NAVRÁTILOVÁ et al., 2012).

Obr. 2 Schéma vlivu pufrací kapacity mléka na změny kyselosti pH a SH.



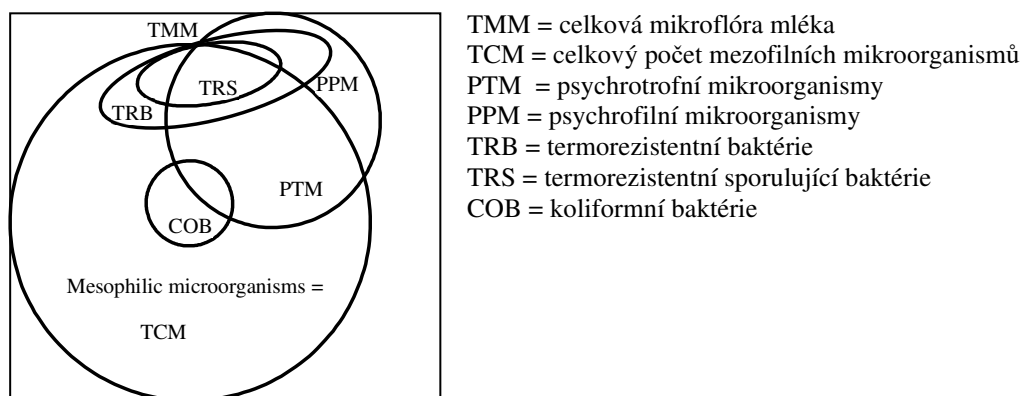
Obr. 3 Faktory působící na pH - jen malé kolísání u mléka z důvodu fyziologického uplatnění pufrací kapacity této biologické tekutiny.



TKM (SH) ovlivňuje řada faktorů, závisí na kyselé reakci organických kyselin, solí a bílkovinných molekulárních konců, které určují nativní hodnotu TKM. Proto, čím více bílkovin tím vyšší TKM a naopak, neboť bílkoviny tvoří až 2/5 nativní kyselé reakce mléka. TKM (SH) pak může vzrůstat kysnutím mléka (bakteriální rozklad, např. laktobacily nebo lépe baktériemi

mléčného kvašení; Obr. 4) nebo kyselými příměsemi (dezinfekční prostředky). Tímto způsobem může dosáhnout TKM hodnot až 12 až 14 °SH, pokud zůstane mléko v tekutém stavu. TKM může naopak klesat prostřednictvím alkalických příměsí (dezinfekční prostředky; Obr. 2). TKM také reaguje na metabolický stav (normální, metabolická acidóza nebo alkalóza) zvířete a tedy jeho výživu a následné složení mléka. Např. energetický deficit výživy dojníc značí méně bílkovin v mléce a i nižší nativní TKM. Např. BOROŠ et al. (1988), při studiu souboru bazénových vzorků (n = 23) s hodnotami TKM blízkými spodní hranici normy cca 6,3 °SH, spojují výskyt anomálně nízkých hodnot TKM s nedostatkem zásobení organismu dojnice energetickou složkou krmné dávky a narušení rovnovážného stavu mléka prostřednictvím porušení acidobázické rovnováhy metabolismu zvířat. Podobně argumentovali i MARTINKO a KROKAVEC (1987; cit. GENČUROVÁ a HANUŠ, 1998). Bylo zároveň poukázáno (BOROŠ et al., 1988) na snížený obsah hrubých bílkovin v mléce, rozpustných bílkovin a laktózy a sníženou stabilitu laktoproteinů, resp. mléka, vůči etanolu.

Obr. 4 Schéma možného fyziologicko-technologického rozdělení základní případně normované (ČSN 57 0529) kontaminující mléčné mikroflóry (modifikováno podle HANUŠ et al., 2004).

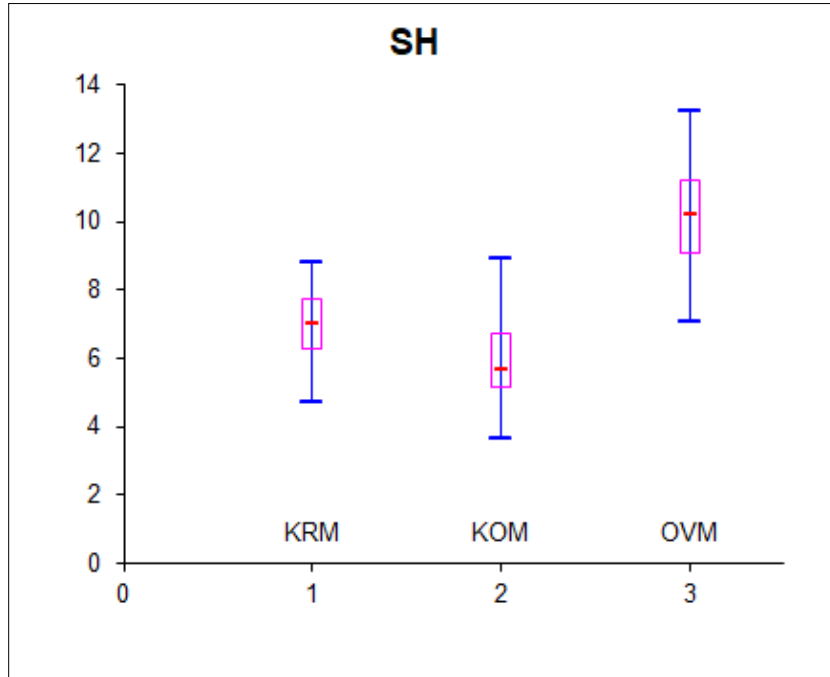


Nedávno bylo v ČR provedeno (HANUŠ et al., 2020), na sezónně a plemenně dobře profilovaných vzorcích bazénového mléka skotu (aritmetický průměr a směrodatná odchylka = $7,0 \pm 1,05$ °SH, variační koeficient $v_x = 15,0$ %), koz ($5,97 \pm 1,38$ °SH, $v_x = 23,1$ %) a ovcí ($10,15 \pm 1,69$ °SH, $v_x = 16,7$ %), srovnání hodnot původní TKM. Byly logicky shledány významné rozdíly (Obr. 5), v zásadě odpovídající i rozdílům v obsahu kyselých bílkovinných složek (především kaseinu) u těchto druhů mléka. Je tak zřejmé, že biologický druh mléka je významným faktorem variability TKM.

Byl také sledován vliv ranního a večerního dojení (SKÝPALA a CHLÁDEK, 2008) na hodnotu primární TKM během roku u krav plemene Holštýn (n = 12 dojníc). Rozdíl byl mezi nádoji nevýznamný ($P > 0,05$; 7,75 a 7,64 °SH). Již dříve BRAUNER a HANUŠ (1984) nenalezli významný rozdíl ($P > 0,05$) v TKM mezi ranním a večerním nádojem (12/12 hodin; $7,09 \pm 0,94$ a $7,45 \pm 0,75$ °SH, při korelaci 0,85 ($P < 0,01$), n = 70 a 70) pro červenostrakaté dojnice na 2. a vyšší laktaci. Mnohem větší vliv ($P < 0,01$) byl naopak pozorován v případě pořadí laktace dojníc (HANUŠ a FOLTYS, 1991), kde prvotelky vykazovaly vyšší hodnotu primární TKM oproti kravám na druhé a vyšší laktaci 7,19 versus 6,81 °SH, při PSB 202 versus 291 $10^3 \times \text{ml}^{-1}$ (geometrický průměr). Zatímco roční období nebylo významným faktorem, plemeno krav se ukázalo být faktorem významným ($P < 0,01$): - české strakaté 7,03; - slovenské strakaté 6,64; - slovenské pincgavské 7,14; - černostrakaté nížinné 6,9 °SH. Významné korelační koeficienty ($P < 0,05$) TKM v této studii (n = 191) byly k: - obsahu kaseinu 0,2; - obsahu sušiny tukuprosté

0,23; - obsahu sušiny celkové 0,19; - indexu refrakce 0,18; - kysací schopnosti mléka 0,15; - aktivní kyselosti pH -0,22; - obsahu Ca 0,33; - obsahu anorganického P -0,2; - koncentraci chloridů -0,28; - PSB -0,28.

Obr. 5 Vliv druhu mléka (kráva KRM, koza KOM, ovce OVM) na titrační kyselost mléka (TKM, SH ve °SH).



(Úsečka ukazuje minimum až maximum; box vymezuje vrch 1. a 3. kvartilu; středová značka v boxu je medián; °SH; n = 24 KRM, 24 KOM, 24 OVM; $P \leq 0,01$ mezi KRM a KOM, $P \leq 0,001$ mezi KRM a OVM a mezi KOM a OVM.)

Dalším důležitým sledovaným faktorem se ukázal být vliv ekologického hospodaření. Při produkci biomléka se ukázala významně ($P < 0,05$) vyšší hodnota TKM oproti konvenčnímu kravskému mléku (CERMANOVÁ et al., 2011) $8,34 \pm 0,87$ a $7,82 \pm 0,66$ °SH (n = 32 a 32, bazénové vzorky mléka plemene Holštýn). Podobné výsledky ($P < 0,001$) byly získány také v dřívější studii (HANUŠ et al., 2008 c) $8,71 \pm 0,48$ a $7,17 \pm 0,52$ °SH (n = 36 a 16, bazénové vzorky mléka plemene Holštýn). Nížinná (247 ± 46 m; při dojivosti $26,3 \pm 7,9$ kg/den) a podhorská (581 ± 26 m; při dojivosti $27,4 \pm 8,4$ kg/den) oblast přitom nebyly zdrojem významné změny TKM $7,41 \pm 0,88$ °SH (vx = 11,8 %) oproti $7,4 \pm 1,01$ °SH (vx = 13,6 %) u 240 a 444 (plemeno České strakaté a Holštýn ½ a ½) individuálních vzorků mléka (HANUŠ et al., 2005).

ÖZDEMİR a KAHYAOGU (2020) označili sezónu v klasickém dělení jaro ($0,188 \pm 0,0$ %), léto ($0,191 \pm 0,01$ %), podzim ($0,18 \pm 0,01$ %) a zima ($0,178 \pm 0,01$ %), kdy léto je poměrně logicky nejvyšší z hlediska možné sekundární TKM, za významný ($P < 0,01$) faktor variability TKM v Turecku (n = 240; celkový aritmetický průměr $0,184 \pm 0,01$ % kyseliny mléčné; pH $6,61 \pm 0,13$). Také GENČUROVÁ a HANUŠ (1998) uvedli výrazný vliv sezóny po měsících na TKM včetně sezónní variability jednotlivých složek celkové TKM podle její frakcionace na zdroje jako kasein, sérové bílkoviny, koloidní kalciumfosfát, syrovátka, atd. (metodou dle LINGA, 1936). Dále TKM vykazovala nižší hodnoty uprostřed laktace a vyšší na začátku a ke konci laktace (ČEJNA, 2006), což může souviset především s opačným průběhem křivky bílkovin, resp. kaseinu. Na začátku laktace měly prvotelky TKM 7,28 a starší krávy 7,22 °SH, uprostřed laktace 6,74 a 6,91 °SH a ke konci 7,31 a 7,56 °SH. RATHNAYAKE et al. (2016) pak technologicky ověřili na Sri Lance významně ($P < 0,01$) zvýšenou odolnost mléka

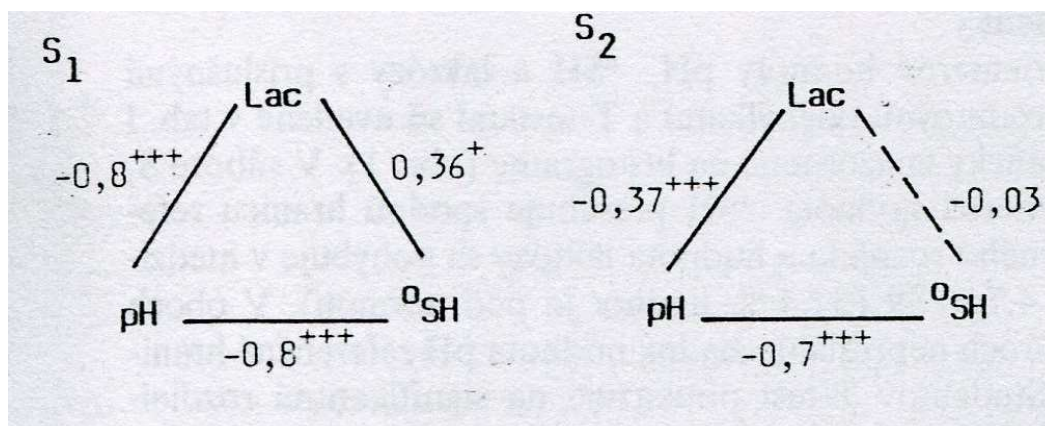
(laktoproteinů) vůči koncentraci etanolu při nižších hodnotách TKM vyjádřené jako kyselina mléčná: - 0,1 % vůči 74 % etanolu; - 0,3 % vůči 66 %.

Ve studii s 553 bazénovými vzorky mléka krav plemene české strakaté a černostrakaté nížinné (HANUŠ et al., 1993 a) byly zjištěny významné ($P < 0,01$) korelace TKM ($6,88 \pm 0,52$ °SH; $v_x = 7,6$ %) k : - PSB -0,25; - obsahu acetonu -0,17; kyselosti pH -0,28; - elektrické vodivosti - 0,33. Zejména u acetonu lze vztah interpretovat jako pokles TKM s růstem nedostatku energie ve výživě dojníc, tedy růstem obsahu acetonu jako ukazatele subklinické ketózy v souladu s názorem FAMIGLI-BERGAMINI (1987). V další studii (HANUŠ et al., 1993 b) s přidavky nežádoucích metabolitů do mléka (močovina, aceton, dusičnany) bylo roční období prokázáno jako významný faktor TKM: - zima $6,8 \pm 0,4$ °SH, $n = 311$, bazénové vzorky; - léto $6,99 \pm 0,64$ °SH, $n = 224$. Byly rovněž, částečně překvapivě, nalezeny i vlivy genetické na tento metabolický ukazatel primární TKM (HANUŠ et al., 2011 b), kde vliv otců krav (na dcery) na TKM byl významný ($P = 0,0012$). Uvedené platilo pro 13 býků s více než 5ti dcerami (prvotelkami) na otce plemene České strakaté při 191 individuálních vzorcích mléka s periodou vzorkování u krav od 90. do 180. dne laktace a s průměrnou TKM $8,23 \pm 1,03$ °SH ($v_x = 12,6$ %).

Italská studie (MARIANI a BONATTI, 1988) zabývající se vysvětlením anomálních (zvýšených) hodnot primární TKM chemismem mléka uvádí zřetelnou vazbu TKM na obsah kaseinu, kaseinové číslo, zejména obsah fosforu a také vápníku ve smyslu popisu fosfokaseinátu vápenatého, jako ústřední bílkovinné molekuly kaseinových mlék, ale i disociovaných fosfátových a vápenných iontů (minerální fosfor a vápník). Vybraná mléka, anomální a normální, vykazovala TKM $4,18 \pm 0,25$ a $3,36 \pm 0,13$ °SH (ovšem na 50 ml mléka) při $2,5 \pm 0,21$ a $2,48 \pm 0,2$ % kaseinu, $99,4 \pm 6,8$ a $85,9 \pm 4,3$ mg/100 ml P, 115,2 a 112,9 mg/100 ml Ca a $78,2 \pm 1,9$ a $78,4 \pm 1,8$ % kaseinového čísla (kaseinový N \times 100/celkový N). MARIANI et al. (1989) pro sníženou a normální ($P < 0,001$) TKM $2,82 \pm 0,15$ a $3,33 \pm 0,34$ °SH (50 ml mléka) zaznamenali významné rozdíly ($P < 0,05$ až $P < 0,001$) pro: pH $6,78 \pm 0,03$ a $6,7 \pm 0,03$; - obsah kaseinu $2,1 \pm 0,16$ a $2,24 \pm 0,22$ %; - kaseinové číslo $76,54 \pm 1,7$ a $77,87 \pm 1,97$ %; - celkový P (organický i anorganický) $77,5 \pm 4,9$ a $87,3 \pm 5,8$ mg/100 ml; a nevýznamné ($P > 0,05$) pro: - celkový Ca (organický i anorganický) $104,7 \pm 4,8$ a $107,7 \pm 6,7$ mg/100 ml; - kyselinu citronovou $171,9 \pm 18,3$ a $182,7 \pm 19,7$ mg/100 ml; - obsah monohydrátu laktózy $4,82 \pm 0,11$ a $4,89 \pm 0,12$ g/100 ml.

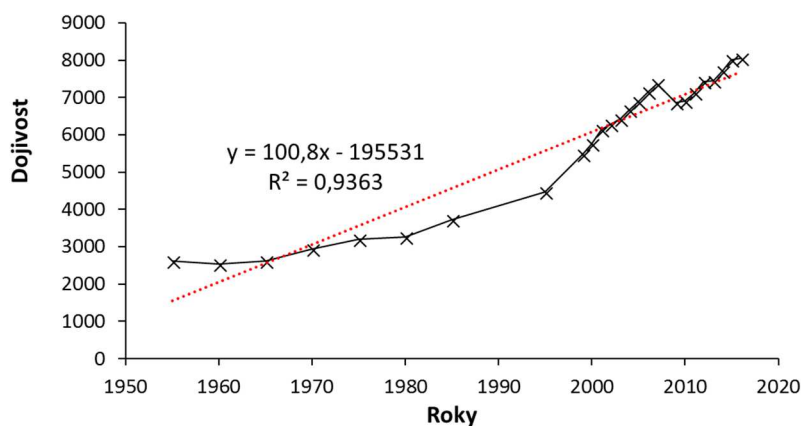
PATSCHOVÁ a ŠMIDRIKOVÁ (1990) našly rozdílné korelační vztahy mezi laktózou a kyselostmi pH a SH u skupin dojníc se sníženou (pod $6,2$ °SH; S_1) a normální (S_2) TKM (Obr. 6). U první skupiny byla záporná korelace -0,8 mezi laktózou a pH ($P < 0,001$) a kladná mezi laktózou a SH 0,36 ($P < 0,05$). U druhé skupiny to bylo -0,37 ($P < 0,001$) a -0,03 ($P > 0,05$). V experimentu byly studovány vztahy pro původní TKM, primární, nikoliv tedy sekundární, čili jednalo se o principy fyziologických vztahů, neboť chemicky a chladem nekonzervované vzorky mléka byly zpracovány do 3 hodin po nadojení (Obr. 1).

Obr. 6 Korelační vztahy složek a vlastností kravského mléka ve vzorcích se syndromem primární snížené a normální TKM, S₁ a S₂ (podle PATSCHOVÁ a ŠMIDRIAKOVÁ, 1990).



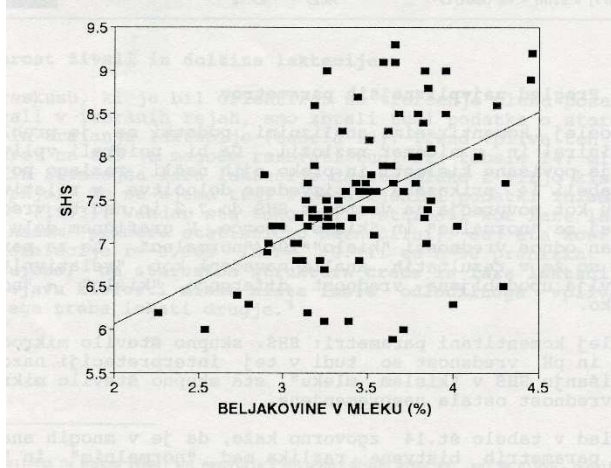
Rozsáhlá dvouletá studie v celé ČR (Čechy a Morava; VARVAŽOVSKÝ et al., 1985) zahrnula vybrané chovy s trvale nízkou TKM (pod 6,2 °SH). Byl hodnocen charakter ustájení (vazné stelivové a volné boxové, od 96 dojnic po 1 048) a byly klasifikovány krmné dávky dojnic, kdy tehdejší mléčná užitkovost činila v průměru 3 600 kg mléka za laktaci (Obr. 7). Zahrnutá plemena byla České červenostrakaté, dále jeho kříženci s plemenem Ayrshire a Černostrakaté nížinné, a Černostrakaté nížinné. Podle klasifikace krmné dávky byla TKM: - vhodná 6,0 – 7,3; - s mírnou úpravou 6,0 – 7,6; - s úpravou většího rozsahu 6,0 až 7,0; - se zásadní úpravou 5,8 – 7,3 °SH. Zohledněny byly vztahy k ostatním složkám mléka, nicméně, závěry pro praxi pro snížení výskytu nízké TKM byly poměrně obecné: - zajistit vyrovnanost výživy dojnic; - zajistit vhodnou skladbu krmných dávek dojnic; - řádně vybilancovat krmné dávky; - vyloučit z krmných dávek dieteticky nevhodná krmiva; - dodržovat zoohygienické zásady získávání mléka; - udržovat dojící techniku v požadovaném technickém a hygienickém stavu (pravidelný servis a údržba); - dbát o účinné a včasné chlazení mléka; - pravidelné efektivní čištění a dezinfekce dojící a chladičské techniky a úchovných tanků; - udržovat dobrý zdravotní stav dojnic; - vylučovat mléko léčených dojnic; - zásady správné praxe předávat pracovníkům prvovýroby mléka.

Obr. 7 Dynamika vývoje průměrné dojivosti (kg) za normovanou laktaci v KU v ČR (r = 0,97; P < 0,001; 62 roků; HANUŠ et al., 2019).

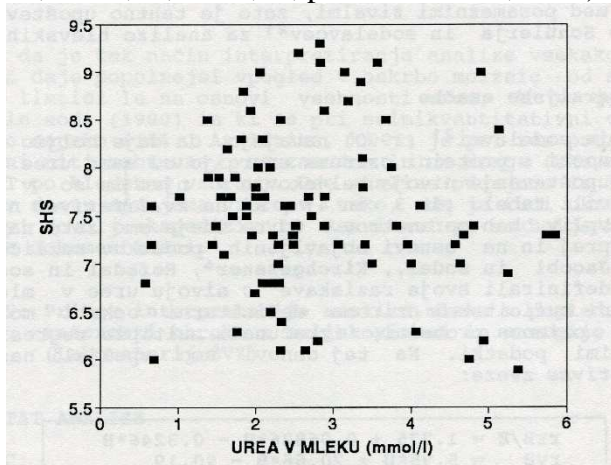


Poměrně zajímavá studie se uskutečnila ve Slovinsku (PEN et al., 1994 a PEN, 1995) na příčiny zvýšených hodnot TKM v čerstvém mléce v letním období. Nebyl nalezen důvod v případně nehygienických podmínkách. Jednalo se zřejmě o nevyvážené diety dojnic při přebytku energie v krmných dávkách (Obr. 8 až 14), kdy mléčná močovina se neukázala jako vlivný faktor. Je doloženo, že ani vzorky s vysokou hodnotou TKM nebyly zatíženy zvýšenými celkovými počty mikroorganismů (66,7 % vzorků do $100 \cdot 10^3 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$), kdy se tedy jednalo o analýzu původní (primární) TKM. Také byla představena metoda interpretace výskytu zvýšené hodnoty TKM (Tab. 1).

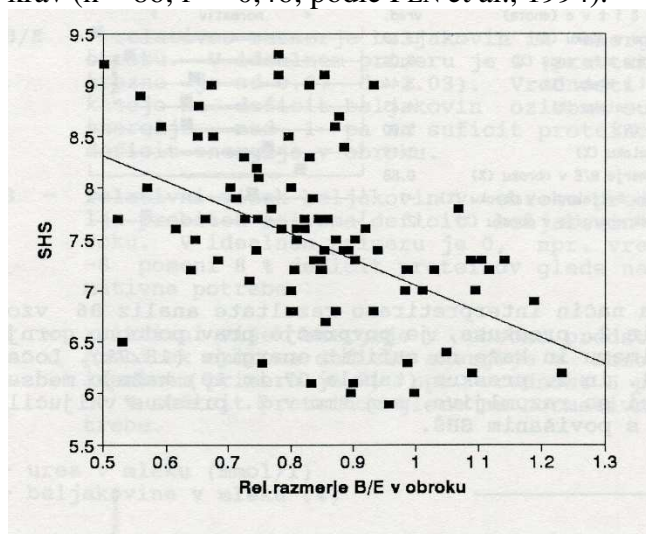
Obr. 8 Korelační závislost TKM ($\text{SHS} = \text{°SH}$) na obsahu bílkovin v syrovém kravském mléce ($n = 86$; $r = 0,48$; $P < 0,05$; podle PEN et al., 1994).



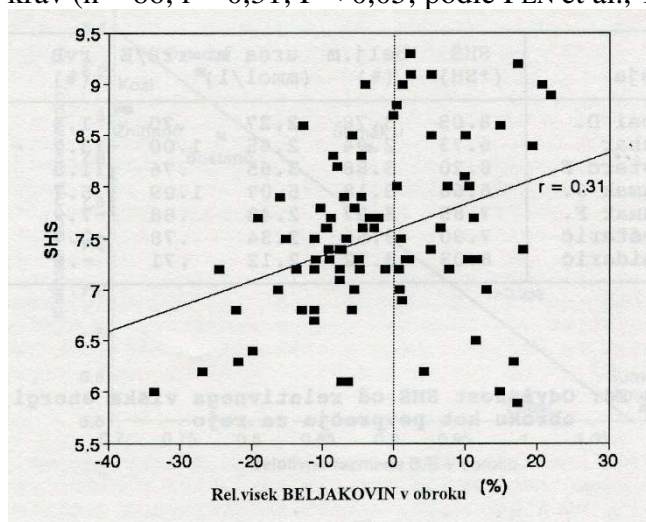
Obr. 9 Korelační nezávislost TKM ($\text{SHS} = \text{°SH}$) na obsahu močoviny v kravském mléce ($n = 86$; $r = -0,07$; $P > 0,05$; podle PEN et al., 1994).



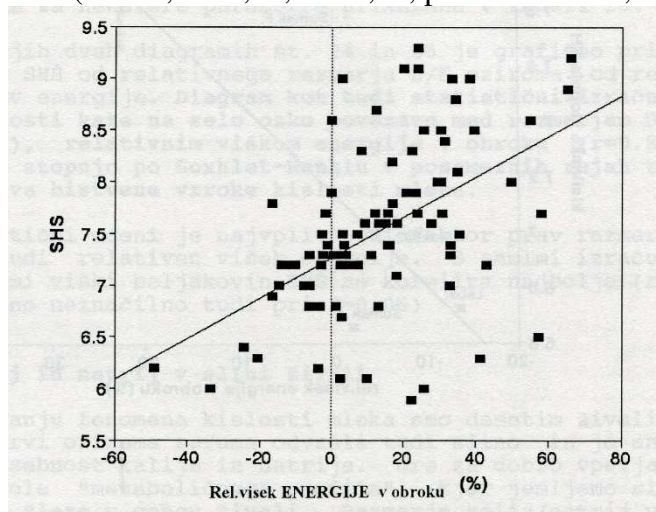
Obr. 10 Korelační závislost TKM (SHS = °SH) na poměru bílkoviny/energie v krmné dávce krav (n = 86; r = -0,46; podle PEN et al., 1994).



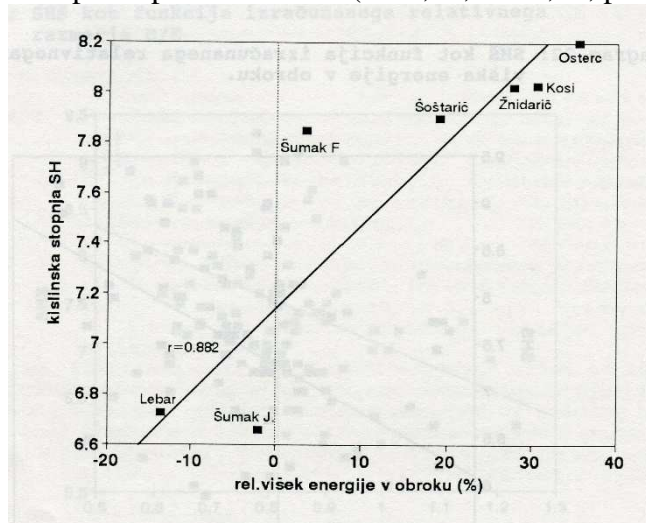
Obr. 11 Korelační závislost TKM (SHS = °SH) na relativním obsahu bílkovin v krmné dávce krav (n = 86; r = 0,31; P < 0,05; podle PEN et al., 1994).



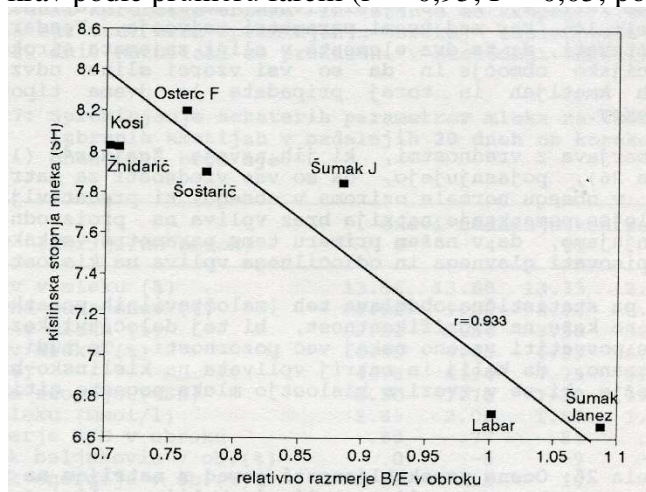
Obr. 12 Korelační závislost TKM (SHS = °SH) na relativním obsahu energie v krmné dávce krav (n = 86; r = 0,49; P < 0,05; podle PEN et al., 1994).



Obr. 13 Korelační závislost TKM (SHS = °SH) na relativním obsahu energie v krmné dávce krav podle průměrů farem ($r = 0,88$; $P < 0,05$; podle PEN et al., 1994).



Obr. 14 Korelační závislost TKM (SHS = °SH) na poměru bílkoviny/energie v krmné dávce krav podle průměrů farem ($r = -0,93$; $P < 0,05$; podle PEN et al., 1994).



Tab. 1 Interpretace výskytu zvýšené hodnoty primární TKM na případu jedné farmy (podle PEN et al., 1994).

d o l o č i t v e (enota)	vred.	< normativ >
suha snov v mleku (%)	13.49	[]
brezmastna suha snov (%)	9.04	[]
proteini v mleku (%)	3.44	[]
maščoba v mleku (%)	4.45	[]
laktoza (%)	5.00	[]
urea v mleku (%)	3.19	[]
rel razmerje B/E v obroku (%)	0.88	[]
rel.višek beljakovin v obroku (%)	-1	[]
rel.višek energie v obroku (%)	12	[]

(obsah sušiny v mléce; obsah sušiny tukuprosté; obsah bílkovin v mléce; obsah tuku v mléce; obsah laktózy; koncentrace močoviny v mléce; poměr bílkoviny/energie v krmivu; relativní podíl bílkovin v krmivu; relativní podíl energie v krmivu)

V dřívější studii (HANUŠ a PITNEROVÁ, 1987) chovatelských faktorů v ČR byl prokázán celkově nevýznamný vliv sezóny s maximálními hodnotami v dubnu, květnu a listopadu a významný vliv plemene ($P < 0,01$) na TKM ($n = 426$; Červenostřakaté plemeno = 6,9 a Černostrakaté plemeno = 6,72 °SH). Souběžně (BRAUNER a HANUŠ, 1985) bylo zjištěno, že rostoucí TKM zkracovala významně ($P < 0,01$) enzymatickou syřitelnost (čas koagulace laktoproteinů).

FISCHER et al. (2011; cit. MACHADO et al., 2017) v Brazílii se věnovali řešení problému výskytu alkoholově (tepelně) nestabilních mlék, která nebyla identifikována jako kyselá. Pro 1 583 vzorků kravského mléka ze tří roků uvedli průměrnou TKM 15,85 °D ($v_x = 8,6 \%$) s alkoholovou stabilitou 74,75 %. Při rozdělení souboru (bazénové vzorky syrového mléka z 50 farem) podle alkoholové stability (≤ 72 , $72 - 78$, a > 78 °GL) pak byly rozdíly v TKM významné ($P < 0,0001$): 16,2, 15,7 a 15,5 °D. Uvedené dále prokazuje význam znalosti hodnot TKM pro mlékárenské technologie. Nicméně, MOLINA et al. (2001) neuvedli stejnou podporu tomuto názoru, neboť v korelační matici neuvedli významný vztah TKM ani k alkoholovému testu ($r = 0,14$), ani k termostabilitě mléka ($r = 0,03$), ale pouze k aktivní kyselosti pH ($r = -0,47$, $P < 0,05$). Pak hodnotili (FISCHER et al., 2011) výsledky různých experimentů s ovlivněním výživy krav, kdy mléka kyselejší nebyla vždy více citlivá k alkoholovému testu, jak by se očekávalo, dokonce častěji i naopak. Při snížení živin v krmné dávce oproti normované na 50 % (v podstatě hladovějící zvířata) uvedli FISCHER et al. (2011, citace FRUSCALSO, 2007) TKM 15,03 $<$ 17,31 °D ($P = 0,0308$), pravděpodobně zejména kvůli souběžně silnější redukci obsahu kaseinu 2,07 $<$ 2,21 %, přičemž denní produkce mléka byla odpovídajícím způsobem téměř poloviční 10,11 $<$ 19,69 kg/den a citlivost vůči alkoholu zvýšená 68,89 $<$ 77,41 % a redukován byl i obsah anhydridu laktózy 4,51 $<$ 4,67 %. V jiném sledování (FISCHER et al., 2011, cit. ZANELA et al., 2006) živinově normované krmné dávky a krmení krav pouze pící (objemnou složkou), byla TKM snížena 18,23 $<$ 19,56 °D ($P = 0,0006$) a byl souběžně redukován obsah hrubých bílkovin 3,06 $<$ 3,4 % ($P = 0,0001$) i obsah laktózy 4,52 $<$ 4,67 % ($P = 0,0007$) při zvýšené citlivosti vůči alkoholu (76 %) 2,13 $>$ 1,47 ($P = 0,0434$), vyšší koncentraci močoviny v mléce 23,93 $>$ 12,65 mg/100ml ($P = 0,001$) a vyšším PSB 480 $>$ 319 $10^3 \times \text{ml}^{-1}$. Zajímavý byl výsledek při konzumaci krav u aniontové diety (FISCHER et al., 2011). TKM byla nevýznamně snížena 16,77 $<$ 17,36 °D při snížené odolnosti vůči alkoholu 74,45 $<$ 77,28 % ($P = 0,0175$), poklesu laktózy 4,2 $<$ 4,41 % ($P = 0,0059$) a hrubých bílkovin v mléce 3,60 $<$ 3,79 % ($P = 0,0302$). Vůbec se ukázalo, že v Brazílii a Chile byly TKM, alkoholová stabilita a termostabilita mléka v posledních letech zvláště intenzivně studované technologické vlastnosti mléka (UNAM), zřejmě v těsné souvislosti s tamním progresivním rozvojem průmyslového zpracování mléka a souběžným výskytem případných technologických problémů. ROSA et al. (2020) v uvedené souvislosti popsali schéma aktuální analytické metody identifikace tzv. UNAM bazénových vzorků, tedy nestabilních (pozitivní etanolový test 72 °GI a negativní test varem) nekyselých vzorků kravského mléka ($\text{pH} \geq 6,6$ nebo $\text{TKM} \leq 18$ °D). Zabývali se dále také vysvětlením možných faktorů zmíněného efektu.

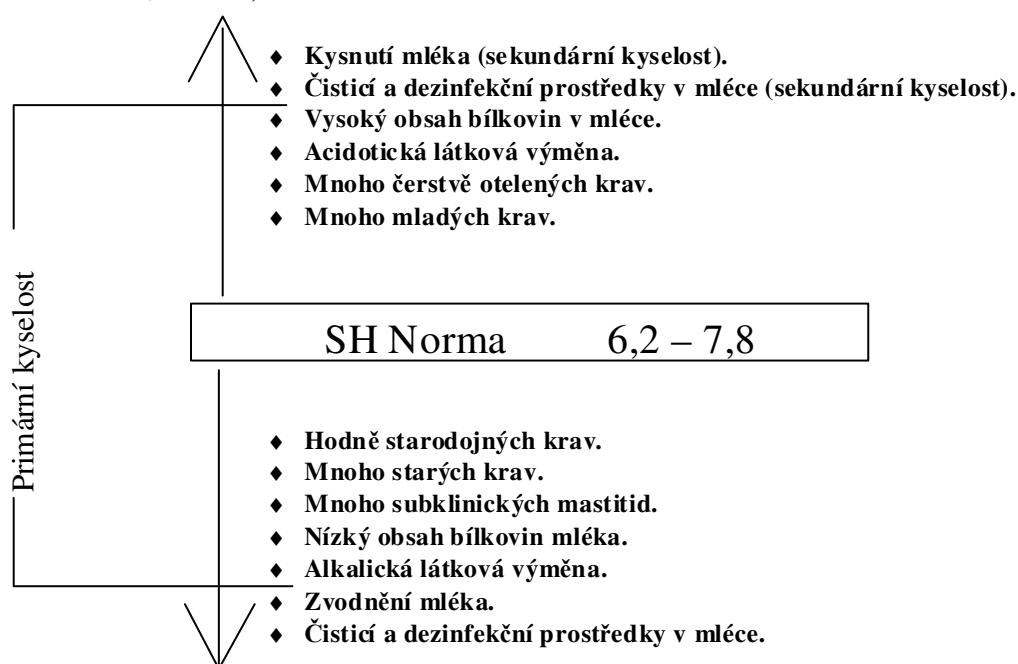
Vztahy TKM ke zdravotnímu stavu krav v rámci patologické variability TKM

FAMIGLI-BERGAMINI (1987; Tab. 2) naznačil výrazný pokles TKM při alkalóze a mastitidě dojníc, mírný vzrůst při ketóze a výrazný vzrůst při acidóze krav. THIEME et al. (1983 b; Obr. 15) pak schematicky shrnuli hlavní technologické a zdravotní příčiny a faktory neadekvátně zvýšené a snížené hodnoty TKM u dojníc, lišící se od normovaného oboru.

Tab. 2 Vliv některých produkčních onemocnění na složení a vlastnosti mléka (podle FAMIGLI-BERGAMINI, 1987).

Porucha	Produkce	Tuk	Bílkoviny	Kasein	Laktóza	Ketony - aceton	Močovina	Sušina tukuprostá	Somatické buňky	Titrační kyselost
Acidóza	↑↓	↓↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑
Alkalóza	↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↑	↑↑	↓	↑	↓
Ketóza	↓↓	↓↑	↓	↓	↓↓	↑↑	↑	↓	↑	↑
Mastitida	↓	↓↑	↓↑	↓	↓			↓	↑↑	↓
Stres	↓	↓							↑	

Obr. 15 Příčiny odchylek titrační kyselosti (SH) mléka od normy (modifikováno podle THIEME et al., 1983 b).



BESEDA et al. (1990) sledovali vztah vnitřního prostředí vysokoprodukčních dojnic z hlediska 36 ukazatelů metabolického profilu krve, krevního séra, mléka a moči při syndromu snížené TKM. Ukázalo se, po korelační analýze, že při zkrmování deficitní krmné dávky (jak ve stravitelných dusíkatých látkách, tak v škrobových jednotkách, úživný poměr 1 : 7,5), která obsahovala zdravotně závadnou travní senáž s vysokým obsahem amoniaku (232,9 mg/100g) se projevil syndrom snížené TKM s nejnižšími hodnotami 1,9 °SH. Za těchto okolností byla prokázána významná ($P < 0,01$) negativní korelace mezi koncentrací laktózy a pH mléka ($r = -0,91$). Stejně tak JAĐUĐ et al. (1992) sledovali vliv narušených jaterních funkcí u dojnic na snížení TKM. Bylo hodnoceno 23 krav pomocí 23 ukazatelů metabolického profilu v krvi. Významné korelace byly mezi AST (aspartátaminotransferáza) a TKM ($r = -0,79$), AST a pH mléka ($r = 0,62$), AST a obsahem laktózy ($r = -0,69$), AST a koncentrací glukózy ($r = -0,56$), pH krve a mléka ($r = -0,61$) a pH mléka a laktózou ($r = -0,89$). Je zjevné, že na TKM mají vliv acidobázická rovnováha a funkční stav jater. TRÁVNÍČEK et al., (1991) uvedli vliv bazického výlučku (13 vysoceužitkových chovů dojnic červenostrakatého a černostrakatého nížinného

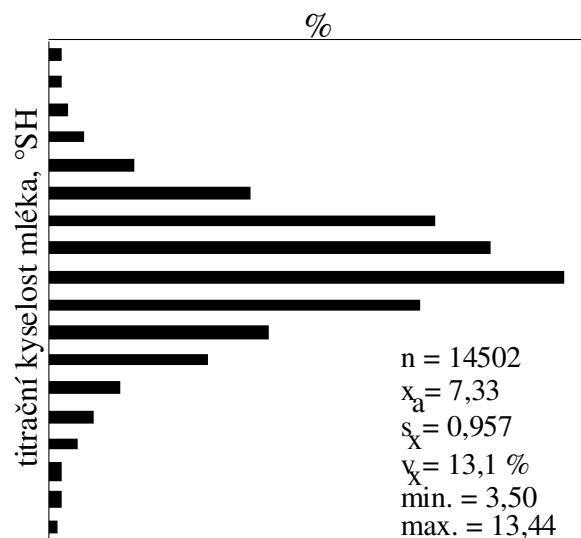
plemene) v moči nad $250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na tendenci k poklesu TKM na průměrnou hodnotu $6,3 \pm 0,6 \text{ }^\circ\text{SH}$ a při výlučku kyselém k nárůstu na $7,8 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{SH}$. Snížení pH krve pod 7,3 bylo spojeno se vzestupem TKM k $7,2 \text{ }^\circ\text{SH}$ a naopak vzestup pH krve nad 7,4 znamenal pokles TKM k $6,4 \text{ }^\circ\text{SH}$. Pokles TKM pod $6,2 \text{ }^\circ\text{SH}$ byl nejvýrazněji spojen se snížením obsahu bílkovin mléka a vzestupem močoviny v mléce. POĽAHÁR et al. (1991) hodnotili na 30 individuálních vzorcích mléka krav ve dvou skupinách ($n = 15$ a 15) s normální TKM $6,2$ až $8 \text{ }^\circ\text{SH}$ a sníženou TKM pod $6,2 \text{ }^\circ\text{SH}$ změny ostatních mlékařských ukazatelů. Nejvýraznější rozdíly byly u pH ($6,55$ a $6,72$) a obsahu laktózy ($4,86$ a $4,28 \%$) a fosforu ($15,01$ a $14,19 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), zatímco nejméně výrazné u močoviny ($8,54$ a $8,53 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a hrubých bílkovin ($3,28$ a $3,33 \%$).

Primární TKM v individuálních vzorcích z první třetiny laktace ($n = 662$; $7,34 \pm 0,83 \text{ }^\circ\text{SH}$; $v_x = 11,3 \%$) českého strakatého plemene a černostrakatého nížinného plemene (HANUŠ et al., 1992 c) byla významně korelována ($P < 0,01$) k řadě mlékařských ukazatelů, z nichž mnohé mají i zjevný zdravotní charakter ve smyslu indikace poruch sekrece mléka (klinických i subklinických mastitid), tzn. k: - denní doživosti $-0,24$; - obsahu tuku $0,27$; - obsahu hrubých bílkovin $0,43$; - obsahu monohydrátu laktózy $0,25$; - obsahu tukuprosté sušiny $0,23$; - koncentrací chloridů $-0,45$; - aktivní kyselosti pH $-0,29$; - chlorcukrovému číslu $-0,46$; - elektrické konduktivitě $-0,43$; - hodnotě mastitis testu $-0,21$. Nedávný experiment (SEYDLOVÁ et al., 2020, cit. HANUŠ et al., 2020) prokázal významný ($P < 0,05$) vliv současně vzrůstajícího rizika pro mléčné farmy, tzn. nebakteriálních původců mastitid (konkrétně *Prototheca*), na TKM, která byla u kontaminovaných dojnic ve stádě $7,14$ oproti negativním $7,9 \text{ }^\circ\text{SH}$, kdy současně pozitivní krávy měly v mléce zřetelně nižší obsah tuku, bílkovin, kaseinu, laktózy, sušiny tukuprosté i sušiny celkové při počtu somatických buněk (PSB) 777 versus $114 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ (geometrický průměr; $P < 0,001$). Korelační koeficient počtu *Prototheca* v mléce k PSB pak činil $0,81$ ($P < 0,01$).

Metody hodnocení a stanovení TKM

U hodnocení mléčných ukazatelů je třeba brát ohledy na charakter frekvenční distribuce dat v souborech a případnou potřebu matematických transformací pro statistické hodnocení. Např. celkové počty mikroorganismů, počty somatických buněk (PSB = SCC), ketonové látky (aceton, betahydroxybutyrát) nebo volné mastné kyseliny, podle typu vzorků (čtvrťové, individuální, bazénové), často vykazují v datových souborech odchylky od normální frekvenční distribuce dat. Tyto hodnoty se proto nezdají, např. ve statistických výpočtech souborových charakteristik, logaritmičky, ale i jinak (Box-Coxova transformace, druhá mocnina nebo odmocnina, lineární score SCC (SCS)), transformují, jak bylo dříve doloženo (HANUŠ et al., 2007 b, 2009 b; JANŮ et al., 2007 a). U hodnot primární TKM bazénových vzorků byla na velkém datovém souboru (HANUŠ et al., 2001; $n = 14\ 502$; aritmetický průměr = $7,33 \text{ }^\circ\text{SH}$; směrodatná odchylka $\pm 0,957 \text{ }^\circ\text{SH}$; variační koeficient = $13,1 \%$), testováním šikmosti a špičatosti, prokázána jen minimální odchylka od normální frekvenční distribuce dat (Obr. 16), což při statistickém hodnocení umožňuje korektně pracovat s původními daty, kdy aritmetický průměr, geometrický průměr a medián vykazují vzájemně blízké hodnoty a střední hodnota typu aritmetického průměru je relevantním představitelem (zástupcem, charakteristikou) souboru. Takový stav však, v daném případě, může platit pouze pro čerstvé a dobře ošetřené a skladované mléko, tedy pro přirozenou titrační kyselost. Ziskem titrační kyselosti případně nehygienickým uložením mléka by tento vybalancovaný, téměř ideální, stav jistě došel výrazné úhony a podle podmínek skladování dosáhl jistě jiné distribuce dat, nejspíš lognormální, jak je obvykle charakteristické pro horšící se i jiné hygienické a zdravotní ukazatele mléka.

Obr. 16 Vizuální analýza datových souborů (histogram) parametrů individuálních vzorků mléka – pro TKM je na první pohled zřejmá forma frekvenční distribuce dat blízká normálnímu rozdělení, tzv. Gaussově křivce.



Původní (titrační, klasická) analytická metoda stanovení TKM (ČSN 57 0530) byla již dříve podrobena diskusi, kde O'CONNOR (1970) uvedl, že metoda může poskytnout odchylky a falešné výsledky v případě zvýšeného množství pufrujících substancí v mléce a THIEME et al. (1983 a) uvedli také podíl dalších substancí na výsledku TKM, které mohou uvolnit iont H^+ . Uvedené názory logicky souvisí s principy skluzové titrační reakce (Obr. 1 (šedá plocha) a 2) a názorem KRATOCHVÍLA (1984). Ten se dále přiklání k názoru, že hodnota pH lépe vystihuje jakost mléka a doporučuje proto využít pH při sporných situacích mezi dodavatelem a odběratelem mléka v otázce TKM, neboť právě může vyšší obsah bílkovin také přispět ke zvýšené hodnotě TKM, podobně jako vysvětlují i PEN et al. (1994) a PEN (1995).

Ovšem, je třeba zmínit, že v principu stejná titrační metoda má řadu modifikací, jak se provádí a vyjadřuje (Tab. 3; Wikipedie (anonymní zdroj); PIJANOWSKI, 1977; KLÍČNÍK, 1978; ČSN 57 0530; ČSN 57 0529), které jsou používány v různých zemích a mezi nimi proto při srovnávání musí být použity relevantní korekční faktory (přepočtové koeficienty).

Celkově se světově a historicky nevyskytlo mnoho metodických pokusů nahradit referenční (klasické a původní, ČSN 57 0530) stanovení TKM jinými, nepřímými (rutinními), rychlými, analytickými metodami. Metodické provedení zůstávalo spíše dlouhodobě klasické, na rozdíl od metodického vývoje stanovení jiných mléčných ukazatelů, např. obsahu tuku, bílkovin nebo počtu somatických buněk. V daném ohledu např. DOI et al. (1991) se zabývali vývojem rychlé metody stanovení TKM přes měření pH a balancování, resp. eliminaci efektu pufrací kapacity mléka přidávkem alkálie tak, aby získali lineární odezvu k výsledkům SH a urychlili tuto pracnější klasickou metodu přístrojovým odečtem. pH měřené po přidávku alkalického roztoku (8 ml 0,1 N NaOH) do mléka (50 ml) nazvali posunutým pH. Lineární regrese mezi TKM SH a posunutým pH byla přijatelná. To opravňuje použití metody posunutého pH k rychlému odhadu hodnoty TKM. V podstatě se jedná o umělé, jednoduchý, rychlý, metodický způsob vyvedení měření bodu TKM do oblasti vně oboru pufrací kapacity konkrétního mléka (Obr. 2), který umožní potenciometrický odhad TKM.

Tab. 3 Přehled užívaných metod pro analýzu a vyjádření titrační kyselosti mléka (anonymní zdroj).

Metoda	<u>Soxhlet - Henkel</u>	<u>Thömer</u>	<u>Domic</u>	Britský standard	USA
Množství vzorku	25 ml	10 ml	10 ml	10 ml	20 ml nebo 20 g
Zředění vzorku	žádné	2 : 1	žádné	žádné	2 : 1
Indikátor fenolftalein	1 ml, 2 % v alkoholu	5 kapek, 5 % v alkoholu	2 kapky, 2 % v alkoholu	1 ml, 0,5 % v 50 % alkoholu	2 ml, 1 % v alkoholu
Koncentrace odměrného roztoku NaOH	0,25	0,10	0,11	0,11	0,1
Konec titrace	slabě růžové odpovídající CoSO ₄	slabě růžové	slabě růžové	bledě růžové odpovídající narůžovělému standardu	bledě růžové
Vyjádření výsledku	ml NaOH na 100 ml (dříve °SH)	T°	D°	g kyseliny mléčné na 100 ml	% kyseliny mléčné nebo ml NaOH na 100 g
Používáno v	ČR, SR, SRN	Rusko, Francie	Nizozemí	Velká Británie	USA

Nicméně, pro analytické účely technologických laboratoří mlékáren může úspěšně posloužit k semikvantitativním odhadům TKM proužkový, indikační Laktotest (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR). Tímto testem lze rychle, podle zón barevné reakce, odhadnout TKM (°SH), aktivní kyselost pH a % kyseliny mléčné. I když na první pohled není takový postup pravděpodobný právě pro TKM nebo dokonce pH, k rychlým odhadům složení a kvality mléka a mléčných výrobků lze využít také infračervenou spektroskopii v blízké oblasti v modifikaci s Fourierovou transformací a reflektanční aplikací (NIR-FT; např. JANKOVSKÁ (2004), RŮŽIČKOVÁ (2007), MLČEK (2008) nebo KOZELKOVÁ (2012)) na případně rotující misce s možností použití integrační sféry (Antaris, Thermo Nicolet, USA). Pro odhad TKM byla tedy také použita reflektanční NIR-FT (near infrared spectroscopy, spektroskopie v oblasti blízké infračervenému oboru), kdy byly zmíněny (JANKOVSKÁ, 2004; RŮŽIČKOVÁ, 2007) korelační koeficienty kalibrace 0,914 až 0,978 (směrodatné odchylky 0,27 a 0,166) a validace kalibrace 0,93 (0,297), což lze označit, při kalibračním a predikčním variačním koeficientu 2,41 a 4,31 %, za prakticky aplikovatelný model nepřímého měření. Naopak u pH byl získán benevolentnější, i když metodicky pro praktické analýzy stále přijatelný, vztah pro korelační koeficienty kalibrace a validace kalibrace 0,669 až 0,891 (0,071 a 0,05) a 0,829 (0,063) při koeficientech 0,75 a 0,93 %.

Z hlediska moderní, celkové, nepřímé, rutinní analýzy mléka (látkového složení), zejména metodou infračervené spektroskopie ve středové oblasti (MIR) a v technickém provedení s optickými filtry, je TKM velmi důležitým ukazatelem kvality vzorků mléka a tím věrohodnosti výsledků analýz (HANUŠ et al., 1992 a, b). Měly by být měřeny pouze vzorky řádně uchované (ošetřené chladově nebo chemickou konzervací) a včas, pouze s primární hodnotou TKM. V opačném případě, při vzrůstu sekundární TKM takových vzorků dochází ke zkreslení výsledků složení mléka, kdy některé složky, např. obsah hrubých bílkovin mohou být neadekvátně (neodpovídající realitě) navýšené, neboť nové metabolity z mikrobiální hydrolyzy složek mohou interferovat do selektivních vlnových délek měření. Např. při částečném rozkladu laktózy a koncentraci kyseliny mléčné 0,5 % (zvýšené sekundární TKM) může být navýšen obsah tuku a bílkovin pouze domněle o 0,21 a 0,26 % a naznačen rychlejší úbytek monohydrátu laktózy o -0,27 %. Takový degradační, resp. destrukční, proces tak logicky znehodnocuje mlékařské analytické výsledky. Výsledky dokazující zdánlivý vzrůst obsahu tuku a bílkovin při infračervené spektroskopii mléka, provázející fermentaci laktózy a tím i

úbytek obsahu laktózy ve stárnoucích vzorcích mléka, jsou v souladu se zjištěními dalších prací (SJAUNJA, 1984 a, b; BIGGS et al., 1987).

Využití infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT) v mlékařství

Infračervená spektroskopie hraje v mlékařství důležitou analytickou roli. Je dlouhodobě využívána k rutinním rozborům různých typů vzorků mléka a mléčných výrobků a její výsledky následně k technologickým a hospodářským účelům. Přístroje (mléčné analyzátoři) jsou provedeny v různých variantách různých výrobců v poloautomatické nebo automatické verzi a s průtočným systémem, s výkonem od 30 do 500 vzorků za hodinu. Infračervená spektroskopie ve středové oblasti v technologickém provedení s optickými filtry (MIR), jako nepřímá metoda, je používána obvykle ke stanovení obsahů tuku, bílkovin, laktózy, sušiny tukuprosté, sušiny celkové a vody v mléce a mléčných výrobcích (BIGGS, 1978; KERKHOFF MOGOT et al., 1982; BIGGS et al., 1984, 1987; SJAUNJA, 1984 a, b; SJAUNJA et al., 1984; SJAUNJA a ANDERSSON, 1985; GRAPPIN, 1987 a, b, 1993; VINES et al., 1986; VOORT VAN DE et al., 1987; VALENBERG VAN, 1990; HILL et al., 1991; HANUŠ et al., 1992 a, b, 2007 c, 2008 a, 2014 b; KALA et al., 2018, 2019).

S nástupem analytické technologie MIR-FT se skenováním (pomocí Michelsonova interferometru) a analýzou celého infraspetra a vyhodnocením signálu prostřednictvím Fourierových transformací bylo toto spektrum mlékařských analýz podstatně rozšířeno (LEFIER et al., 1996; FOSS, 1999, 2001, 2004 a, b; HANSEN, 1999; HEUER et al., 2001; DELTA INSTRUMENTS, 2006; BARBANO a LYNCH, 2006; BIJGAART VAN DEN, 2006; BROUTIN, 2006; ROOS DE et al., 2007; CECA LAIT, 2008; HANUŠ et al., 2008 b, 2009 a, c, 2010, 2011 a, 2013, 2014 a, b; HERING et al., 2008; KNEGSEL VAN et al., 2010; BENTLEY INSTRUMENTS, 2012; ŘÍHA et al., 2013; BELAY et al., 2017; COSTA et al., 2017; BRITO et al., 2020; DUARTE et al., 2020; PEREIRA et al., 2020; PORTNOY et al. 2021; WALLESER et al., 2021):

- kasein; - močovina; - ketonové látky (aceton a betahydroxybutyrát); - kyselina citronová; - volné mastné kyseliny; - bod mrznutí mléka (v kombinaci s elektrickou konduktivitou); - skupiny (technologické, zdravotní, podle nasycenosti, podle délky uhlíkatého řetězce) mastných kyselin a hlavní mastné kyseliny v mléčném tuku (SOYEURT et al., 2006 a, b, 2011; COPPA et al., 2014; WOJCIECHOWSKI a BARBANO, 2016; SAMKOVÁ et al., 2019; 2020; ROVERE et al., 2021). Pro zmíněnou modifikaci MIR-FT jsou zkoumány a validovány další možnosti analýz (efektivních kalibrací):

- detailnější skladba mléčných bílkovin; - laktoferin v mléce; - kyselina orotová v mléce; - mléčné metabolity; - metabolický stav krav; detekce ketózy, hyperketonemie a energetického deficitu krav; - včasná detekce subklinické produkční poruchy subakutní bacherové acidózy (SARA); - zisk včasného varování před mastitidou; - odhady složení krmné dávky, zlepšení příjmu krmiv dojnicemi, živé hmotnosti a tělesného kondičního skóre dojnic; odhad produkce tepla krávou; - metanové emise krav; - zdraví podporující index; - nepřímá zdravotní data dojnic; - predikce ukazatelů plodnosti krav; - biomarkery a laminitida; - sumární genetické ukazatele; - data pro management stáda; - technologické vlastnosti mléka; - falšování mléka; - posouzení ustajovací modifikace a welfare zvířat atd.: (THOMAS, 2008; LOPEZ-VILLALOBOS et al., 2009; SOYEURT et al., 2012; DE MARCHI et al., 2013; GENGLER et al., 2013, 2017, 2018; VOSMAN et al., 2015; BASTIN et al., 2016; BONFATTI et al., 2016; MCPARLAND and BERRY, 2016; VANLIERDE et al., 2016; COITINHO et al., 2017; KLAFENBÖCK et al., 2017; NARAYANA et al., 2017; DÓREA et al., 2018; BACH et al., 2019; DELHEZ et al., 2019; FRANZOI et al., 2019, 2023; GRELET et al., 2019; MINEUR et al., 2019; MULLINS et al., 2019; SOYEURT et al., 2019; ZAALBERG et al., 2019; DU et al., 2020, 2021; MESGARAN et al., 2020; TIPLADY et al., 2020;

BAHADI et al., 2021; BRAND et al., 2021; DALE et al., 2021 a, b; HO et al., 2021; HOENEN et al., 2021; KUNES et al., 2021; MENSCHING et al., 2021; PEGOLO et al., 2021; PRALLE et al., 2021; SPIESS et al., 2021; TEDDE et al., 2021; ZHANG et al., 2021; MACEDO MOTA et al., 2023).

Potřebné validace dalších efektivních kalibrací z infraspекter, s prakticky použitelnými výsledky v mlékařství, jsou v procesu vývoje. Na jedné straně se zdá, že další aplikační možnosti MIR-FT v mlékařství jsou stále ještě široké. Na druhé straně, otázkou je jen, až do jaké míry lze považovat všechny možné odhady a predikce nejrůznějších, komplexních, chemických, fyzikálních a biologických (popřípadě zdravotních a technologických) vlastností mléka a krav výsledkově za věrohodné a prakticky účelné, tedy efektivní? Uvedené je významné pro analytické spektrum využití nepřímé metody infračervené spektroskopie v mlékařství. To je předmětem současného výzkumu a vývoje. Kalibrace MIR-FT pro možnost měření TKM je méně předpokládanou, resp. očekávanou, ale také možnou variantou, za předpokladu dodržení technických podmínek průtočné analýzy (spolehlivá tekutost vzorku). Tuto možnost pro MIR-FT připouštějí také DE MARCHI et al. (2009, 2014), když zdůrazňují význam TKM pro sýrařství a parametry kalibrace MIR-FT byly 0,66 pro validaci korelace a RMSE_{cv} 0,25 °SH (50 ml mléka). COLINET et al. (2013) dosáhli pro TKM pomocí MIR-FT ještě poněkud efektivnější model s validací korelace 0,9.

Současné podmínky mlékařského prostředí pro TKM

Vzdor historickému útlumu ve vývoji technologických požadavků na stanovení TKM, v současném systému sofistikované kontroly jakosti syrového mléka prostřednictvím sledování dynamiky hodnot mnoha mlékařských ukazatelů, čas od času vznikne aktuální profesní potřeba diskuse na toto téma a požadavek na případné validační práce, postupy a analýzy (zahrnutí TKM do algoritmových postupů dynamické kontroly kvality syrového bazénového mléka (HANUŠ et al., 2006)), jako např. v případě vyžádané odborné konzultace se Svazem výrobců mléka a.s., Šumperk, 2012 (záznam - příloha č. 1 CM 40 2023). I tak lze doložit, že téma TKM je i dnes v mlékařství aktuální.

Protože sledování (analýzy) a vyhodnocování kvality syrového mléka slouží, ve značné míře, vedle účelů proplácení mléka, také zdravotní ochraně spotřebitele, splňuje takový úkol důležitou společenskou zakázku (BAUMGARTNER, 2000; AFEMA - Arbeitsgruppe zur Förderung von Eutergesundheit und Milchhygiene in den Alpenländern, Pracovní skupina pro podporu zdraví mléčné žlázy a hygieny mléka v alpských zemích). Bezpečnost a kvalita mléčného potravinového řetězce jsou důležitými aspekty ochrany veřejného zdraví. Současná doba klade velmi vysoké nároky na kvalitu syrového kravského mléka a následně i mléčných potravinových produktů, v EU stále zdaleka nejvyšší v porovnání ke světovému vývoji. Mléčný potravinový řetězec je nejlépe kvalitativně kontrolovaným ze všech ostatních a proto utrpěl v porovnání k dalším relativně méně potravinových skandálů v nedávné historii, kdy je tato otázka zvláště citlivě společensky vnímána i kontrolována. Je to dáno faktory jeho kontroly, tedy počtem a frekvencí stále opakovaně vyšetřovaných kvalitativních ukazatelů, z nichž některé mají vedle fyzikálního nebo chemického, také biologický charakter (Tab. 4).

Tab. 4 Odůvodnění skutečnosti, že výrobní a zpracovatelský mléčný potravinový řetězec je tím pravděpodobně nejbezpečnějším z těch, které připadají v úvahu pro srovnání ve vyspělých zemích, a je také zřejmě nejvíce kontrolovaným potravinovým řetězcem vůbec.

Zabezpečení kvality mléka lze hodnotit pozitivně ve smyslu:
- širokého spektra a relativně vysokého počtu vyšetřovaných hygienických (mikrobiologických), složkových (chemických), fyzikálních a technologických mléčných parametrů a vlastností;
- pravidelnosti a relativně vysoké frekvence zmíněných rutinních vyšetření syrového mléka;
- převážně biologického a biochemického charakteru těchto vyšetření, kde principem je posoudit bezpečnost kontrolovaného materiálu pro konzumenty (např. sledování reziduí inhibičních látek a eliminace takového mléka z potravního řetězce s předpokladem, že substance schopná poškodit mikrobiální růst může být potenciálně riziková i pro vývojově vyšší živočichy - konzumenty).

Přes všechny uvedené historické skutečnosti technologického a analytického vývoje v mlékařství je však analyticky možnost rychlého stanovení TKM výhodná. Současné globální, provozní podmínky mlékařského prostředí ukázaly na potřebu vývoje rychlého stanovení hodnoty TKM pro kontrolu kvality mléka dodávaného k mlékárenskému zpracování v oblastech se specifickými, těžšími geografickými, klimatickými a technologickými podmínkami, ale také pro flexibilní, metodickou možnost rychlé kontroly kvality vzorků mléka v relevantních mlékařských experimentech.

Analytické laboratoře obecně, tedy i mléčné, zejména, jsou-li akreditovány, musejí své metodické postupy obhajovat u odborného auditu zpracovaným systémem zabezpečení kvality výsledků analýz, jehož součástí jsou standardní operační postupy, kontrolní mechanismy (proficiency testing) a validace metodických postupů. Použité postupy tak musí být přesně popsány a validovány prostřednictvím výsledků účelově provedených testů se statistickým vyhodnocením a také příslušným odhadem nejistoty výsledků měření. Proto dává smysl vyhodnotit a popsat efektivitu predikce hodnot titrační kyselosti syrového mléka prostřednictvím rychlé nepřímé analytické metody MIR-FT.

2) Cíl metodiky vývoje a validace postupu pro rutinní stanovení titrační kyselosti mléka

Cílem metodiky je vyvinout efektivní kalibračně-predikční model pro stanovení titrační kyselosti syrového mléka (TKM) nepřímou metodou infračervené spektroskopie ve středové oblasti pro možnost rychlé kontroly kvality dodávaného mléka ke zpracování ve specifických podmínkách a regionech.

3) Vlastní metodika pro rutinní stanovení titrační kyselosti mléka v kontrole kvality mléka

Materiál a metody

Validace aktuální, přirozené dynamiky TKM podle teploty a času pro nastavení parametrů přípravy referenční (kalibrační) sady vzorků

I) Kravské mléko z více farem bylo odebíráno z bazénového syrového mléka po ranním dojení a vychlazení na teplotu 6 ± 1 °C. Transport vzorků probíhal v termoboxech při teplotě $6,5 \pm 1$ °C. Mléko bylo ihned po transportu do laboratoře homogenizováno a rozplněno do sterilních vzorkovnic o objemu 100 ml. Vzorkovnice byly poté uloženy do termostatů o testovaných teplotách 8, 11, 14, 17, 20 a 25 °C tak, že pro každý čas expozice (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 a 4 hodiny) byl sledován vždy samostatný vzorek mléka. Byly stanoveny základní fyzikálně-chemické parametry kravského mléka SH (TKM) a pH.

Tvorba reprezentativní, základní kalibrační vzorkové sady

II) Byly opakovaně odebrány bazénové vzorky syrového kravského mléka ($n = 214$) z vazných, ale zejména volných (95 %) stájí ($n = 36$), v oblastech kolem Ústí nad Orlicí, Žamberka, Jeseníku, Šumperka, Olomouce a Přerova, tedy v podhorské a nížinné (Haná) oblasti. Vzorkování proběhlo v období od května 2021 do dubna 2022, čímž bylo pokryto období celého roku. Soubor je tedy adjustován pro eliminaci vlivu ročního období, kdy měsíčně bylo odebíráno cca 17 vzorků. Celkově tak soubor zahrnoval cca 5 000 dojnic s poměrně vyrovnaným zastoupením dojených plemen Holštýn (62 %) a České strakaté (38 %) pro poměry v ČR. Počet vzorků byl, podle získaných výsledků kvalifikovaným odhadem, redukován o možné extrémní hodnoty a tak bylo v dalším postupu hodnoceno 207 vzorků původního mléka. Tím byla pokryta možná, a pro kalibraci analytické techniky potřebná, variabilita TKM, pramenící z četných biologických a technologických zdrojů mlékařské praxe. Vzorky byly přepraveny do laboratoře (VÚM Praha, pracoviště Šumperk) v chladových podmínkách (≤ 6 °C) v termoboxu bez chemické konzervace. Dále byly původní vzorky mléka, v systému oficiální kontroly kvality mléka, bez konzervace nebo konzervovány Heschonovým činidlem a bronopolem (0,03 %), podle účelu analýzy (bod mrznutí mléka, mikrobiologická vyšetření, složky mléka a počet somatických buněk) přepraveny v chladových podmínkách (≤ 6 °C) do akreditované (ČSN EN ISO/IEC 17025) laboratoře rozborů mléka ČMSCH a.s. (LRM) Brno – Tuřany.

Stabilizace a modifikace vzorkové kalibrační sady

I) Vzorek mléka byl po každém testovaném čase (TKM - SH a pH) uložen do chladničky při teplotě 8 ± 1 °C a znovu analyzován po 3 hodinách, poté opět uložen do lednice a znovu analyzován po 24 hodinách (Tab. 5).

II) Každý vzorek byl, po důkladné, ale šetrné homogenizaci, rozdělen do dvou subvzorků. První subvzorek (A) představoval původní mléko s primární TKM a byl uložen v chladničce (≤ 5 °C; cca 18 hodin). Druhý subvzorek (B) byl ponechán po cca 18 hodin do druhého dne při pokojové teplotě (16 – 22 °C), čímž došlo k náhodné modifikaci vzorku podle podmínek a zisku TKM (sekundární; Obr. 1) cestou přirozeného pomnožení přítomné mikroflóry (modifikovaný vzorek). Bylo tak postupováno pro potřeby zisku dostatečného variačního rozpětí kalibrační škály. Vzorky A (původní mléko) byly druhý den analyzovány na TKM a řadu souvisejících

mléčných ukazatelů, především metodou MIR-FT. Vzorky B (modifikované) byly druhý den měřeny na TKM a metodou MIR-FT. To znamená, že pro všechny vzorky, A i B, tak byla zaznamenána spektra MIR-FT.

Tab. 5: Schéma stanovení SH a pH.

č. vzorku	výchozí teplota (°C)	doba uložení a analýz při testovaných teplotách
1	8	0 hodin
2	8	
3	11	4 hodiny při testované teplotě, poté analyzováno a uloženo do chladničky
4	14	
5	17	
6	20	
7	25	
8	8	3 hodiny uložení v lednici, poté analyzováno a znovu uloženo do chladničky
9	11	
10	14	
11	17	
12	20	
13	25	analýza po 24 hodinách uložení v chladničce
14	8	
15	11	
16	14	
17	17	
18	20	
19	25	

Analýzy a analytické postupy pro vzorky mléka

Titrační kyselost (SH) mléka (TKM) byla měřena prostřednictvím titrace 100 ml mléka (Soxhlet-Henkel) za použití alkalického roztoku NaOH 0,25 N v prostředí indikátoru (fenolftalein) podle normy ČSN 57 0530 (ve °SH = ml × 2,5 mmol×l⁻¹).

Infraspektra pro titrační kyselost mléka (TKM) byla stanovena nepřímou metodou infračervené spektroskopie MIR-FT (s Michelsonovým interferometrem a Fourierovou transformací) na přístroji Bentley DairySpec FT (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA).

Vzorky mléka byly analyzovány na složkové ukazatele a některé vlastnosti (T, HB, L, KAS, STP, MOC, VMK, BMM, Tab. 7) na relevantně kalibrovaných (v měsíčních intervalech) a kontrolovaných (proficiency testing) infraanalyzátořech mléka metodou MIR-FT (infračervená spektroskopie ve středové oblasti infračerveného záření za podmínek využití záznamu spektra Michelsonovým interferometrem a vyhodnocení výtěžnosti signálu prostřednictvím Fourierových transformací) podle operačního manuálu. Přitom byly využity přístroje CombiFoss FT+ MilkoScan 7 (Foss Electric, Hilleröd, Denmark). Kombinované rozšířené nejistoty výsledků měření činily: ±2,77 % relativně pro T (±0,101 pro původní jednotky (%)); ±2,59 % relativně pro B (±0,085 % pův.); ±9,3 % pro PSB ≤ 900 10³.ml⁻¹.

Počet somatických buněk (PSB) v mléce byl stanoven pomocí metody průtočné cytometrie (FC; Tab. 7) na fluoro-opto-elektronických čítačích částic CombiFoss FT+ Fossomatic 7 (Foss

Electric, Hillerød, Denmark). Tyto byly pravidelně kalibrovány (CSN EN ISO 13366–1 a CSN EN ISO 13366–2) a kontrolovány (proficiency testing – testování analytické způsobilosti).

Celkový počet mezofilních mikroorganismů (CPM) přímým počítáním bakteriálních buněk průtokovým cytometrem BactoScan FC (Foss Analytical A/S, Hillerød, Dánsko) s následujícím přepočtem relevantní konverzní rovnicí na jednotky KTJ \times ml⁻¹ podle referenční kultivační metody dle ČSN EN ISO 4833-1 (2014).

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

Elektrická vodivost (vodivost; VOD) mléka byla měřena za použití konduktometru Hanna (Rumunsko) při 20 °C. Přístroj byl kalibrován příslušným solným roztokem (KCl; 10,2 mS \times cm⁻¹) pro měření každé sady vzorků mléka.

Rezidua inhibičních látek v mléce (RIL; -/+ nebo N/P) byla kontrolována pomocí mikrobiologického postupu (*Geobacillus stearothermophilus*; testovací mikroorganismus s vysokou citlivostí vůči antibiotikům) inhibičními testy (růst při 65 °C) s pH indikátorem Eclipse 50 (ZEU-INMUNOTEC, Španělsko) podle manuálu výrobce a podle relevantního standardního operačního postupu.

Statistické postupy vyhodnocení

I) Pro výsledky hodnot TKM byly vypočteny aritmetické průměry a byly sestaveny do časových řad v závislosti na teplotě a graficky zobrazeny.

II) Databáze 207 původních vzorků a 414 vzorků celkem (původní a modifikované) byly vyhodnoceny základními statistickými metodami (MS Excel, Microsoft, Redmond, Washington, USA). Pro stanovení mléčné ukazatele byly vypočteny střední hodnoty (aritmetický průměr (\bar{x}), medián (m)), variabilita ve formě směrodatné odchylky ($s_d = s_x$) a variačního koeficientu (v_x v %). Dále hodnoty PSB (SB) a CPM, jako ukazatele s možnou, resp. předpokládanou odchylkou od normální frekvenční distribuce byly logaritmičtě transformovány (dekadický log) pro regresní hodnocení a výpočet hodnoty geometrického průměru (g).

Zaznamenaná spektra MIR-FT vyhodnotil s ohledem na referenční hodnoty TKM pan Craig Parsons (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA) relevantním software, ve spolupráci s panem Gavinem Thompsonem (Bentley Czech s.r.o.), čímž byly získány odhady TKM metodou MIR-FT.

Dále byly vypočteny lineární regrese a korelační koeficienty (r) mezi vybranými ukazateli, tedy především mezi referenčními hodnotami TKM a odhady TKM pomocí MIR-FT. Významné korelace (s pravděpodobností nulové hypotézy $< 0,05$) byly konvenčně (*) označeny.

Následně byla provedena cross validace získaných korelačních koeficientů postupným výpočtem náhodně, opakovaně redukováných kalibračních souborů s výpočtem validačních korelačních koeficientů a jejich variability. Výsledky všech statistických výpočtů jsou shrnuty v příloze 2 CM 40 2023.

Výsledky a diskuse

Technické omezení rutinních metod stanovení TKM

Je celkem technicky snadné provádět náhradní (nepřímou) metodu analýzy TKM v neprůtočném systému, např. reflektanční NIR-FT (na Petriho misce, vsádkovým způsobem). Určitý technický problém však přináší provedení měření v průtočném systému (s měřicí kyvetou), který používají dnešní specializované analyzátory mléka, např. MIR-FT, kde měřený vzorek mléka je vyplachován bezprostředně následně měřeným vzorkem. Je to z toho důvodu, že jednak je nutné vzorky při předúpravě zahřát na cca 40 °C a dále mléko během měření musí strávit určitý čas v temperované kyvetě bez sražení. Zde existuje technologické riziko (při vyšší, zejména případně získané TKM), hrozící nepříjemným znečištěním kyvety s možnými negativními technickými důsledky pro přístroj i operátora přístroje. Proto je tímto průtočným způsobem s měřicí celou (obvykle optické metody, spektrální analýzy mléka) možno měřit jen tekuté vzorky a nepřipustit srážení mléka v této měřicí cele. Tedy, v době měření by kasein neměl dosáhnout, při zahřátí mléka, svého isoelektrického bodu a vyvločkovat se. Záhřev vzorku ovšem toto riziko zvyšuje, resp. urychluje. Pro odhad např. TKM skotu to znamená rozsah měření nižší než stropní hodnota cca od 12 do cca 16 °SH (na 100 ml mléka), což ovšem bohužel platí pro vzorky individuálně. Nutno tak vycházet při praktické analytické práci v mléčné laboratoři z regionální zkušenosti a dále individuální, vizuální a případně i čichové kontroly konkrétních vzorků. Je třeba být opatrný při aplikaci takového měřicího postupu – jednoduše předcházet sražení mléka v přístrojové kyvetě a v celém hydraulickém systému aparátu vůbec.

Charakteristiky základních vzorkových kalibračních (referenčních) sad

I)

V Tab. 6 a v Obr. 17 jsou uvedeny výsledky TKM jednotlivých farem a aritmetický průměr všech měření. Je zřejmé, že u všech bazénových vzorků nedocházelo k výrazným změnám TKM ani při vyšší testované teplotě 20 a 25 °C. Počáteční průměrná hodnota TKM byla 7,4 a poté došlo k jejímu poklesu a hodnoty se dále pohybovaly v rozpětí 6,7 až 7,04 SH, což je v souladu s uváděnými standardními hodnotami pro SH 6,2 až 7,8. Výsledky přinesly informační hodnotu (KLIMEŠOVÁ, et al., 2022) pro zacházení se vzorky syrového bazénového mléka řady II při operacích se změnou a získkem TKM pro rozšíření škály kalibračního modelu u MIR-FT.

II)

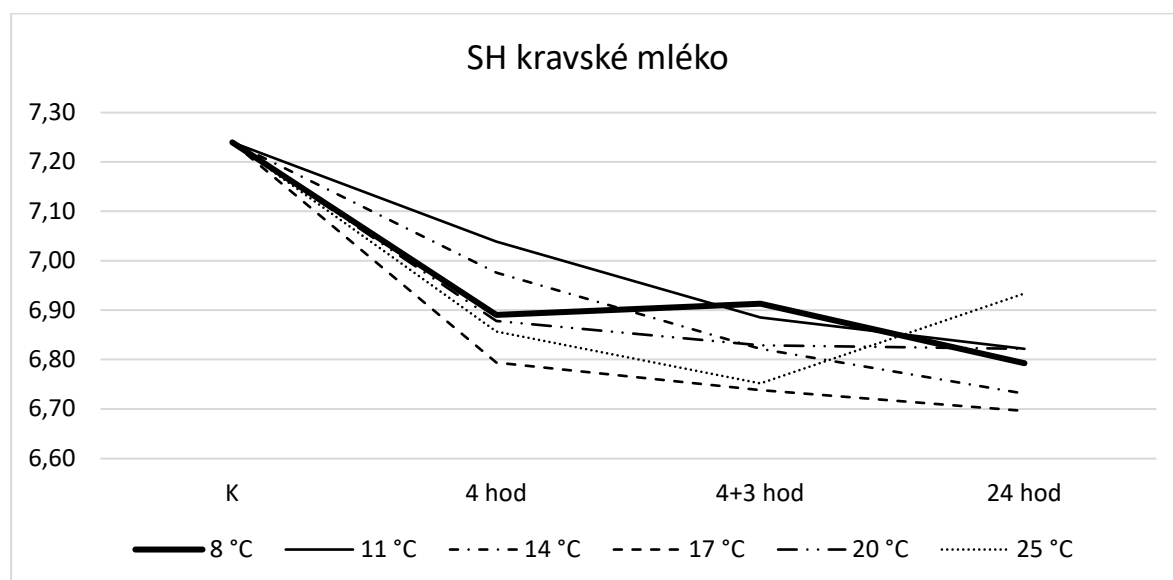
Základní charakteristiky (parametry) kalibrační sady z hlediska sledovaných mléčných ukazatelů jsou v Tab. 7 s uvedením referenčních hodnot TKM pro původní mléko a pro všechny vzorky mléka (původní plus modifikované). Je samozřejmé, že hodnoty sady $n = 414$ stanovené MIR-FT (složky a vlastnosti mléka) jsou již ovlivněny stavem vzorků (části po zvýšení TKM), kdy kalibrace na toto měření neodpovídala stavu vzorků. Proto tyto hodnoty jsou pouze orientační a poukazují na dynamiku změn výsledků MIR-FT se zhoršeným stavem vzorků (plus sekundární TKM). Hodnoty VOD a pH jsou samozřejmě reálné. Referenční průměr TKM této sady činil $10,52 \pm 5,9$ °SH, při variabilitě 56,1 % (minimum a maximum 5,47 a 33,81 °SH). To odpovídá zřetelnému vlivu narušeného syrového mléka, podle potřeby záměru pokusu. Základní sada referenčních vzorků $n = 207$ (původní mléko) uvádí běžné parametry mléčných ukazatelů pro podmínky chovu dojnic a produkce mléka v ČR, referenční průměr TKM byl $7,28 \pm 0,566$ °SH, při variabilitě 7,8 % (minimum a maximum 5,47 a 9,04 °SH). Všechny tyto vzorky mléka byly negativní na vyšetření RIL, tedy bez vlivu antibiotik, dezinfekčních

prostředků a přirozených inhibitorů. Uvedené dokládá vhodnost referenčních sad k použití pro zamýšlený účel derivace kalibračních modelů MIR-FT pro TKM.

Tab. 6 Výsledné hodnoty titrační kyselosti (°SH) kravského mléka.

Farma	DL1	LIB1	LIB2	BL	H	aritm. průměr
č. vzorku						
1	7,50	6,01	6,68	8,01	7,98	7,24
2	6,89	5,11	6,33	7,98	8,17	6,95
3	7,03	5,32	6,54	8,01	8,29	7,04
4	7,03	5,32	6,54	7,80	8,19	6,98
5	6,89	5,04	6,30	7,84	7,91	6,79
6	7,17	5,39	6,37	7,66	7,80	6,88
7	7,21	5,25	6,51	7,56	7,77	6,86
8	7,35	5,42	6,02	7,80	7,98	6,91
9	7,07	5,21	6,37	7,38	8,40	6,88
10	7,03	5,53	6,26	7,59	7,70	6,82
11	7,14	5,25	6,16	7,38	7,77	6,74
12	7,03	5,18	6,26	7,52	8,15	6,83
13	6,82	5,35	6,19	7,38	8,01	6,75
14	7,73	5,07	6,02	7,45	7,70	6,79
15	7,70	5,28	5,95	7,56	7,63	6,82
16	7,28	5,32	6,12	7,42	7,52	6,73
17	7,59	5,28	6,02	7,28	7,31	6,70
18	7,70	5,28	6,30	7,52	7,31	6,82
19	7,59	5,18	6,47	7,49	7,94	6,93

Obr. 17 Vývojové křivky TKM (°SH) kravské mléko.



Tab. 7 Základní charakteristiky mléčných ukazatelů kalibračních sad referenčních vzorků mléka pro tvorbu kalibračních modelů k odhadu hodnot TKM prostřednictvím MIR-FT a odhaduté hodnoty MIR-FT (II).

Jednotka	°SH	mS×cm ⁻¹	-	10 ³ ×ml ⁻¹	-	%	%	%	%	%	mg×l ⁻¹	-m°C	10 ³ CFU×ml ⁻¹	-	mmol×100gT ⁻¹	°SH
Parametr / Ukazatel	TKM	VOD	pH	PSB	log PSB	T	HB	L	STP	KAS	MOC	BMM	CPM	log CPM	VMK	TKM, MIR-FT
vzorky A																
n	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207
x	7,28	4,46	6,75	204	2,2565	4,03	3,48	4,99	9,1	2,77	256	541	18	0,9348	0,7895	7,28
sx	0,566	0,165	0,059	103	0,2161	0,294	0,176	0,086	0,199	0,216	80	22	61	0,3398	0,2442	0,254
vx (%)	7,8	3,7	0,9	50,5		7,3	5,1	1,7	2,2	7,8	31,3	4,1	338,9		30,9	3,5
g				181									9			
min.	5,47	3,85	6,59	40	1,6021	3,45	3,02	4,62	8,22	2,21	55	573	5	0,699	0,258	6,47
max.	9,04	5,03	6,93	658	2,8182	5,15	3,84	5,22	9,45	3,2	464	96	599	2,7774	1,532	8,07
vzorky A + B																
n	414	414	414			414	414	414	414	414	414	414				414
x	10,52	4,67	6,5			4,02	3,5	4,92	9,07	2,78	276	545				10,52
sx	5,904	3,84	0,464			0,286	0,181	0,152	0,273	0,236	96	24				4,874
vx (%)	56,1	8,2	7,1			7,1	5,2	3,1	3,0	8,5	34,8	4,4				46,3
min.	5,47	3,85	2,65			3,38	3,02	4,26	5,85	2,16	54	597				6,36
max.	33,81	6,4	6,93			5,15	4,06	5,22	9,46	3,63	755	496				29,75

TKM titrační kyselost mléka; MIR-FT infračervená spektroskopie mléka ve středové oblasti s Fourierovou transformací; A původní mléko (primární TKM); B mléko s vyšší TKM (primární a sekundární, získaná TKM); n počet případů; x aritmetický průměr; sx směrodatná odchylka; vx variační koeficient; g geometrický průměr; min. minimum; max. maximum; VOD vodivost; pH aktivní kyselost; PSB počet somatických buněk; T obsah tuku; HB obsah hrubých bílkovin; L koncentrace monohydrátu laktózy; STP obsah sušiny tukuprosté; KAS obsah kaseinu; MOC koncentrace močoviny; BMM bod mrznutí mléka; CPM celkový počet mezofilních mikroorganismů; VMK obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku.

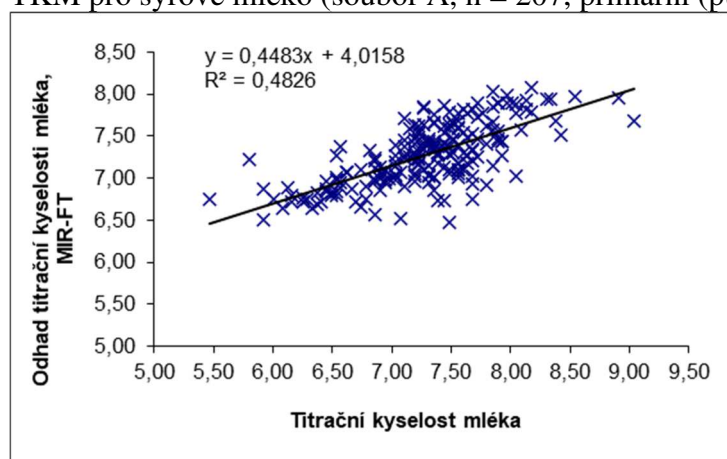
Výsledky korelační analýzy kalibračních modelů TKM pro MIR-FT

II)

V Tab. 7 jsou uvedeny také odhadnuté hodnoty TKM podle modelů pro spektra MIR-FT pro původní mléko (n = 207; A) i vzorky mléka celkem (n = 414; A + B). TKM zde činila $7,28 \pm 0,254$ °SH, při variabilitě 3,5 % (minimum a maximum 6,47 a 8,07 °SH) a $10,52 \pm 4,874$ °SH, při variabilitě 46,3 % (minimum a maximum 6,36 a 29,75 °SH). Na základě principu použité statistické metody konstrukce kalibračních modelů jsou difference průměrů mezi odhadem a referencí (TKM – MIR-FT minus TKM reference) pro oba soubory 0 a jejich směrodatné odchylky činí 0,313 a 1,03 °SH (příloha 2).

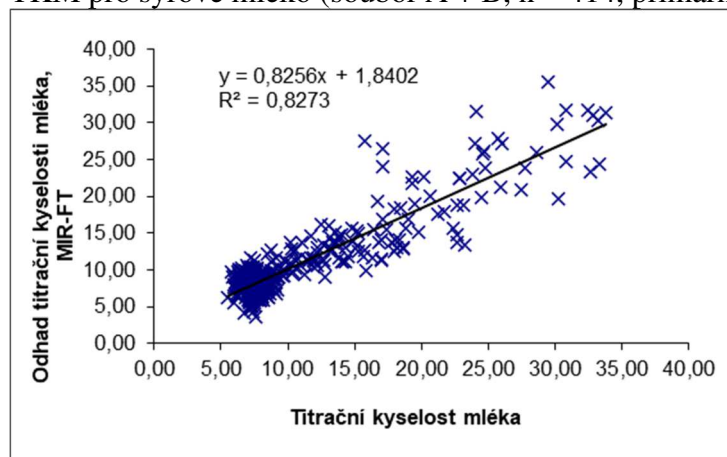
Provedení lineární regrese (Obr. 18 a 19) pro soubory A (původní mléko, n = 207) a vzorky celkem (A + B, n = 414) z Tab. 7 ukázalo poměrně těsné kalibrační (analyticko-metodické) korelační koeficienty mezi referenčními hodnotami TKM a odhady TKM (MIR-FT). Tyto byly statisticky významné a činily 0,695 (P < 0,001) a 0,91 (P < 0,001). To v druhém případě znamená, že 82,7 % z variability odhadnutých hodnot TKM (MIR-FT) bylo dáno variacemi v referenčních hodnotách TKM.

Obr. 18 Výsledek lineární regrese vztahu referenčních (x) a odhadovaných (y; MIR-FT) hodnot TKM pro syrové mléko (soubor A, n = 207, primární (původní) TKM) v °SH.



Kalibrační korelační koeficient $r = 0,695$ ***

Obr. 19 Výsledek lineární regrese vztahu referenčních (x) a odhadovaných (y; MIR-FT) hodnot TKM pro syrové mléko (soubor A + B, n = 414, primární a sekundární (získaná) TKM) v °SH.



Kalibrační korelační koeficient $r = 0,91$ ***

Výsledky validace kalibračních korelací modelů TKM pro MIR-FT

II)

Cross validace kalibračních korelačních koeficientů pro modely odhadu TKM pomocí metody MIR-FT ukázala (příloha 2) hodnoty validačních korelačních koeficientů kalibrace pro soubory A (původní mléko, n = 207) a A + B (vzorky celkem, n = 414) $0,692 \pm 0,033$ ($P < 0,001$) a $0,909 \pm 0,006$ ($P < 0,001$). Tento principiálně simulační postup validace byl použit namísto nového svozu jiných referenčních vzorků za srovnatelných podmínek, neboť takové pokusné opakování by bylo příliš nákladné.

Na základě uvedeného lze konstatovat, že odhad TKM pomocí metody MIR-FT (DairySpec FT, Bentley) je velmi způsobilý k praktickému analytickému využití pro mlékárenské technologie ke kontrole kvality suroviny v podmínkách problematického svozu syrového mléka při zhoršené kontrole času a teploty transportu (validace modelu A + B). To nejsou úplně podmínky ČR, ale spíše odlehlých a hornatých regionů s komplikovanějším klimatem a se slabší transportní infrastrukturou. Použití rychlého odhadu TKM (MIR-FT) k orientační kontrole kvality syrového mléka v dobrých transportních podmínkách (validace modelu A) je sice také analyticky možné, nicméně, bude méně efektivní s ohledem na spolehlivost (věrohodnost) výsledků.

Diskuse vybraných aspektů odhadu TKM kalibračním modelem pro MIR-FT

Sledování a vyhodnocování kvality syrového mléka pomáhá plnit důležitou společenskou zakázku (BAUMGARTNER et al., 2000). Bezpečnost a kvalita mléčného potravinového řetězce jsou důležitými aspekty ochrany veřejného zdraví.

Chlazení potravin je jedním z velmi známých, starých, v podstatě biologických, postupů jejich konzervace, tedy prodloužení trvanlivosti. Je využíváno i při podpoře stabilizace vzorků potravin, včetně mléka, při jejich transportu a uchování ke kontrole kvality. Je doloženo, že chlazení potravin ledem bylo využíváno již 400 let před naším letopočtem v Persii za využití úchoven ledu, jakčal, jak dokládají výsledky archeologického výzkumu architektury starověku.

Je známo, že mikroflóra mléčných stájí se v čase, podle používané technologie chovu a dojení krav a následných evolučně-genetických posunů, pozměňuje ve smyslu druhového nebo kmenového zastoupení a tím mění sumárně i své vlastnosti, dané především metabolickou aktivitou. Mnohdy může ubývat poměr acidogenní mikroflóry ve prospěch lipolytické nebo proteolytické v důsledku použité technologie a hygieny dojení, přičemž také mikrobiální zátěž nadojeného mléka byla v posledních dvaceti letech silně redukována. Proto, čas od času, dává v mlékařství smysl kvantifikovat, podle času a teploty, změny, které je původní mikroflóra schopna vyvolat v dynamice TKM, jako základního, technologického, mlékařského ukazatele.

I dnes může však, zejména v obtížnějších geografických a klimatologických podmínkách, být technickým problémem uchlazení velké objemy transportovaných potravinových surovin náchylných k mikrobiologickému rozkladu, jako je třeba mléko, ke zpracování, což může ohrožovat jejich kvalitu. Proto právě u syrového mléka bude kontrola jeho titrační kyselosti stále významnou, kvalitativní, kontrolní metodou. Celkem existuje velmi málo prací na rychlé rutinní určení hodnoty TKM nepřímou metodou (MIR-FT), v podstatě jen dvě s MIR-FT a některé také s NIR-FT.

Pokud jde o průměrné hodnoty (Tab. 7) referenčního souboru TKM (soubor A) $n = 207$, $7,28 \pm 0,566$ a soubor B) $n = 414$, $10,52 \pm 5,9$ °SH), pak tyto by činily v jiných jednotkách TKM $18,2 \pm 1,415$ a $26,3 \pm 14,75$ °Th a $16,38 \pm 1,274$ a $23,67 \pm 13,28$ °D atp. (Tab. 8). Uvedené platí pro různé země, podle toho, které jednotky používají (Tab. 3). Poněvadž však existuje i subjektivní, okoskopický vliv na titraci (na bod jejího ukončení) při stanovení TKM, mělo by si každé pracoviště kalibraci MIR-FT na odhad TKM provést samo, nebo při použití daných modelů si určit lokální korekční faktory (směrnici, posun, nebo kombinaci).

Tab. 8 Přepočítání kyselosti mléka vyjádřeného v různých jednotkách (podle BABULOVÁ a JANŠTOVÁ, 2019).

Titrační kyselost mléka (TKM) / Jednotka	°SH	°Th	°D	% kyseliny mléčné
TKM	1	2,5	2,25	0,0225
TKM	0,4	1	0,9	0,009
TKM	4/9	10/9	1	0,01

°SH (stupně Soxhleta-Henkela) - spotřeba (v ml) 1/4 N NaOH; °Th (stupně Thörnera) – spotřeba (v ml) 1/10 N NaOH; °D (stupně Dornica) - spotřeba (v ml) 1/9 N NaOH; (na 100 ml mléka; TKM, indikátor = fenolftalein).

4) Závěr metodiky pro rutinní stanovení titrační kyselosti mléka

Metodika nabízí validaci a možnosti selektivního použití nepřímé metody MIR-FT pro rychlý odhad hodnot titrační kyselosti mléka v mlékařském prostředí.

Ve specificky definovaných případech konfigurace podmínek technologického prostředí v mlékařství může být odhad hodnoty titrační kyselosti mléka nepřímou metodou MIR-FT použitelný jako vhodný postup při rychlé orientaci v technologické kvalitě syrového mléka pro zpracovatelský proces.

Metodika je inovativním rozšířením portfolia nabízených analytických, rutinních, laboratorních služeb v oboru infračervené spektroskopie mléka.

Projektové zdůvodnění potřeby doplňkového řešení CM 40 2023

Pro projekt MZe NAZV ZEMĚ QK 21010212 „Vývoj metod pro kontrolu manipulace kvality mléka určeného k dalšímu technologickému zpracování a zajištění jeho autenticity“. Věrohodnost výsledků PSB je základem pro identifikaci a efektivitu posouzení možné modifikace syrového mléka uměle vytvořenou redukcí PSB, jako obecně neetického postupu. Při dodatečné manipulaci (nadbytečné centrifugaci) s mlékem a případně i jeho vzorky však dochází k možným časovým prodlevám a teplotním výkyvům, které mohou mít vliv na mléko a tím i na identifikační metody. Ukázala se tak urgentní potřeba kontrolovat takovou interferenční možnost. Ukazatel titrační kyselosti mléka (SH) je důležitý pro posouzení kvality mléka i věrohodnost výsledků PSB. Automatizovaná infračervená spektroskopie nabízí možnost simultánní kontroly SH za existence příslušné kalibrace souběžně s pokusným zachytem spektra pro případnou identifikaci manipulace s mlékem a uměle vytvořené redukcí PSB. Proto byl, pro metodické potřeby projektu, vyvinut model determinace SH prostřednictvím infračervené spektroskopie k simultánní kontrole kvality vzorků v souvislosti s kontrolou případných variací PSB.

III) Srovnání „novosti postupů“ a předání metodiky:

Postup nepřímého, rutinního, rychlého odhadu hodnoty titrační kyselosti mléka

- vyvinutá metodika byla předána pro užívání v systému kontroly kvality mléka a laboratorní práce (Bentley Czech s.r.o., Svaz výrobců mléka a. s. Šumperk) v elektronické i písemné formě 1. 10. 2023;
- jedná se o nový a validovaný postup kontroly podmínek analýz titrační kyselosti bazénových vzorků mléka za použití moderních analytických metod pro podporu věrohodnosti získávaných analytických výsledků a kvality a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Metodika je inovativním rozšířením portfolia nabízených analytických, rutinních, laboratorních služeb v oboru infračervené spektroskopie mléka. Výsledky jsou jednak rozšířením dosavadních poznatků (validace kalibračních modelů stanovení řady mléčných složek a vlastností metodou MIR-FT u nás v laboratorní praxi a ve světové mlékařské literatuře) a dále uvedením známých poznatků v nových souvislostech;
- vývoj postupu a metody rutinní kontroly hygienicko-technologické kvality mléka podle ukazatele titrační kyselosti mléka v bazénových vzorcích je zajištěn vlastními konkrétními výsledky a retrospektivní komparací a analýzou vlastních předchozích výsledků pracoviště. Vyhodnocením těchto výsledků a sestavením návrhů vznikl postup, který je metodickým podkladem pro laboratoře kontroly kvality mléka pro zajištění kvality analytických výsledků, auditu relevantních akreditačních orgánů v oblasti analýz mléka a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce;
- uvedené postupy rychlých analýz a ověření a podpory spolehlivosti dat analýz mléka zatím nebyly v ČR v kontrole kvality mléka používány, ve světě jen místy.

IV) Popis uplatnění metodiky - Závěr - Kontrola uplatnění metodiky:

- kontrola fyzické existence metodiky jako pracovního postupu pro podporu věrohodnosti získávaných analytických výsledků mléčných laboratoří a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce (u VÚM);
- kontrola implementace a praktické aplikace metodiky je proveditelná prostřednictvím revize dokladů workshopů ke zlepšování kvalifikace odborného laboratorního personálu (programy, PP-prezentace a jejich písemné poznámkové verze, prezenční listiny, personální certifikáty o absolvování) v relevantních laboratořích kontroly kvality mléka (např. Bentley Czech s.r.o.; LRM Brno-Tuřany, ČMSCH a. s.);
- metodika postupu rutinního stanovení titrační kyselosti mléka pro podporu věrohodnosti získávaných analytických výsledků a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce byla zpracována v šesti exemplářích a předána v kroužkové vazbě na příslušná pracoviště (Czech Bentley s.r.o.; Svaz výrobců mléka a. s., Šumperk; LRM Brno-Tuřany ČMSCH a. s.) a do knihovny a na pracoviště Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. Praha a informace o ní na MZe a do RIV.

V) Ekonomické aspekty

Ekonomický dopad je součástí kontroly kvality mléka (KKM) a využití výsledků v prevenci hygienicko-technologických problémů mléčných potravin. Tuto činnost lze efektivně realizovat pouze na základě spolehlivých výsledků analýz. Vyvinutý a testovaný postup podporuje tuto spolehlivost analytických výsledků KKM. Na bázi preventivní podpory kvality a hygieny mléčných potravin může tvořit podíl do 2 % v celém segmentu. Uvedené je dáno redukcí běžných nedostatků způsobených případnou chybnou informací v KKM. Objem případných ztrát z chyb v KKM je ovšem obtížné vyčíslit konkrétněji. Na úrovni státu, při daném rozsahu a vlivu KKM, může ročně přínos z redukce ztráty efektivity chybami činit částky v řádu statisíců.

Náklady na konkrétní zavedení a využití postupu uvedeného v metodice mohou pro uživatelské laboratoře kontroly kvality mléka (KKM) činit podle kvalifikovaného odhadu celkem 40 tis. Kč jednorázově (náklady na implementaci predikčních modelů metody MIR-FT). Přínos pro uživatele je v podpoře spolehlivosti postupu kontroly hygienicko-technologické kvality mléka a kvalifikace laboratorního personálu. Tento lze na nepřímých efektech kvalifikovaně odhadnout na 90 tis. Kč ročně při redukcí chybovosti výsledků analýz a prevenci případných sporných jednání. Tento efekt je opakovatelný po rocích. Uvedené může přispět k redukcí nákladů na provoz KKM.

VI) Seznam použité související literatury

5) Použité jiné literární prameny při tvorbě metodiky

- BABULOVÁ, A.- JANŠTOVÁ, B.: Vyšetření mléka a mléčných výrobků - návody do cvičení. IVA 2019FVHE/2340/57, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, FVHE, Ústav hygieny a technologie mléka, 2019.
- BAHADI, M.- ISMAIL, A. A.- VASSEUR, E.: Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Tool to Study Milk Composition Changes in Dairy Cows Attributed to Housing Modifications to Improve Animal Welfare. *Foods* 2021, 10, 450. <https://doi.org/10.3390/foods10020450>
- BACH, K. D.- BARBANO, D. M.- MCART, J. A. A.: Association of mid-infrared-predicted milk and blood constituents with early-lactation disease, removal, and production outcomes in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 102, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16926>
- BARBANO, D. M.- LYNCH, J. M.: Major Advances in Testing of Dairy Products: Milk Component and Dairy Product Attribute Testing. *Journal of Dairy Science*, 89, 2006, 1189-1194.
- BASTIN, C.- THÉRON, L.- LAINÉ, A.- GENGLER, N.: On the role of mid-infrared predicted phenotypes in fertility and health dairy breeding programs. *Journal of Dairy Science*, 99, 2016, 4080-4094. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10087>
- BAUMGARTNER, CH., und Expertengruppe für Qualitätssicherung und Qualitätsmanagement (2000): Qualitäts 2000. Leitfaden für den Betrieb von Routine – Untersuchungsgeräten in Rohmilch – Prüfungslaboratorien, 1. Ausgabe, Oktober, 32.
- BELAY, K.- SVENDSEN, M.- KOWALSKI, Z. M.- ÅDNØY, T.: Genetic parameters of blood β -hydroxybutyrate predicted from milk infrared spectra and clinical ketosis, and their associations with milk production traits in Norwegian Red cows. *Journal of Dairy Science*, 100, 2017, 6298-6311. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12458>
- BENTLEY INSTRUMENTS: DAIRYSPEC FT: Accurate Component Analysis in Raw Milk and Other Dairy Products. Rev. E, 2012, 27.
- BESEDA I.- ĎURIŠOVÁ, B.- SOKOL, J.- POLAHÁR, B.- VÁEKA, J.- STANKO, P.: Vzťahy medzi ukazovateľmi profilového testu dojnic pri syndróme zníženej titračnej kyslosti. Relations between profile test variables in dairy cows with reduced titration acidity milk syndrome. (In Slovak) *Veterinární Medicína (Praha)*, 35, 1990, 137-144.
- BIGGS, D. A.: Instrumental infrared estimation of fat, protein, and lactose in milk: collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 61, 5, 1978, 1015-1034.
- BIGGS, D. A.- JOHNSON, G.- SJAUNJA, L. O.: Analysis of fat, protein, lactose, total solids by infra-red absorption. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Doc. 208, 1987, 21-29.
- BIGGS, D. A.- SZIJARTO, L. F.- VOORT VAN DE, F. R.: Fresh milk sampling for centralized milk testing. *Journal of Dairy Science*, 67, 1984, 3085-3092.
- BIJGAART VAN DEN, H.: New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 2 Free fatty acids. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 406, 2006, 22-28.
- BONFATTI, V.- DEGANO, L.- MENEGOZ, A.- CARNIER, P.: *Short communication*: Mid-infrared spectroscopy prediction of fine milk composition and technological properties in Italian Simmental. *Journal of Dairy Science*, 99, 2016, 8216-8221. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-10953>

- BOROŠ, V.- KRČÁL, Z.- SOBOTKA, J.: Príspevok k objasneniu príčin anomálneho zloženia a anomálnych vlastností surového mlieka. Contribution to the elucidation of the causes of anomalous composition and anomalous properties of raw milk. (In Slovak) *Mlékárenství*, 1988, 35-42.
- BRAND, W.- WELLS, A. T.- SMITH, S. L.- DENHOLM, S. J.- WALL, E.- COFFEY, M. P.: Predicting pregnancy status from mid-infrared spectroscopy in dairy cow milk using deep learning. *Journal of Dairy Science*, 104, 2021, 4980-4990. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18367>
- BRITO, R. F.- RODRIGUES, R.- DINIZ, S. A.- FONSECA, L. M.- LEITE, M. O.- SOUZA, M. R.- CONRADO, R. S.- VERÍSSIMO, S. A. O.- VALENTE, G. L. C.- CERQUEIRA, M. M. O. P.: Analysis of the freezing point of milk by precision method and by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. Análise do ponto de congelamento do leite pelo método de precisão e por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia / Brazilian archive of veterinary medicine and zootechnics*, 72, 5, 2020, 1713-1718.
- BROUTIN, P. J.: New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 1 Casein. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 406, 2006, 2-21.
- CECA LAIT: Evaluation of the Bentley FTS infrared analyser. *CecaLaits – Newsletter*, 67, 2008.
- COITINHO, T. B.- CASSOLI, L. D.- CERQUEIRA, P. H. R.- DA SILVA, H. K.- COITINHO, J. B.- MACHADO, P. F.: Adulteration identification in raw milk using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 8, 2017, 2394-2402. DOI 10.1007/s13197-017-2680-y
- COLINET, F. G.- SOYEURT, H.- ANCEAU, C.- VANLIERDE, A.- KEYEN, N.- DARDENNE, P.- GENGLER, N.- SINDIC, M.: Potential estimation of titratable acidity in cow milk using mid-infrared spectrometry. In 37th International Committee for Animal Recording (ICAR) Meeting, Riga, Latvia, 2010. Accessed Jan. 16, 2013. http://www.icar.org/Documents/Riga_2010/ppt/Colinet.pdf
- COPPA, M.- REVELLO-CHION, A.- GIACCONE, D.- FERLAY, A.- TABACCO, E.- BORREANI, G.: Comparison of near and medium infrared spectroscopy to predict fatty acid composition on fresh and thawed milk. *Food Chemistry*, 150, 2014, 49-57.
- COSTA, A.- MARCHI DE, M.- CASSANDRO, M.- PENASA, M.: Phenotypic and Genetic Aspects of Milk Freezing Point in Primiparous Holstein Friesian Cows. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 82, 2, 2017, 175-178.
- ČEJNA, V.: Vliv laktace krav na vybrané technologické vlastnosti mléka. The effect of stage of lactation on milk processing characteristics. (In Czech) Doktorská práce, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta, 2006, 28.
- CSN EN ISO/IEC 17025. 2005. Conformity assessment - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. *Czech Normalization Institute* (In Czech), Prague.
- CSN EN ISO 13366-1 (57 0531). 1998. Milk – Somatic cell count determination – Part 1: Microscopy method. *Czech Normalization Institute*, Prague.
- CSN EN ISO 13366-2 (57 0531). 2007. Milk – Somatic cell count determination – Part 2: Manual for fluoro-opto-electronic instrument operation. *Czech Normalization Institute*, Prague.
- ČSN EN ISO 4833-1: Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. ČNI Praha, 1. 4. 2014

- ČSN EN ISO 7218 Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení. 4/2008.
- ČSN 57 0529: Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování. Raw cow's milk for dairy treatment and processing. (In Czech) *Czech Normalization Institute*, Prague, 1993.
- ČSN 57 0530: Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Methods for testing of milk and milk products. (In Czech) *Czech Normalization Institute*, Prague, 1973.
- ČSN 57 0536: Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) 1999: ČNI Praha.
- ČSN ISO 8196-1 (570536). 2016. Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 1: Analytické atributy alternativních metod.
- ČSN ISO 8196-2 (570536). 2016. Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 2: Kalibrace a řízení kvality v laboratoři při analýzách mléka alternativními metodami.
- ČSN ISO 8196-3 (570536). 2016. Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 3: Protokol pro hodnocení a validaci alternativních metod pro analýzu mléka.
- DALE, L. M.- WERNER, A.- DRÖSSLER, K.- SPIEKERS, H.- HERTEL-BÖHNKE, P.- STAMER, E.- KUHLA, B.- ONKEN, F.- KLEIN, S.- STOCK, F. A.- VANLIERDE, A.: Methane, energy balance and feed efficiency predictions evaluation on dairy cow's population. *ICAR Technical Series 25*, 2021 a, 245-252.
- DALE, L. M.- DROESSLER, K.- AUER, J.- MAYERHOFER, M.- KÖCK, A.- EGGER-DANNER, C.- ONKEN, F.- SPIEKERS, H.- HERTEL-BÖHNKE, P.- STAMER, E.- WERNER, A.: Practical applications of ketosis and energy deficit milk MIR spectral predictions. *ICAR Technical Series 25*, 2021 b, 185-191.
- DELHEZ, P.- COLINET, F.- VANDERICK, S.- BERTOZZI C.- GENGLER, N.- SOYEURT, H.: Predicting milk mid-infrared spectra from first-parity Holstein cows using a test-day mixed model with the perspective of herd management. *Journal of Dairy Science*, 103, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17717>
- DELTA INSTRUMENTS: LactoScope FTIR Advanced Mid-IR Dairy Analyzer. 2006.
- DE MARCHI, M.- TOFFANIN, V.- CASSANDRO, M.- PENASA, M.: *Invited review*: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits. *Journal of Dairy Science*, 97, 2014 1171-1186. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6799>
- DE MARCHI, M.- TOFFANIN, V.- CASSANDRO, M.- PENASA, M.: Prediction of coagulating and noncoagulating milk samples using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 96, 2013, 4707-4715. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6506>
- DE MARCHI, M.- FAGAN, C. C.- O'DONNELL, C. P.- CECCHINATO, A.- DAL ZOTTO, R.- CASSANDRO, M.- PENASA, M.- BITTANTE, G.: Prediction of coagulation properties, titratable acidity, and pH of bovine milk using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 92, 2009, 423-432. doi:10.3168/jds.2008-1163
- DOI, T.- KANZAKI, M.- MATSUMOTO, K.: The rapid and simple method for the estimation of titratable acidity of raw milk. (In Japan) *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 38, 3, 1991, 221-225.
- DÓREA, J. R. R.- ROSA, G. J. M.- WELD, K. A.- ARMENTANO, L. E.: Mining data from milk infrared spectroscopy to improve feed intake predictions in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101, 7, 2018, 5878-5889. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13997>

- DU, C.- NAN, L.- LI, C.- SABEK, A.- WANG, H.- LUO, X.- SU, J.- HUA, G.- MA, Y.- ZHANG, S.: Influence of Estrus on the Milk Characteristics and Mid-Infrared Spectra of Dairy Cows. *Animals* 2021, 11, 1200. <https://doi.org/10.3390/ani11051200>
- DU, C.- NAN, L.- YAN, L.- BU, Q.- REN, X.- ZHANG, Z.- SABEK, A.- ZHANG, S.: Genetic Analysis of Milk Production Traits and Mid-Infrared Spectra in Chinese Holstein Population. *Animals* 2020, 10, 139; doi:10.3390/ani10010139
- DUARTE, E.- LIMA, J.- FONSECA, R. P.- LEITE, M. O.- FONSECA, L. M.: Avaliação do ponto de congelamento do leite cru por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier como método de triagem. Evaluation of the freezing point of raw milk by Fourier transform infrared spectroscopy as a screening method. (In Portugal) *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia / Brazilian archive of veterinary medicine and zootechnics*, 72, 6, 2020, 2059-2068.
- FAMIGLI-BERGAMINI, P.: Rapporti tra patologia (non mammaria) ed aspetti quali-quantitativi del latte nella bovina. Relationship between pathology (non-mammary) and qualitative and quantitative aspects of milk in the cow. (In Italy) *Societa Italiana di Buiatria*, Bologna, 19, 1987, 8-10, 89-99.
- FISCHER, V.- RIBEIRO, M. E. R.- ZANELA, M. B.- MARQUES, L. T.- ABREU, A. S.- MACHADO, S. C.- FRUSCALSO, V.- BARBOSA, R. S.- STUMPF, M. T.: Leite instável não ácido: um problema solucio nável? Unstable non acid milk: a solvable problem? (In Portugal) XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia, Universidade Federal de Alagoas, 23 a 27 de maio, 2011, 1-19.
- FOSS: MilkoScan FT 6000; Free fatty acids measurement (FFA). 2001, Spectrum Calibration.
- FOSS: MilkoScan FT 6000; Urea measurement. Issue 76100-30bGB, November 1999, 1-5.
- FOSS: MilkoScan FT 120; Improved milk calibration. 2004 a, Analytical Application Note No. 128e.
- FOSS: MilkoScan FT 120; Urea Calibration: Determination of Urea in raw cow's milk. 2004 b, Analytical Application Note No. 95a.
- FRANZOI, M.- NIERO, G.- MEONI, G.- TENORI, L.- LUCHINAT, C.- PENASA, M.- CASSANDRO, M.- DE MARCHI, M.: Effectiveness of mid-infrared spectroscopy for the prediction of cow milk metabolites. *Journal of Dairy Science*, 106, 2023, 5288-5297. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23226>
- FRANZOI, M.- NIERO, G.- VISENTIN, G.- PENASA, M.- CASSANDRO, M.- DE MARCHI, M.: Variation of Detailed Protein Composition of Cow Milk Predicted from a Large Database of Mid-Infrared Spectra. *Animals*, 2019, 9, 176; doi:10.3390/ani9040176
- GENGLER, N.- BERRY, D. P.- BASTIN, C.: Use of automated systems for recording of direct and indirect data with special emphasis on the use of MIR milk spectra (OptiMIR project). ICAR Tech. Ser. 17. Direct Indirect Data MIR, 2013, 55-61.
- GENGLER, N.: *Symposium review: Challenges and opportunities for evaluating and using the genetic potential of dairy cattle in the new era of sensor data from automatic.* *Journal of Dairy Science*, 102, 2018, 5756-5763. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15711>
- GENGLER, N.: Using (mid-)infrared spectroscopy methods to measure milk composition, energy balance and beyond....in dairy cows. PP presentation, SBMA Meeting (Ribeirão Preto - Sao Paulo, Brazil, June 12 to 13, 2017).
- GRAPPIN, R.: Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis - application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, 1987 a, 3-12.

- GRAPPIN, R.: Application of indirect instrumental methods to the measurement of fat and protein content of ewes and goats milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Doc. 208, 1987 b, 41-43.
- GRAPPIN, R.: European network of dairy laboratories. V: Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories. Sonthofen / Germany, 1992-05-18/20, Brussels 1993, 205-211.
- GRELET, N.: Promoting international prediction models through standardization of milk mid-infrared spectra. Doctoral Thesis, COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE ACADÉMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE UNIVERSITÉ DE LIÈGE – GEMBOUX AGRO-BIO TECH, 2019, 99.
- HANSEN, P. W.: Screening of dairy cows for ketosis by use of infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Journal of Dairy Science*, 82, 1999, 2005-2010.
- HEUER, C.- LUNGE, H. J.- LUTZ, E. T. G.- SCHUKKEN, Y. H.- MAAS VAN DER, J. H.: Determination of acetone in cow milk by Fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 84, 2001, 575-582.
- HILL, A. R.- MAKARCHUK, M. J.- SZIJARTO, L. F.: Comparison of alternative calibration procedures for infra-red milk analyzers. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24, 5, 1991, 228-232.
- HO, P. N.- LUKE, T. D. W.- PRYCE, J. E.: Validation of milk mid-infrared spectroscopy for predicting the metabolic status of lactating dairy cows in Australia. *Journal of Dairy Science*, 104, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19603>
- HOENEN, M.- WERNER, A.- STRANG, E. J. P.- LECOMTE, C.- DRÖSSLER, K.- BIEGER, J.- CAUSSANEL, P.- WEIDEMANN, S.- MARCILLET, A.- CARNEVALI, M.- DALE, L. M.: „MastiMIR“ A – mastitis early warning system based on MIR spectra. *ICAR Technical Series* 25, 2021, 269-274.
- JAĎUĎ, P.- BESEDA, I.- KRÁLIKOVÁ, J.- VÁLKA, J.- ĎURIŠOVÁ, B.- STANKO, P.: Funkčne narušená pečeň vo vzťahu ku zníženej titračnej kyslosti mlieka. Damaged liver function in relation to lowered titratable acidity of milk. (In Slovak) *Veterinárni Medicína (Praha)*, 37, 11, 1992, 605-612.
- JANKOVSKÁ, R.: Využití blízké infračervené spektroskopie (NIR) při hodnocení vybraných mléčných produktů. Doktorská disertační práce, MZLU v Brně, 2004, 176.
- KADEČKA, J.- ROZMAN, J.: Chov skotu v proměnách času v Čechách se zaměřením na severovýchodní Čechy. ChovServis a.s., Hradec Králové, 2006, 124.
- KERKHOF MOGOT M. F.- KOOPS, J.- NEETER, R.- SLANGEN, K. J.- HEMERT VAN, H.- KOOYMAN, O.- WOOLDRIK, H.: Routine testing of farm tank milk with the Milko-Scan 203. 1. Calibration procedure and small-scale experiments. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 36, 1982, 115-130.
- KLAFFENBÖCK, M.- STEINWIDDER, A.- FASCHING, C.- TERLER, G.- GRUBER, L.- MÉSZÁROS, G.- SÖLKNER, J.: The use of mid-infrared spectrometry to estimate the ration composition of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100, 2017, 5411-5421. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12189>
- KLÍČNÍK, V.: Technologie živočišných produktů (Mlékařství). Animal Product Technology (Dairy). (In Czech) SPN, VŠZ Brno, 1978, 270.
- KNEGSEL VAN, A. T. M.- DRIFT VAN DER, S. G. A.- HORNEMAN, M.- ROOS, DE A. P. V.- KEMP, B.- GRAAT, G. A. M.: Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 2010, 3065-3069.

- KOZELKOVÁ, M.: Využití FT NIR spektroskopie v mlékárenském průmyslu. Disertační práce, Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Brno, 2012, 209.
- KRATOCHVÍL, L.: Kyselost mléka a hodnota pH. Milk acidity and pH value. (In Czech) *Náš chov*, 3, 1984, příloha *Mlékárenský Průmysl*, 1-2.
- KUNES, R.- BARTOS, P.- IWASAKA, G. K.- LANG, A.- HANKOVEC, T.- SMUTNY, L.- CERNY, P.- POBORSKA, A.- SMETANA, P.- KRIZ, P.- KERNEROVA, N.: In-Line Technologies for the Analysis of Important Milk Parameters during the Milking Process: A Review. *Agriculture* 2021, 11, 239. <https://doi.org/10.3390/agriculture11030239>
- LEFIER, D.- GRAPPIN, R.- POCHE, S.: Determination of fat, protein, and lactose in raw milk by Fourier transform infrared spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyzer. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 79, 3, 1996, 711-717.
- LOPEZ-VILLALOBOS, N.- DAVIS, S. R.- BEATTIE, E. M.- MELIS, J.- BERRY, S.- HOLROYD, S. E.- SPELMAN, R. J.- SNELL, R. G.: Breed effects for lactoferrin concentration determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 69, 2009, 60-64.
- MACEDO MOTA, L. F.- BISUTTI, V.- VANZIN, A.- PEGOLO, S.- TOSCANO, A.- SCHIAVON, S.- TAGLIAPIETRA, F.- GALLO, L.- AJMONE MARSAN, P.- CECCHINATO, A.: Predicting milk protein fraction using infrared spectroscopy and a gradient boosting machine for breeding purposes in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 106, 2023, 1853-1873. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22119>
- MACHADO, S. C.- FISCHER, V.- STUMPF, M. T.- STIVANIN, S. C. B.: Seasonal variation, method of determination of bovine milk stability, and its relation with physical, chemical, and sanitary characteristics of raw milk. *Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science*, 46, 4, 2017, 340-347. <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000400010>
- MARIANI, P.- BONATTI, P.: Il latte ad acidita anomala. III. Osservazioni sulla composizione chimica dei lattii ad elevata acidita titolabile. (In Italy) *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 39, 1, 1988, 43-48.
- MARIANI, P.- BONATTI, P.- PECORARI, M.: Il latte ad acidita anomala. IV. Fosforo solubile cloruri e tipi di latte ipoacido. (In Italy) *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 40, 3, 1989, 215-225.
- MCPARLAND, S.- BERRY, D. P.: The potential of Fourier transform infrared spectroscopy of milk samples to predict energy intake and efficiency in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99, 2016, 4056-4070. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10051>
- MENSCHING, A.- ZSCHIESCHE, M.- HUMMEL, J.- GRELET, C.- GENGLER, N.- DÄNICKE, S.- SHARIFI, A. R.: Development of a SARA risk score and its prediction using milk mid-infrared spectra in early-lactation cows. *Journal of Dairy Science*, 104, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19516>
- MESGARAN, S. D.- EGGERT, A.- HÖCKELS, P.- DERNO, M.- KUHLA, B.: The use of milk Fourier transform midinfrared spectra and milk yield to estimate heat production as a measure of efficiency of dairy cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2020, 11:43, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00455-0>
- MINEUR, A.- HAMMAMI, H.- GRELET, C.- EGGER-DANNER, C.- SÖLKNER, J.- GENGLER, N.: Short communication: Investigation of the temporal relationships between milk mid-infrared predicted biomarkers and lameness events in later lactation. *Journal of Dairy Science*, 103, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16826>

- MLČEK, J.: Využití NIR spektrometrie pro hodnocení kvality potravin a potravinových surovin. Disertační práce, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 2008, 146.
- MOLINA, L. H.- GONZÁLEZ, R.- BRITO, C.- CARRILLO, B.- PINTO, M.: Correlacion entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechem. Correlation between heat stability and alcohol test of milks at a milk collection center. (In Spain) *Archivos de medicina veterinaria / Archives Medicine Veterinary*, ISSN 0301-732X, 33, 2, 2001. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2001000200012>
- MULLINS, I. L.- TRUMAN, C. M.- CAMPLER, M. R.- BEWLEY, J. M.- COSTA, J. H. C.: Validation of a Commercial Automated Body Condition Scoring System on a Commercial Dairy Farm. *Animal*, 2019, 9, 287. doi:10.3390/ani9060287
- NARAYANA, S. G.- SCHENKEL, F. S.- FLEMING, A.- KOECK, A.- MALCHIODI, F.- JAMROZIK, J.- JOHNSTON, J.- SARGOLZAEI, M.- MIGLIOR, F.: Genetic analysis of groups of mid-infrared predicted fatty acids in milk. *Journal of Dairy Science*, 100, 2017, 4731-4744. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12244>
- NAVRÁTILOVÁ, P.- KRÁLOVÁ, M.- JANŠTOVÁ, B.- PŘIDALOVÁ, H.- CUPÁKOVÁ, Š.- VORLOVÁ, L.: Hygiena produkce mléka. Hygiene of milk production. (In Czech) Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie mléka, ISBN 978-80-7305-625-4, 2012, 129.
- O'CONNOR, C. B.: The titratable acidity of milk. *Irish Agricultural and Creamery Review*, 23, 5, 1970, 23-25.
- ÖZDEMİR, D.- KAHYAĞLU, D. T.: Identification of microbiological, physical, and chemical quality of milk from milk collection centers in Kastamonu Province. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 44, 2020, 118-130. doi:10.3906/vet-1908-86
- PATSCHOVÁ, D.- ŠMIDRIAKOVÁ, M.: Laktóza vo vzťahu k aktuálnej a titračnej acidite mlieka. Lactose in relation to the actual and titratable acidity of milk. (In Slovak) *Veterinárství*, 40, 4, 1990, 188-189.
- PEGOLO, S.- MOTA, L. F. M.- BISUTTI, V.- MARTINEZ-CASTILLERO, M.- GIANNUZZI, D.- GALLO, L.- SCHIAVON, S.- TAGLIAPIETRA, F.- REVELLO CHION, A.- TREVISI, E.- NEGRINI, R.- AJMONE MARSAN, P.- CECCHINATO, A.: Genetic parameters of differential somatic cell count, milk composition, and cheese-making traits measured and predicted using spectral data in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 104, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20395>
- PEN, A.: Ursachen des erhöhten Säuregrades in der Kuhmilch. The appearance of elevated physiological acidity in milk. (In Germany) *Bericht über die 22. Tierzuchttagung BAL Gumpenstein*, Aktuelle Forschungsergebnisse und Versorgungsempfehlungen in der Rindermast und Milchviehfütterung, 1995, 51-57.
- PEN, A.- PUHAN, J.- LEBAR, J.- MAJČEN, M.- SREŠ, F.- STAJNKO, M.- LAŠIČ, T.- KRESLIN, D.- ČELAK, S.- MARINIČ, M.: Problem kislosti mleka. Milk acidity problem. (In Slovenia) Živinorejsko-Veterinarski zavod za Pomurje, Oddelek za kmetijsko raziskovanje, Murska Sobota, Slovenija, 1994, 43.
- PEREIRA, C. G.- LUIZ, L. C.- BELL, M. J. V.- ANJOS, V.: Near and Mid Infrared Spectroscopy to Assess Milk Products Quality: A Review of Recent Applications. *HSOA Journal of Dairy Research and Technology*, 3: 014, 2020, 1-11. DOI: 10.24966/DRT-9315/100014
- PIJANOWSKI, E.: Základy chémie a technológie mliekárstva. Basics of chemistry and dairy technology. (In Slovak) *Príroda – Bratislava*, 69, 1977.

- POĽAHÁR, P.- BESEDA, I.- ĎURIŠOVÁ, E.- ŠMIDRIAKOVÁ, M.- STANKO, P.- VÁEKA, J.: Hodnotenie niektorých parametrov mlieka pri jeho zníženej a normálnej titračnej kyslosti viacrozmernou štatistickou analýzou. An evaluation of some milk characteristics at reduced and normal titratable acidity by means of a multivariate statistical analysis. (In Slovak) *Živočišná Výroba / Czech Journal of Animal Science*, 36, 4, 1991, 329-335.
- PORTNOY, M.- COON, C.- BARBANO, D. M.: Infrared milk analyzers: Milk urea nitrogen calibration. *Journal of Dairy Science*, 104, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18772>
- PRALLE, R. S.- AMDALL, J. D.- FOURDRAINE, R. H.- OETZEL, G. R.- WHITE, H. M.: Hyperketonemia Predictions Provide an On-Farm Management Tool with Epidemiological Insights. *Animals* 2021, 11, 1291. <https://doi.org/10.3390/ani11051291>
- RATHNAYAKE, R. M. C. S.- MANGALIKA, U. L. P.- ADIKARI, A. M. J. B.- NAYANANJALIE, W. A. D.: Changes in Compositional and Keeping Quality Parameters of Cow Milk on Ethanol Stability. *International Journal of Livestock Research*, 6, 4, 2016, 83-89. DOI: 10.5455/ijlr.20160325105132
- ROOS DE, A. P. W.- BIJGAART, VAN DEN, H. J. C. M.- HORLYK, L.- JONG DE, G.: Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spektrometry. *Journal of Dairy Science*, 90, 2007, 1761-1766.
- ROSA, P. P.- ÁVILA B. P.- ANGELO, I. D. V.- SILVA, P. M.- CHESINI, R. G.- MOTA, G. N.- SEDREZ, P. A.- FERNANDES, T. A.- BUGONI, M.- ROLL, V. F. B.: Factors that affect the thermal stability of bovine milk and the use of alcohol test in the milk industry – a review. *Nucleus Animalium*, 12, 2, 2020, 15-46.
- ROVERE, G.- DE LOS CAMPOS, G.- LOCK, A. L.- WORDEN, L.- VAZQUEZ, A. I.- LEE, K.- TEMPELMAN R. J.: Prediction of fatty acid composition using milk spectral data and its associations with various mid-infrared spectral regions in Michigan Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 104, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20267>
- RŮŽIČKOVÁ, J.: Aplikace NIR spektrometrie v kontrole kvality zemědělských materiálů a produktů. Disertační práce, MZLU Brno, 2007, 136.
- SJAUNJA, L. O.: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. II. Factors affecting milk analyses by infrared technique under laboratory conditions. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 34, 1984 a, 260-272.
- SJAUNJA, L. O.: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. III. The effect of different treatments on infrared analyses. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 34, 1984 b, 273-285.
- SJAUNJA, L. O.- ANDERSSON, I.: Laboratory experiments with a new infrared (IR) milk analyzer, the Milko-Scan 605. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 35, 1985, 345-352.
- SJAUNJA, L. O.- PHILIPSSON, J.- LUNDSTRÖM, K.- SWENSSON, CH.: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. IV. Factors affecting milk analyses in a routine system by automated apparatuses. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 34, 1984, 286-299.
- SKÝPALA, M.- CHLÁDEK, G.: Složení a technologické vlastnosti mléka získaného z ranního a večerního dojení. The chemical composition and technological properties of milk obtained from the morning and evening milking. (In Czech) *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, LVI, 5, ISSN 1211-8516, 2008, 187-198.
- SOYEURT, H.- BASTIN, C.- COLINET, F. G.- ARNOULD, V. M.-R.- BERRY, D. P.- WALL, E.- DEHARENG, F.- NGUYEN, H. N.- DARDENNE, P.- SCHEFERS, J.- VANDENPLAS, J.- WEIGEL, K.- COFFEY, M.- THÉRON, L.- DETILLEUX, J.- REDING, E.- GENGLER, N.- MCPARLAND, S.: Mid-infrared prediction of lactoferrin content in bovine milk: potential indicator of mastitis. *Animal*, 6, 11, 2012, 1830-1838. DOI: 10.1017/S1751731112000791

- SOYEURT, H.- DARDENNE, P.- DEHARENG, F.- LOGNAY, G.- VESELKO, D.- MARLIER, M.- BERTOZZI, C.- MAYERES, P.- GENGLER N.: Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 89, 9, 2006 a, 3690-3695.
- SOYEURT, H.- DARDENNE, P.- GILLON, A.- CROQUET, C.- VANDERICK, S.- MAYERES, P.- BERTOZZI, C.- GENGLER N.: Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science*, 89, 12, 2006 b, 4858-4865.
- SOYEURT, H.- DEHARENG, F.- GENGLER, N.- MCPARLAND, S.- WALL, E.- BERRY, D. P.- COFFEY, M.- DARDENNE P.: Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple breeds, production systems, and countries. *Journal of Dairy Science*, 94, 2011, 1657-1667.
- SOYEURT, H.- FROIDMONT, E.- DUFRASNE, I.- HAILEMARIAM, D.- WANG, Z.- BERTOZZI, C.- COLINET, G.- DEHARENG, F.- GENGLER, N.: Contribution of milk mid-infrared spectrum to improve the accuracy of test-day body weight predicted from stage, lactation number, month of test and milk yield. *Livestock Science*, 227, 2019, 82-89.
- SPIESS, L.- DE PEINDER, P.- VAN DEN BIJGAART, H.: Advances in Atypical FT-IR Milk Screening: Combining Untargeted Spectra Screening and Cluster Algorithms. *Foods* 2021, 10, 1111. <https://doi.org/10.3390/foods10051111>
- TEDDE, A.- GRELET, C.- HO, P. N.- PRYCE, J. E.- HAILEMARIAM, D.- WANG, Z.- PLASTOW, G.- GENGLER, N.- BROSTAU, Y.- FROIDMONT, E.- DEHARENG, F.- BERTOZZI, C.- CROWE, M. A.- DUFRASNE, I.- GPLUSE CONSORTIUM GROUP, SOYEURT, H.: Validation of Dairy Cow Bodyweight Prediction Using Traits Easily Recorded by Dairy Herd Improvement Organizations and Its Potential Improvement Using Feature Selection Algorithms. *Animals*, 2021, 11, 1288. <https://doi.org/10.3390/ani11051288>
- THIEME, D. A.- DETTMER, R.- SCHMEICHEL, A.: Zur physiologischen Säurezahl-Norm für Herdenmischmilch. *Monatshfte für Veterinärmedizin*, 38, 1, 1983 a, 13-16.
- THIEME, D. A.- GRUNWALD, A.- KRON, A.- SANDER, W.- SCHMEICHEL, A.: Normalabweichungen der Säurezahl von Herdenmichmilch und deren Ursachen. *Monatshfte für Veterinärmedizin*, 38, 1, 1983 b, 16-24.
- THOMAS, W. LA.: Use of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy to determine the health-promoting index (HPI) of cow's milk. Doctoral Thesis, Iowa State University, 2008, 88.
- TIPLADY, K. M.- LOPDELL, T. J.- LITTLEJOHN, M. D.- GARRICK, D. J.: The evolving role of Fourier-transform midinfrared spectroscopy in genetic improvement of dairy cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11:39, 2020, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00445-2>
- TRÁVNÍČEK, J.- KROUPOVÁ, V.- ROHLÍK, V.- TESAŘÍK, L.: Titrační kyselost mléka z hlediska metabolického profilu dojnic. Titratable acidity of milk with respect to the metabolic profile of dairy cows. (In Czech) *Živočišná Výroba / Czech Journal of Animal Science*, 36, 4, 1991, 321-327.
- VALENBERG VAN, H. J. F.: Standardization and control of instruments for analysis of milk. International Dairy Federation Congress, Montreal, 1990, 1316-1321.
- VANLIERDE, A.- VANROBAYS, M. L.- GENGLER, N.- DARDENNE, P.- FROIDMONT, E.- SOYEURT, H.- MCPARLAND, S.- LEWIS, E.- DEIGHTON, M. H.- MATHOT, M.- DEHARENG, F.: Milk mid-infrared spectra enable prediction of lactation-stagedependent methane emissions of dairy cattle within routine population-scale milk recording schemes. *Animal Production Science*, 56, 2016, 258-264.

- VINES, D. T.- JENNY, B. F.- WRIGHT, R. E.- GRIMES, L. W.: Variation in milk fat, protein and somatic cell count from four dairy herd improvement laboratories. *Journal of Dairy Science*, 69, 1986, 2219-2223.
- VOORT VAN DE, F. R.- KERMASHA, S.- SMITH, J. P.- MILLS, B. L.- NG-KWAI-HANG, K. F.: A study of the stability of record of performance milk samples for infrared milk analysis. *Journal of Dairy Science*, 70, 1987, 1515-1523.
- VOSMAN, J. J.- DE JONG, G.- EDING, H.- KNIJN, H.: Genetic evaluation for ketosis in the Netherlands based on FTIR measurements. *Interbull Bulletin* No. 49: Proceedings of the 2015 Interbull Meeting, Orlando, Florida, 1-5.
- VARVAŽOVSKÝ, V.- KUKAČKA, F.- MÁCHA, F.- KROULÍK, J. et al.: Sledování příčin výskytu nestandardního mléka v kyselosti pod 6,2 ml a s omezenými prokysávacími schopnostmi v návaznosti na úroveň výživy. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚS), Praha, Závěrečná zpráva 1984 – 1985, 1985, 21.
- WALLESER, E.- MANDUJANO REYES, J. F.- ANKLA, K.- HÖLTERSCHINKE, M.- HERTEL-BOEHNK, P.- DÖPFE, D.: Beta-hydroxybutyrate and non-esterified fatty acids prediction using milk Fourier-transform infrared spectroscopy. *ICAR Technical Series* 25, 2021, 41-46.
- WOJCIECHOWSKI, K. L.- BARBANO, D. M.: Prediction of fatty acid chain length and unsaturation of milk fat by mid-infrared milk analysis. *Journal of Dairy Science*, 99, 2016, 8561-8570. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11248>
- ZAALBERG, R. M.- BUITENHUIS, A. J.- SUNDEKILDE, U. K.- POULSEN, N. A.- BOVENHUIS, H.: Genetic analysis of orotic acid predicted with Fourier transform infrared milk spectra. *Journal of Dairy Science*, 103, 2019, 3334-3348. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16057>
- ZHANG, L.- TEDDE, A.- HO, P.- GRELET, C.- DEHARENG, F.- FROIDMONT, E.- GENGLER, N.- BROSTAU, Y.- HAILEMARIAM, D.- PRYCE, J.- SOYEURT, H.: Mining data from milk mid-infrared spectroscopy and animal characteristics to improve the prediction of dairy cow's liveweight using feature selection algorithms based on partial least squares and Elastic Net regressions. *Computers and Electronics in Agriculture*, 184, 2021, 106106. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2021.106106>

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

6) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci metodiky

Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech:

- BRAUNER, J.- HANUŠ, O.: Technologické vlastnosti mléka a jeho chemické složky u večerního, ranního a celkového výdojku. Technological properties of milk and its chemical components in evening, morning and total milking. (In Czech) *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, 1984, 3, 5-9.
- BRAUNER, J.- HANUŠ, O.: Vzájemné vztahy technologických vlastností mléka a počtu somatických buněk vzhledem k jeho zpracovatelnosti. Mutual relations of technological properties of milk and somatic cell count with respect to its processability. (In Czech) *Průmysl potravin*, 1985, 10, 97-100.
- CERMANOVÁ, I.- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- VYLETĚLOVÁ, M.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Effect of organic farming on selected raw cow milk components and properties. Vliv ekologického hospodaření na vybrané složky a vlastnosti syrového kravského mléka. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, ISSN 1211-8516, LIX, 6, 2011, 81-92.
- DOLEŽAL, O.- HLÁSNÝ, J.- JÍLEK, F.- HANUŠ, O.- VEGRICHT, J.- PYTLOUN, J.- MATOUŠ, E.- KVAPILÍK, J.: Složení a kvalita mléka. *Odborná publikace „Mléko, dojení, dojírny“*, kap. 4 *Agrospoj Praha, 2000, 239.*
- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.: Sezónní dynamika fyzikálních a technologických vlastností individuálních vzorků kravského mléka. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, 1998, 3, 11-16.
- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- BEBER, K.- KOPECKÝ, J.- HAVLÍČKOVÁ, K.: Vztah alkoholové stability kravského mléka k některým mléčným složkám a faktorům prvovýroby. Relationship between alcohol stability of cow's milk and some components and factors of primary production. (In Czech) *Živočišná Výroba / Czech Journal of Animal Science*, 1993, 38, 9, 837-848.
- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- HRDINOVÁ, E.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Vztahy kysací schopnosti a dalších technologických vlastností k vybraným parametrům mléka. Relationships of fermentation and other technological characteristics to selected parameters of milk. *Živočišná Výroba / Czech Journal of Animal Science*, 1997, 42, 8, 375-382.
- HANUŠ, O.: Krátké chronologické shrnutí některých kvalitativních znaků bazénového mléka v oblasti mlékárny KDV Zábřeh na Moravě. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, 1992, 3, 21-23.
- HANUŠ, O.- BEBER, K.- FICNAR, J.- GENČUROVÁ, V.- GABRIEL, B.- BERANOVÁ, A.: Vztahy mezi kysací schopností bazénového kravského mléka, jeho složením a obsahem některých metabolitů. Relationship between the fermentation of bulk milk sample, its composition and contents of some metabolites. *Živočišná Výroba / Czech Journal of Animal Science*, 1993 a, 38, 7, 635-644.
- HANUŠ, O.- BENDA, P.- GENČUROVÁ, V.: Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. I. ověření bakteriostatických a baktericidních vlastností a interferenčního vlivu. Tests of Milkofix a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. Part I. Checks of bacteriostatic and bactericidal abilities and interferential effect. *Veterinární medicína*, 1992 a, 37, 1, ISSN 0375-8427, 21-31.

- HANUŠ, O.- BJELKA, M.- TICHÁČEK, A.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Analýza nezbytnosti a účelnosti transformací dat u souborů výsledků některých mléčných parametrů. Substantiation and usefulness of transformations in data sets of analyzed milk parameters. In *Chov a šlechtění skotu pro konkurenceschopnou výrobu: sborník referátů VÚCHS Rapotín*, In *Rearing and breeding of cattle for competitionable production: proceedings of the seminar VÚCHS Rapotín*, 2001, 122-137.
- HANUŠ, O.- ČERNÝ, V.- FRELICH, J.- BJELKA, M.- POZDÍŠEK, J.- NEDĚLNÍK, J.- VYLETĚLOVÁ, M.: Vlivy nadmořské výšky lokality na některé chemické, zdravotní, mikrobiologické, fyzikální a technologické ukazatele kravského mléka a senzorní vlastnosti sýrů. The effects of over sea height of locality on some chemical, health, microbiological, physical and technological parameters of cow milk and sensorial properties of cheeses. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, LIII, 2, ISSN 1211-8516, 2005, 19-32.
- HANUŠ, O.- FOLTYS, V.: Některé vlastnosti a minerální složky mléka plemen skotu v Československu. Some characteristics and mineral components of milk of cattle breeds kept in Czechoslovakia. *Živočišná Výroba / Czech Journal of Animal Science*, 1991, 36, 6, 497-505.
- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- JANŮ, L.- MACEK, A.- ZAJÍČKOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Impact of different milk yields of cows on milk quality in Bohemian spotted cattle. *Acta Veterinaria Brno*, 76, 4, 2007 a, ISSN 1801-7576, 563-571.
- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- VYLETĚLOVÁ, M.- ROUBAL, P.- VORLÍČEK, Z.- JEDELSKÁ, R.: Technologically difficult, pathogenic and food risky bacterial contamination of raw milk and other materials from dairy cow herds. *Czech Journal of Animal Science*, 49, 2004, 11, 489-499.
- HANUŠ, O.- GAJDŮŠEK, S.- BEBER, K.- FICNAR, J.- JEDELSKÁ, R.: Složení a technologické vlastnosti mléka od dojníc ve střední části laktace a jejich vzájemné vztahy. Composition and technological properties of milk from dairy cows in the middle stage of lactation and their interrelationships. *Živočišná Výroba / Czech Journal of Animal Science*, 1995, 40, 12, 555-561.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- GABRIEL, B.: Vliv stárnutí vzorků na přesnost infračervené analýzy základního složení mléka. The effect of sample aging on the accuracy of an infrared analysis of basic milk composition. *Veterinární medicína*, 1992 b, 37, 3, ISSN 0375-8427, 149-160.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- JEDELSKÁ, R.: Rámcové představení hlavních prvků systému QA u chemických a fyzikálních metod v referenčních a rutinních laboratořích pro analýzy kvality syrového mléka v ČR. A framework performance of main elements of QA system of chemical and physical methods in reference and routine laboratories for raw milk quality analyses in the CR. Sborník přednášek, 2 THETA Analytical standards and equipment, Zajištění kvality analytických výsledků, ISBN: 978-80-86380-37-7, Komorní Lhotka, 2007 c, 33-50.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- PONÍŽIL, A.- HLÁSNÝ, K.- GABRIEL, B.- MÍČOVÁ, Z.: Vliv ročního období, přídatku močoviny, acetonu a dusičnanů a přirozeného obsahu mikroprvků na kysací schopnost kravského mléka. The effects of year season, urea, acetone and nitrate additions and native content of microelements on cow's milk fermentation. *Živočišná Výroba / Czech Journal of Animal Science*, 1993 b, 38, 8, 753-762.

- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ŘÍHA, J.- VYLETĚLOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Specifika referenčních materiálů a výkonnostního testování způsobilosti výsledků u základních mlékařských analýz. Specificity of reference materials and results proficiency testing in basic milk analyses. In proceedings: Referenční materiály a mezilaboratorní porovnávání zkoušek III. Reference materials and interlaboratory investigation comparison III. Mezinárodní konference, 2 THETA Analytical standards and equipment, Medlov, ISBN: 978-80-86380-46-9, 2008 a, 53-78.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ŠTOLC, L.- HULOVÁ, I.- MOTYČKA, Z.- KLIMEŠ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Zajištění kvality stanovení minoritních metabolicko-diagnostických složek mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT). Quality assurance of investigation of minority metabolic diagnostic milk components via method of infrared spectroscopy (MIR and MIR-FT). Sborník přednášek, 2 THETA Analytical standards and equipment, Zajištění kvality analytických výsledků, ISBN: 978-80-86380-49-0, Komorní Lhotka, 2009 c, 211-237.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ZHANG, Y.- HERING, P.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.- MOTYČKA, Z.: Milk acetone determination by the photometrical method after microdiffusion and via FT infra-red spectroscopy. Stanovení acetonu v mléce fotometricky po mikrodifúzi a pomocí infračervené spektroskopie FT. *Journal of Agrobiology*, 28, 1, ISSN 1803-4403, 2011 a, 33-48.
- HANUŠ, O.- HERING, P.- FRELICH, J.- JÍLEK, M.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Reliability of milk urea analyse results by various methods in use of artificial milk control samples. *Czech Journal of Animal Science*, 53, 4, 2008 b, 156-165.
- HANUŠ, O.- HULOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- ŠTOLC, L.- KUČERA, J.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- MOTYČKA, Z.: Interpretace výsledků pokusné kalibrace pro stanovení kyseliny citronové v mléce infračervenou spektroskopií (MIR-FT). Result interpretation of experimental calibration for milk citric acid determination via infra-red spectroscopy (MIR-FT). (In Czech) *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, ISSN 1211-8516, LVII, 5, 2009 a, 87-101.
- HANUŠ, O.- JANŮ, L.- VYLETĚLOVÁ, M.- KUČERA, J.: Research and development of a synthetic quality indicator for raw milk assessment. Výzkum a vývoj syntetického ukazatele kvality pro hodnocení syrového mléka. *Folia Veterinaria*, 53, 2, ISSN 0015-5748, 2009 b, 90-100.
- HANUŠ, O.- JANŮ, L.- VYLETĚLOVÁ, M.- MACEK, A.: Validace použitelnosti algoritmu relativního syntetického ukazatele kvality syrového mléka (SQSM) pro konzistentní modifikaci farmářské ceny. A validation of algorithm practicability of the relative synthetic raw milk quality indicator (SQSM) for consistent modification of farmer price. (In Czech) *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, ISSN 1211-8516, LV, 5, 2007 b, 71-82.
- HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- KOPECKÝ, J.: Konstrukce algoritmu pro efektivní sofistikované grafické vyhodnocování výsledků složení a kvality bazénových vzorků mléka. The algorithm construction for an effective and sophisticated evaluation of the results of the bulk milk sample composition and quality. *Výzkum v chovu skotu, XLVIII, 175*, ISSN 0139-7265, 3, 2006, 1-26.
- HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: V mlékařství vše začíná a končí u ukazatele kyselosti. In dairy everything starts and ends at the acidity indicator. *Fenotyp DKU.CZ, Odborné informace, zprávy a zajímavosti pro chovatele*, 2, 2021, 10-15.
- HANUŠ, O.- KUČERA, J.- ŘÍHA, J.- HEGEDUŠOVÁ, Z.- JEDELSKÁ, R.: Význam hodnoty titrační kyselosti mléka nyní a dříve – část II. Importance of the titratable acidity value of milk now and before – part II. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 32, 186, 3, ISSN 1212-950X, 2021, 1-8.

- HANUŠ, O.- KUČERA, J.- YONG, T.- CHLÁDEK, G.- HOLÁSEK, R.- TRÍNÁCTÝ, J.- GENČUROVÁ, V.- SOJKOVÁ, K.: Effect of sires on wide scale of milk indicators in first calving Czech Fleckvieh cows. Vliv otců na širokou škálu mléčných ukazatelů u prvotelek Českého strakatého plemene. *Archiv Tierzucht / Archives Animal Breeding*, 54, 1, ISSN 003-9438, 2011 b, 36-50.
- HANUŠ, O.- PITNEROVÁ, J.: Hodnota titrační kyselosti kravského mléka ve vztahu k některým faktorům. The titratable acid value of cow 's milk in relation to some factors. (In Czech) *Náš chov*, 1987, 12, 2-4.
- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- KLIMEŠOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- HEGEDUŠOVÁ, Z.: Retrospektivní analýza trendů vývoje doживosti a kvality syrového kravského mléka v České republice. Retrospective analysis of trends in yield and quality of raw cow milk in the Czech Republic. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 30, 172, 1, ISSN 1212-950X, 2019, 4-11.
- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- ŘÍHA, J.- VYLETĚLOVÁ KLIMEŠOVÁ, M.- SAMKOVÁ, E.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Development in indirect infra-red determination of milk acetone. Vývoj v nepřímém infračerveném určení acetonu v mléce. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendeliana Brunensis*, 62, 5, ISSN 1211-8516, 2014 a, 919-927.
- HANUŠ, O.- RYSOVÁ, L.- NĚMEČKOVÁ, I.- LEGAROVÁ, V.- KUČERA, J.- KLIMEŠOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- NEJESCHLEBOVÁ, L.: Změny technologických vlastností mléka malých přežvýkavců v důsledku falšování mlékem kravským. Changes in the technological properties of small ruminant milk as a result of adulteration by cow milk. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 31, 183, 6, ISSN 1212-950X, 2020, 4-13.
- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- KUČERA, J.- HEGEDUŠOVÁ, Z.- JEDELSKÁ, R.: Význam hodnoty titrační kyselosti mléka dříve a nyní – část I. Importance of the titratable acidity value of milk before and now – part I. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 32, 185, 2, ISSN 1212-950X, 2021, 1-7.
- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- NEJESCHLEBOVÁ, H.- RYSOVÁ, L.- LEGAROVÁ, V.- TICHOVSKÝ, P.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Změny technologických vlastností mléka a jeho IR spekter při významné redukci počtu somatických buněk. Changes in the technological properties of milk and its IR spectrum with a significant reduction in the somatic cell count. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 32, 189, 6, ISSN 1212-950X, 2021, 15-23.
- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- SAMKOVÁ, E.- LEDVINA, D.- CHLÁDEK, G.- KUČERA, J.- ROUBAL, P.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: A comparison of result reliability for investigation of milk composition by alternative analytical methods in Czech Republic. Srovnání věrohodnosti výsledků pro vyšetření složení mléka pomocí alternativních analytických metod v České republice. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendeliana Brunensis*, 62, 5, ISSN 1211-8516, 2014 b, 929-937.
- HANUŠ, O.- SAMKOVÁ, E.- ŘÍHA, J.- VYLETĚLOVÁ - KLIMEŠOVÁ, M.- ROUBAL, P.: Evaluation of development in indirect determination of milk fat free fatty acids in Czech Republic. Hodnocení vývoje v nepřímém stanovení volných mastných kyselin mléčného tuku v České republice. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendeliana Brunensis*, LXI, 6, ISSN 1211-8516, 2013, 1669-1679.
- HANUŠ, O.- VORLÍČEK, Z.- SOJKOVÁ, K.- ROZSYPAL, R.- VYLETĚLOVÁ, M.- ROUBAL, P.- GENČUROVÁ, V.- POZDÍŠEK, J.- LANDOVÁ, H.: A comparison of selected milk indicators in organic herds with conventional herd as reference. *Folia Veterinaria*, 52, ISSN 0015-5748, 3-4, 2008 c, 155-159.

- HANUŠ, O.- YONG, T.- KUČERA, J.- GENČUROVÁ, V.- HANUŠOVÁ, K.- KOPEC, T.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Analýza výsledků kalibrací pro stanovení kaseinu nepřímou metodou infračervené spektroskopie. Analysis of calibration results for casein determination via indirect method of infrared spectroscopy. (In Czech) *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendeliana Brunensis*, ISSN 1211-8516, LVIII, 5, 2010, 123-136.
- HANUŠ, O.- ŽVÁČKOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- GABRIEL, B.: Vztah obsahu laktózy v mléce k ukazatelům zdravotního stavu mléčné žlázy v první třetině laktace. A relationship between milk lactose content and indicators of the mammary gland health in the first third of lactation. (In Czech) *Veterinární Medicína (Praha)*, 1992 c, 37, 11, ISSN 0375-8427, 595-604.
- HERING, P.- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- PYTLOUN, J.- MACEK, A.- JANŮ, L.- KOPECKÝ, J.: Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech Journal of Animal Science*, 53, 2, 2008, 64-76.
- JANŮ, L.- HANUŠ, O.- BAUMGARTNER, C.- MACEK, A.- JEDELSKÁ, R.: The analysis of state, dynamics and properties of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. Analýza stavu, dynamiky a vlastností ukazatelů kvality syrového kravského mléka v České republice. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 10, 3, ISSN 1335-258X, 2007 a, 74-85.
- JANŮ, L.- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- MACEK, A.- ZAJÍČKOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Influences of different milk yields of Holstein cows on milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, 76, 4, 2007 b, ISSN 1801-7576, 553-561.
- KALA, R.- SAMKOVÁ, E.- HANUŠ, O.- PECOVÁ, L.- SEKMOKAS, K.- RIAUKIENÉ, D.: Milk protein analysis: An overview of the methods – development and application. Analýza mléčných bílkovin: přehled metod – vývoj a použití. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeliana Brunensis*, 67, 1, ISSN 1211-8516, 2019, 345-359.
- KALA, R.- SAMKOVÁ, E.- PECOVÁ, L.- HANUŠ, O.- SEKMOKAS, K.- RIAUKIENÉ, D.: An overview of determination of milk fat: development, quality control measures, and application. Přehled určení mléčného tuku: vývoj, opatření kontroly kvality a použití. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendeliana Brunensis*, 66, 4, ISSN 1211-8516, 2018, 1055-1064.
- KLIMEŠOVÁ, M.- NEJESCHLEBOVÁ, H.- HANUŠ, O.- VORLOVÁ, L.- NECIDOVÁ, L.- BURSOVÁ, Š.- NEJESCHLEBOVÁ, L.- VONDRUŠKOVÁ, E.- KOPECKÝ, J.: Vliv teploty na vybrané ukazatele syrového mléka. Effect of temperature on selected raw milk indicators. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 33, 194, 5, ISSN 1212-950X, 2022, 16-22.
- ŘÍHA, J.- HANUŠ, O.- KLEINOVÁ, M.- KOPUNECZ, P.- ROUBAL, P.- KOLÁŘ, A.- KOPECKÝ, J.: Milk urea analytical result reliability and its methodical possibilities in the Czech Republic. Věrohodnost analytických výsledků mléčné močoviny a její metodické možnosti v České republice. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendeliana Brunensis*, LXI, 1, 2013, ISSN 1211-8516, 169-186.
- SAMKOVÁ, E. et al. (CEMPÍRKOVÁ, R., HANUŠ, O., HASOŇOVÁ, L., HLAVÁČEK, J., JELEN, P., JEŘÁBKOVÁ, J., KOPÁČEK, J., LUŽOVÁ, T., NAVRÁTILOVÁ, P., SEYDLOVÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., ŠPIČKA, J., VORLOVÁ, L., VYLETĚLOVÁ, M.): Mléko: produkce a kvalita. Milk: production and quality. Vědecká monografie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ, M.: 5. Jakostní ukazatele mléka. 5.11. Technologické vlastnosti mléka. 5. Milk quality indicators. 5.11. Milk technological properties. 168-177; ISBN: 978-80-7394-383-7, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2012, 240.

- SAMKOVÁ, E.- HANUŠ, O.- ŠPIČKA, J.- PECOVÁ, L.- BEDRNÍČEK, J.- KOPUNECZ, P.- KLÍMOVÁ, Z.- KOPECKÝ, J.: Routine determination of milk fat composition for nutritional and technological purposes. Rutinní stanovení složení mléčného tuku pro výživové a technologické účely. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 67, 6, ISSN 1211-8516, 2019, 1485-1491.
- SAMKOVÁ, E.- ŠPIČKA, J.- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- PECOVÁ, L.- HASOŇOVÁ, L.- SMETANA, P.- KLIMEŠOVÁ, M.- ČÍTEK, J.: Comparison of fatty acid proportions determined by mid-infrared spectroscopy and gas chromatography in bulk and individual milk samples. Porovnání podílů mastných kyselin určených infračervenou spektroskopií ve středové oblasti a plynovou chromatografií v bazénových a individuálních vzorcích mléka. *Animals*, 2020, 10, 6, 1095, ISSN 2076-2615.
- SEYDLOVÁ, R.- ROUBAL, P.- JEDELSKÁ, R.- HANUŠ, O.- KLIMEŠOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.: Workshop Česká Rybná 21. 10. 2020 Nebakteriální původci mastitid a jejich vliv na kvalitu a technologické vlastnosti mléka – výsledky projektu NEBAKMAS QK1910092 NAZV MZe (elektronickou formou) s odbornou chovatelskou veřejností v procesu získávání (dojení) mléka v prvovýrobě. PP prezentace HANUŠ O.- SEYDLOVÁ, R.- KOPECKÝ J.- ROUBAL, P.- JEDELSKÁ R.- NEJESCHLEBOVÁ L.- KLIMEŠOVÁ, M.: Možný vliv subklinických mastitid zapříčiněných řasou *Prototheca* na složení a kvalitu mléka. 2020.
- SOJKOVÁ, K.- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- GENČUROVÁ, V.- HULOVÁ, I.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Impacts of lactation physiology at higher and average yield on composition, properties and health indicators of milk in Holstein breed. Vlivy fyziologie laktace při vyšší a průměrné užitkovosti na složení, vlastnosti a zdravotní ukazatele mléka dojníc holštýnského plemene skotu. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 1, ISSN 1211-3174, 2010 a, 21-28.
- SOJKOVÁ, K.- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- YONG, T.- HULOVÁ, I.- VYLETĚLOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: A comparison of lactation physiology effects at high and lower yield on components, properties and health state indicators of milk in Czech Fleckvieh. Srovnání vlivů fyziologie laktace při vysoké a nižší užitkovosti na složky, vlastnosti a zdravotní ukazatele mléka u Českého strakatého plemene. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 2, ISSN 1211-3174, 2010 b, 84-91.

Předchozí tematicky relevantní metodiky k problematice stanovení složek a vlastností mléka metodou infračervené spektroskopie a kontroly kvality mlékařských analýz:

- UPLATNĚNÁ METODIKA QF 3019 UM 1 - Adjustační principy a postupy – centrální adjustace rutinních měření chemických složek v mléčných laboratořích. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci uplatněné metodiky mezi Výzkumným ústavem pro chov skotu, s.r.o., Rapotín a ČMSCH a.s., Praha, z 12.12.2006 a. HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.
- UPLATNĚNÁ METODIKA QF 3019 UM 2 - Principy a postupy výkonnostního testování analytické způsobilosti měření chemického složení v mléčných laboratořích. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci uplatněné metodiky mezi Výzkumným ústavem pro chov skotu, s.r.o., Rapotín a ČMSCH a.s., Praha, z 12.12.2006 b. HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.
- UPLATNĚNÁ METODIKA MSM 2678846201 UM 1 - název: Postup při adjustaci a kontrole různých metod stanovení koncentrace močoviny v mléce v mléčných laboratořích. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci uplatněné metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 12.12.2006. HANUŠ, O.- HERING, P.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.

- UPLATNĚNÁ METODIKA QF 3019 UM 5 - název: Příprava referenčního standardu pro kalibraci infraanalýzy mléka se sníženým obsahem hlavních komponent mléka jako dolními hodnotami kalibračních přímek a s vybalancovanou změnou interferenčního vlivu mléčné matrice. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci uplatněné metodiky mezi Výzkumným ústavem pro chov skotu v Rapotíně a ČMSCH a.s., Praha, z 11.04.2008. HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA MSM 2678846201 CM 6 - název: Referenční materiál pro adjustaci určení kyseliny citrónové pomocí MIR-FT infraanalýzy mléka. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 13.08.2009. Datum certifikace 30.09.2009. HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- HULOVÁ, I.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.- GENČUROVÁ, V.- SOJKOVÁ, K.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA MSM 2678846201 CM 7 - název: Metodika validace a odhadu nejistoty výsledků měření u minoritních složek a vlastností mléka pro nepřímé metody MIR a MIR-FT v laboratořích kontroly užítkovosti a kvality mléka. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 13. 8. 2009. Datum certifikace 30.09.2009. HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.- SOJKOVÁ, K.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA MSM 2678846201 CM 10 - název: Kalibrace metod MIR a MIR-FT v laboratořích kvality mléka za účelem měření koncentrace volných mastných kyselin (VMK) v mléčném tuku. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 10.09.2009. Datum certifikace 30.09.2009. HANUŠ, O.- HULOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA MSM 2678846201 CM 11 - název: Příprava referenčních vzorků, posouzení kvality kalibrace a výkonnostní testy stanovení kaseinu metodou infračervené spektroskopie FT v mléčných laboratořích. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 31.03.02010. Datum certifikace 08.12.2010. HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- LANDOVÁ, H.- SOJKOVÁ, K.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA MSM 2678846201 MSM 2672286101 CM 18 - název: Příprava referenčních vzorků a posouzení kvality kalibrace pro stanovení ketonů jako acetonu metodou infračervené spektroskopie FT v mléčných laboratořích. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským, s.r.o. Praha a ČMSCH a.s., z 27.09.2011. Datum certifikace 13.12.2011. HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- VYLETĚLOVÁ, M.- ELICH, O.- JEDELSKÁ, R.- HÖFER, J.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA MSM 2678846201 MSM 2672286101 CM 20 - název: Efektivní kalibrace techniky MIR-FT pro měření močoviny v mléčných laboratořích na bázi referenčních hodnot výkonnostních testů. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským, s.r.o., Praha a ČMSCH a.s., z 27.09.2011. Datum certifikace 12.12.2011. HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- GENČUROVÁ, V.- ELICH, O.- KOPECKÝ, J.- HÖFER, J.

- CERTIFIKOVANÁ METODIKA INGO LA 09030 CM 21 - název: Efektivní kalibrace techniky MIR-FT pro screening hodnoty ekvivalentu bodu mrznutí mléka v mléčných laboratořích na bázi referenčních hodnot výkonnostních testů. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským, s.r.o., Praha a ČMSCH a.s., z 16.11.2012. Datum certifikace 28.12.2012. HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- VYLETĚLOVÁ, M.- ELICH, O.- KOPECKÝ, J.- HÖFER, J.- SNÁŠELOVÁ, J.- SEYDLOVÁ, R.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA QJ1510336 RO1417 CM 35 – název: Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Českomoravskou společností chovatelů a. s. z 27. 9. 2017. Datum certifikace 22.12.2017. SAMKOVÁ, E.- HANUŠ, O.- ŠPIČKA, J.- KLIMEŠOVÁ, M.- HASOŇOVÁ, L.- JEDELSKÁ, R.- TRÁVNÍČEK, J.- KOPECKÝ, J.- KALA, R.- ELICH, O.

Ne všechny práce ze seznamu literatury (5, 6), jejichž studium a poznatky byly využity ve vývoji metodiky, jsou citovány explicitně v textu vlastní metodiky pro praxi. Jsou však pro úplnost uvedeny v seznamu výše.

Většina vlastních prací, použitá při tvorbě této metodiky, byla předtím již samostatně odborně oponována, jak plyne ze seznamu výše.

Přílohy, dokumenty a doklady:

technická řešení a postupy této metodiky byly zejména podpořeny výsledky vlastního výzkumu, vývoje a empirických poznatků, které byly publikovány.

Datum: 14.08.2023

Za zhotovitele:

Mgr. Hana Nejeschlebová



7) Přílohové materiály s podklady pro validaci kalibračních modelů odhadu TKM pomocí MIR-FT v rámci metodiky

Titrační kyselost mléka - analýza reálných možností kolísání hodnot SH

Titrační kyselost se vyjadřuje ve stupních Soxhlet-Henkela (SH, titrace roztokem NaOH v ml 0,25 mol/100ml (v ml \times 2,5 mmol.l⁻¹)). Je tak ukazatelem kyselosti složek mléka (nativní SH) a pak, po uložení mléka, také získané kyselosti (získané SH) nestandardními procesy, např. při skladování nebo vyšší bakteriální kontaminaci (zhoršené hygieně dojení nebo uložení a transportu) – rozkladem (kysnutím).

SH je významné pro technologické zpracování mléka (sýrařství (koagulace) i fermentované mléčné výrobky), ale i pro trvanlivost mléka (konzumní mléko).

Pufrační kapacita mléka je silnější v oblasti kyselé než alkalické. Proto když vzroste kyselost mléka, např. rozkladem laktózy bakteriální činností, zatímco hodnota pH ještě neklesá, hodnota SH již vzrůstá. Reaguje tedy citlivěji.

SH ovlivňuje řada faktorů, závisí na kyselé reakci organických kyselin, solí a bílkovinných molekulárních konců, které určují nativní hodnotu SH. Proto, **čím více bílkovin (Tabulka), tím vyšší SH mléka a naopak, neboť bílkoviny tvoří až 1/3 nativní kyselé reakce mléka.**

SH pak může vzrůstat kysnutím mléka (bakteriální rozklad laktobacily) nebo kyselými příměsí (dezinfekční prostředky), a nebo může klesat prostřednictvím alkalických příměsí (dezinfekční prostředky). SH také reaguje na metabolický stav (normální, metabolická acidóza nebo alkalóza) zvířete a tedy jeho výživu, tedy následné složení mléka. Např. energetický deficit výživy dojníc značí méně bílkovin v mléce a nižší nativní SH.

SH kolísá normálně na velkých souborech bazénových vzorků mléka obou plemen (Holštýn (H) a České strakaté (C nebo CF) – převažující populace dojníc v ČR) kolem průměru 7,39 \pm 0,86 a 7,13 \pm 0,92 (plemeno C a H, Tabulka). Variační koeficient tak činí 11,7 až 12,9 %. Variabilita však platí pro individuální, nikoliv bazénové vzorky mléka.

SH jsme také sledovali u individuálních vzorků mléka podle dojivosti krav (nižší a vyšší u plemen CF a H) ve dvou příložených pracích (viz přílohy Sojková et al., 2010 a, b), kde v tabulkách jsou uvedeny průměrné hodnoty a jejich variabilita, v součtu jde asi o 900 krav z osmi stád za dobu dvou roků. I zde je jasně patrné, vyšší obsah bílkovin, vyšší nativní SH, podle plemen i uvnitř plemen podle dojivosti.

Uvedené hodnoty neodpovídají maximální hodnotě SH 6,8 resp. možnému kolísání 6,2 až 6,8, i když může při vyšetření sehrávat jistou roli subjektivně specifická citlivost lidského oka na srovnání barev (ukončení titrace při růžové barvě srovnávané na příslušný barevný standard podle metody pro odečet spotřeby) u konkrétní osoby provádějící analýzy.

SH určuje platná, ale nezávazná, norma ČSN 57 0529 od 6,2 do 7,8 SH. Historicky to bylo i od 6 do 8 SH. Tento materiál by tedy měl sloužit jako standardní požadavek.

Toto standardní rozpětí určené ČSN 57 0529 přibližně potvrzují i příložené vyhodnocené pokusné soubory. Při použití maximální hodnoty SH 6,8 jako standardu pro bazénové mléko bych odhadoval frekvenci výskytu nestandardních dodávek kolem 30 % a možná i výše.

Jakýkoliv jiný požadavek by měl být doložen relevantním statistickým vyhodnocením aktuálního stavu v dané oblasti, v celé šíři variability a analýze vlivných faktorů. Takový datový soubor by na principu konvenční statistiky a případně Gaussova modelu měl definovat co je normální obor variability na hladině pravděpodobnosti 95 %, tedy stření hodnota (aritmetický průměr nebo medián, neboť soubory SH jsou charakterizovány v podstatě normální frekvenční distribucí) plus mínus dvojnásobek zjištěné, tedy relevantní směrodatné odchylky. Tedy jiný požadavek, než standardní (normovaný, ČSN 57 0529) pro naše podmínky, by měl být takto potvrzen, takto validován a tím obhájen jako reálný.

Vyjádření zpracoval: 12.07.2012 Oto Hanuš

Výzkumný ústav pro chov skotu Rapotín a Výzkumný ústav mlékárenský Praha, vedoucí akreditované Národní referenční laboratoře pro syrové mléko a referenční laboratoře pracovní síť ICAR – pro Svaz výrobců mléka a.s. Šumperk

Tabulka: Složení a vlastnosti kravského mléka v ČR (Hanuš et al., 2003, 2004).

Parametry	C			H		
	x	sx	vx	x	sx	vx
ML	25,7	8,1	31,6	26,7	7,8	29,3
Tuk	4,06	0,95	23,45	3,80	0,88	23,11
Lak	4,95	0,20	4,03	4,96	0,23	4,58
STP	8,89	0,34	3,87	8,74	0,38	4,35
SUŠ						
log PSB	60 xg	–	29,2	101 xg	–	28,6
Mo	29,9	11,7	39,2	22,8	11,4	49,8
log Ac	1,99 xg	–	134,9	2,16 xg	–	119,6
Vod	4,29	0,50	11,55	4,43	0,53	12,07
Alk	1,5	0,99	65,78	1,51	1,04	68,93
SH	7,39	0,86	11,65	7,13	0,92	12,93
pH	6,71	0,14	2,07	6,72	0,14	2,08
Čas	107,87	47,77	44,28	113,63	57,62	50,71
PEV	15,81	3,41	21,56	16,38	3,37	20,57
HB	3,4	0,32	9,55	3,23	0,35	10,86
KAS	2,7	0,28	10,46	2,55	0,29	11,54
ČB	3,21	0,31	9,66	3,06	0,33	10,68
SB	0,51	0,10	18,79	0,50	0,09	18,37
NNL	0,19	0,06	31,66	0,17	0,06	38,08
MNN	46,75	16,86	36,07	41,13	16,48	40,06
T/HB	1,19	0,27	22,52	1,18	0,28	23,67
KAC- HB	79,39	2,89	3,63	79,15	2,96	3,74
KAC- ČB	84,16	2,69	3,19	83,45	2,69	3,23

C = České strakaté plemeno; H = Holštýnské plemeno; x = aritmetický průměr; sx = směrodatná odchylka; vx = variační koeficient; ML = doživost (kg mléka/den); Tuk = tuk (%; g/100 ml); Lak = laktóza (monohydrát; g/100g; %); STP = sušina tukuprostá (g/100g; %); PSB = počet somatických buněk (tis./ml); Mo = koncentrace močoviny (mg/100ml); Ac = koncentrace acetonu (mg/l); Vod = vodivost, resp. elektrická konduktivita (mS/cm); Alk = alkoholová stabilita (spotřeba v ml 96% etanolu při srážení 5 ml mléka pro C a H a poměr objem alkohol/mléko u K); **SH = titrační kyselost (ml×2,5 mmol/l roztoku NaOH); pH = aktivní kyselost; Čas = čas koagulace syřidlem (sec.); PEV = pevnost sýřeniny = hloubka průniku standardně padajícího tělíška sýřeninou, tzn., že vyjadřuje opačný vztah k pevnosti (mm); HB = hrubé bílkoviny (Kjeldahl, celkový N×6,38; g/100g; %); KAS = kasein (Kjeldahl, kaseinový N×6,38; g/100g; %); ČB = čisté bílkoviny (Kjeldahl, bílkovinný N×6,38; g/100g; %); SB = syrovátkové bílkoviny (diference ČB-KAS; g/100g; %); NNL = nebílkovinné dusíkaté látky (dusík HB-ČB×6,38; g/100g; %); MNN = podíl dusíku močoviny v nebílkovinném dusíku (%); T/HB = poměr tuku a hrubých bílkovin. Dále byla vypočtena kaseinová čísla jako možné ukazatele sýrařské výtěžnosti mléka na bázi hrubých a čistých bílkovin v %: KAC-**HB**; KAC-**ČB**.**

Příloha 2 CM 40 2023

Statistická metodika, kalibrace MIR-FT (DairySpec) na odhad hodnot SH

Základní statistika souboru „DairySpec-a-SH-valid-kval-odhad-2022“ pro n = 207, tj. 1. (původní mléko);

Všechny vzorky měly Inhibiční látky negativní

Č.vz.	SH kor. °SH	Vodivost mS×cm ⁻¹	pH	SB 10 ³ ×ml ⁻¹	log SB	Tuk %	Bilk. %	Lakt. %	TPS %	Kas. %
<i>n</i>	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207
<i>x</i>	7,28	4,46	6,75	204	2,2565	4,03	3,48	4,99	9,10	2,77
<i>g</i>					181					
<i>sx_v</i>	0,566	0,165	0,059	103	0,2161	0,294	0,176	0,086	0,199	0,216
<i>vx_v</i>	7,8	3,7	0,9	50,5		7,3	5,1	1,7	2,2	7,8
<i>sx</i>	0,565	0,165	0,059	103	0,2155	0,293	0,176	0,086	0,198	0,216
<i>vx</i>	7,8	3,7	0,9	50,5		7,3	5,1	1,7	2,2	7,8
<i>min</i>	5,47	3,85	6,59	40	1,6021	3,40	3,02	4,62	8,22	2,21
<i>max</i>	9,04	5,03	6,93	658	2,8182	5,15	3,84	5,22	9,45	3,20
<i>Rmax-min</i>	3,57	1,18	0,34	618	1,2161	1,75	0,82	0,60	1,23	0,99
<i>medián</i>	7,35	4,46	6,75	186	2,2695	4,01	3,48	5,00	9,12	2,78
<i>horní q</i>	6,94	4,40	6,71	133	2,1223	3,86	3,38	4,94	8,98	2,64
<i>dolní q</i>	7,60	4,51	6,79	251	2,3997	4,20	3,62	5,04	9,23	2,94

Č.vz.	Moč. mg/l	BMM-P -m°C	CPM	log CPM	VMK mmol/100gT	odhad SH MIR-FT $y = x \times 0,4483153 + 4,0158148$
<i>n</i>	207	207	207	207	207	207
<i>x</i>	256	541	18	0,9348	0,7895	7,28
<i>g</i>				9		
<i>sx_v</i>	80	22	61	0,3398	0,2442	0,254
<i>vx_v</i>	31,3	4,1	338,9		30,9	3,5
<i>sx</i>	80	22	61	0,3389	0,2436	0,253
<i>vx</i>	31,3	4,1	338,9	36,3	30,9	3,5
<i>min</i>	55	496	5	0,6990	0,2580	6,47
<i>max</i>	464	573	599	2,7774	1,5320	8,07
<i>Rmax-min</i>	409	77	594	2,0784	1,2740	1,60
<i>medián</i>	254	554	7	0,8451	0,7560	7,31
<i>horní q</i>	207	519	5	0,6990	0,6265	7,13
<i>dolní q</i>	306	560	10	1,0000	0,9145	7,42

odhad MIR-FT SH – ref SH

<i>n</i>	207
<i>d</i>	0,00
<i>sd_v</i>	0,313
<i>sd</i>	0,312
<i>min</i>	-0,97
<i>max</i>	1,00

Základní statistika souboru „DairySpec-a-SH-valid-kval-odhad-2022“ pro n = 414, tj. 2. (všechny vzorky mléka, původní a modifikované);

Všechny vzorky měly Inhibiční látky negativní

	SH kor. °SH	Vodivost mS×cm ⁻¹	pH	SB 10 ³ ×ml ⁻¹	log SB	Tuk %	Bilk. %	Lakt. %	TPS %	Kas. %
<i>n</i>	414	414	414	207	207	414	414	414	414	414
<i>x</i>	10,52	4,67	6,50	204	2,2565	4,02	3,50	4,92	9,07	2,78
<i>g</i>					181					
<i>sx_v</i>	5,904	0,384	0,464	103	0,2161	0,286	0,181	0,152	0,273	0,236
<i>vx_v</i>	56,1	8,2	7,1	50,5		7,1	5,2	3,1	3,0	8,5
<i>sx</i>	5,897	0,384	0,464	103	0,2155	0,286	0,181	0,152	0,273	0,236
<i>vx</i>	56,1	8,2	7,1	50,5		7,1	5,2	3,1	3,0	8,5
<i>min</i>	5,47	3,85	2,65	40	1,6021	3,38	3,02	4,26	5,85	2,16
<i>max</i>	33,81	6,40	6,93	658	2,8182	5,15	4,06	5,22	9,46	3,63
<i>Rmax-min</i>	28,34	2,55	4,28	618	1,2161	1,77	1,04	0,96	3,61	1,47
<i>medián</i>	7,76	4,55	6,67	186	2,2695	4,01	3,50	4,96	9,11	2,79
<i>horní q</i>	7,23	4,44	6,44	133	2,1223	3,84	3,38	4,87	8,96	2,64
<i>dolní q</i>	11,65	4,80	6,75	251	2,3997	4,19	3,64	5,03	9,23	2,95

	Moč. mg/l	BMM-P -m°C	CPM	log CPM	VMK mmol/100gT	odhad SH MIR-FT $y = x \times 0,8255862 + 1,8401515$
<i>n</i>	414	414	207	207	207	414
<i>x</i>	276	545	18	0,9348	0,7895	10,52
<i>g</i>				9		
<i>sx_v</i>	96	24	61	0,3398	0,2442	4,874
<i>vx_v</i>	34,8	4,4	338,9		30,9	46,3
<i>sx</i>	96	24	61	0,3389	0,2436	4,868
<i>vx</i>	34,8	4,4	338,9	36,3	30,9	46,3
<i>min</i>	54	496	5	0,6990	0,2580	6,36
<i>max</i>	755	597	599	2,7774	1,5320	29,75
<i>Rmax-min</i>	701	101	594	2,0784	1,2740	23,39
<i>medián</i>	264	555	7	0,8451	0,7560	8,25
<i>horní q</i>	211	521	5	0,6990	0,6265	7,81
<i>dolní q</i>	330	564	10	1,0000	0,9145	11,46

odhad MIR-FT SH – ref SH

<i>n</i>	414
<i>d</i>	0,01
<i>sd_v</i>	1,030
<i>sd</i>	1,029
<i>min</i>	-4,06
<i>max</i>	0,89

Základní statistika souboru „DairySpec-a-SH-valid-kval-odhad-2022“ pro n = 207, tj. 3. (modifikované vzorky mléka);

Č.vz.	SH kor. °SH	Vodivost mS×cm ⁻¹	pH	Tuk %	Bilk. %	Lakt. %	TPS %	Kas. %	Moč. mg/l	BMM-P -m°C
<i>n</i>	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207
<i>x</i>	13,76	4,87	6,25	4,01	3,52	4,86	9,04	2,78	296	548
<i>g</i>										
<i>sx_v</i>	6,961	0,426	0,553	0,279	0,184	0,174	0,329	0,255	107	26
<i>vx_v</i>	50,6	8,7	8,8	7,0	5,2	3,6	3,6	9,2	36,1	4,7
<i>sx</i>	6,944	0,425	0,552	0,278	0,184	0,173	0,328	0,254	107	26
<i>vx</i>	50,5	8,7	8,8	6,9	5,2	3,6	3,6	9,1	36,1	4,7
<i>min</i>	5,84	3,99	2,65	3,38	3,04	4,26	5,85	2,16	54	497
<i>max</i>	33,81	6,40	6,80	4,95	4,06	5,21	9,46	3,63	755	597
<i>Rmax-min</i>	27,97	2,41	4,15	1,57	1,02	0,95	3,61	1,47	701	100
<i>medián</i>	11,70	4,77	6,44	4,00	3,51	4,91	9,09	2,80	296	558
<i>horní q</i>	8,30	4,58	6,07	3,83	3,40	4,77	8,95	2,64	222	522
<i>dolní q</i>	17,24	5,02	6,63	4,17	3,65	4,97	9,23	2,96	359	568

Č.vz. odhad SH MIR-FT

$$y = x \times 0,8062392 + 2,6738241$$

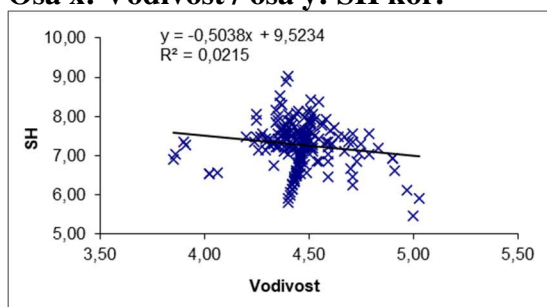
<i>n</i>	207
<i>x</i>	13,77
<i>g</i>	
<i>sx_v</i>	5,613
<i>vx_v</i>	40,8
<i>sx</i>	5,599
<i>vx</i>	40,7
<i>min</i>	7,38
<i>max</i>	29,93
<i>Rmax-min</i>	22,55
<i>medián</i>	12,11
<i>horní q</i>	9,37
<i>dolní q</i>	16,57

odhad MIR-FT SH – ref SH

<i>n</i>	207
<i>d</i>	0,01
<i>sd_v</i>	1,348
<i>sd</i>	1,345
<i>min</i>	-3,88
<i>max</i>	1,54

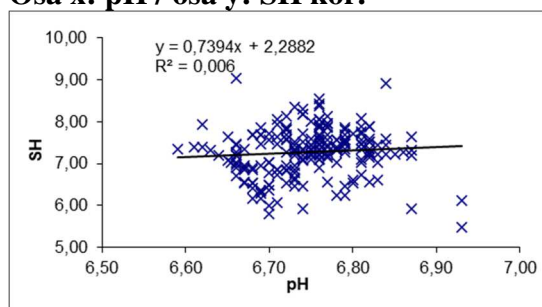
Lineární regrese v souboru n = 207 (1. = původní mléko) mezi všemi mléčnými ukazateli na ose x a SH na ose y

Osa x: Vodivost / osa y: SH kor.



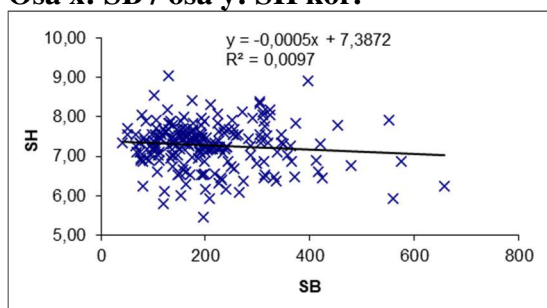
$y = -0,5038x + 9,5234$ $R^2 = 0,0215$ $r = 0,147$ *

Osa x: pH / osa y: SH kor.



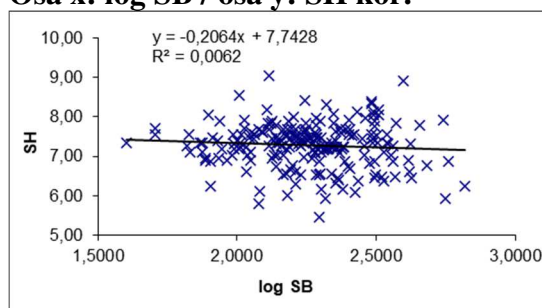
$y = 0,7394x + 2,2882$ $R^2 = 0,0060$ $r = 0,077$ ns

Osa x: SB / osa y: SH kor.



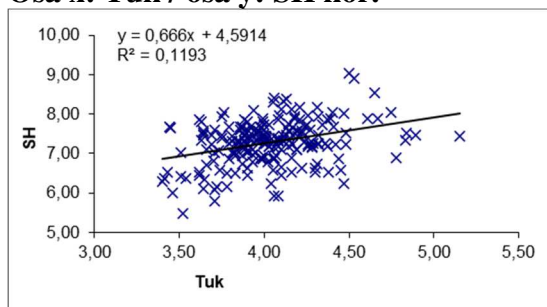
$y = -0,0005x + 7,3872$ $R^2 = 0,0097$ $r = 0,099$ ns

Osa x: log SB / osa y: SH kor.



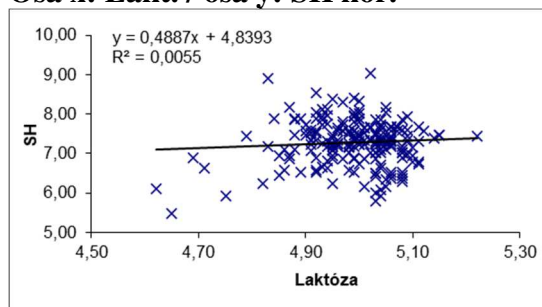
$y = -0,2064x + 7,7428$ $R^2 = 0,0062$ $r = 0,079$ ns

Osa x: Tuk / osa y: SH kor.



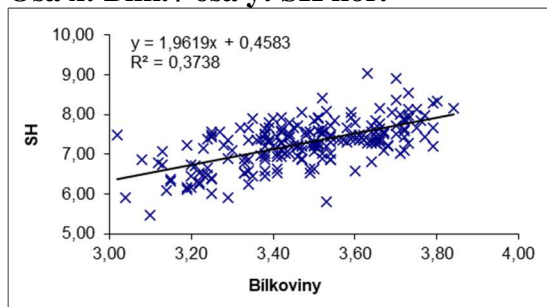
$y = 0,666x + 4,5914$ $R^2 = 0,1193$ $r = 0,345$ ***

Osa x: Lakt. / osa y: SH kor.

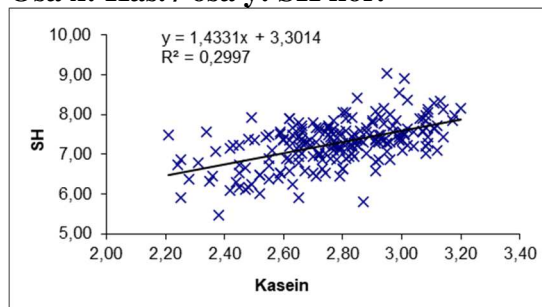


$y = 0,4887x + 4,8393$ $R^2 = 0,0055$ $r = 0,074$ ns

Osa x: Bilk. / osa y: SH kor.



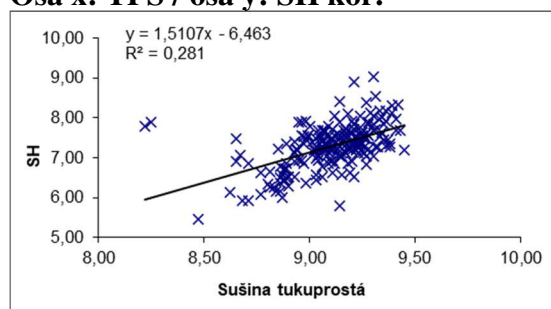
Osa x: Kas. / osa y: SH kor.



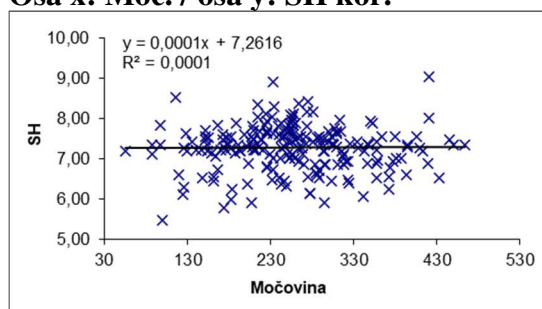
$$y = 1,9619x + 0,4583 \quad R^2 = 0,3738 \quad r = 0,611 \quad ***$$

$$y = 1,4331x + 3,3014 \quad R^2 = 0,2997 \quad r = 0,547 \quad ***$$

Osa x: TPS / osa y: SH kor.



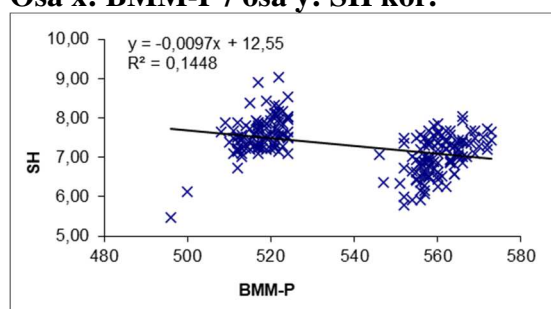
Osa x: Moč. / osa y: SH kor.



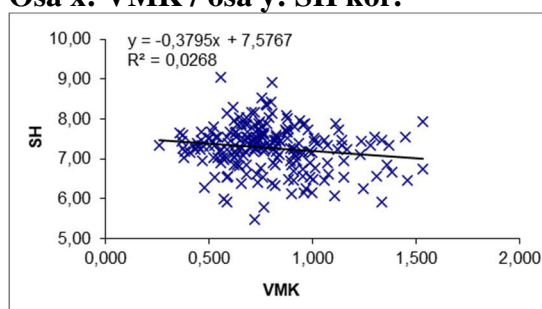
$$y = 1,5107x - 6,463 \quad R^2 = 0,2810 \quad r = 0,53 \quad ***$$

$$y = 0,0001x + 7,2616 \quad R^2 = 0,0001 \quad r = 0,009 \quad ns$$

Osa x: BMM-P / osa y: SH kor.



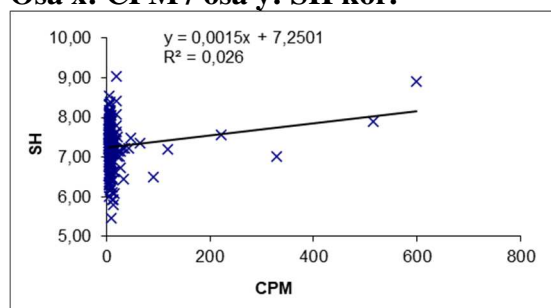
Osa x: VMK / osa y: SH kor.



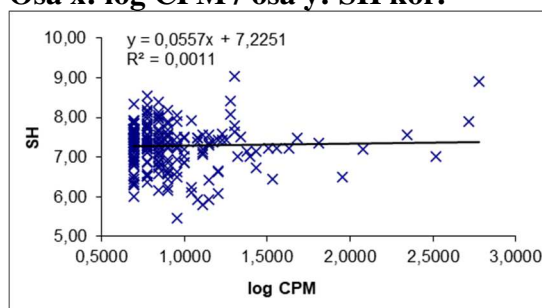
$$y = -0,0097x + 12,5499 \quad R^2 = 0,1448 \quad r = 0,38 \quad ***$$

$$y = -0,3795x + 7,5767 \quad R^2 = 0,0260 \quad r = 0,161 \quad *$$

Osa x: CPM / osa y: SH kor.



Osa x: log CPM / osa y: SH kor.

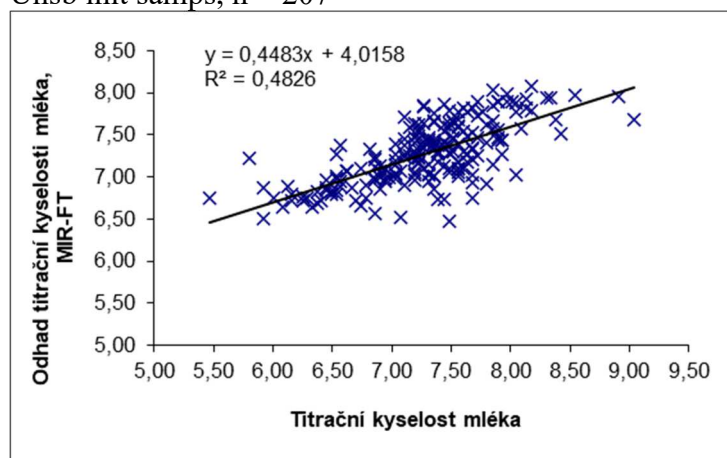


$$y = 0,0015x + 7,2501 \quad R^2 = 0,0260 \quad r = 0,161 \quad *$$

$$y = 0,0557x + 7,2251 \quad R^2 = 0,0011 \quad r = 0,033 \quad ns$$

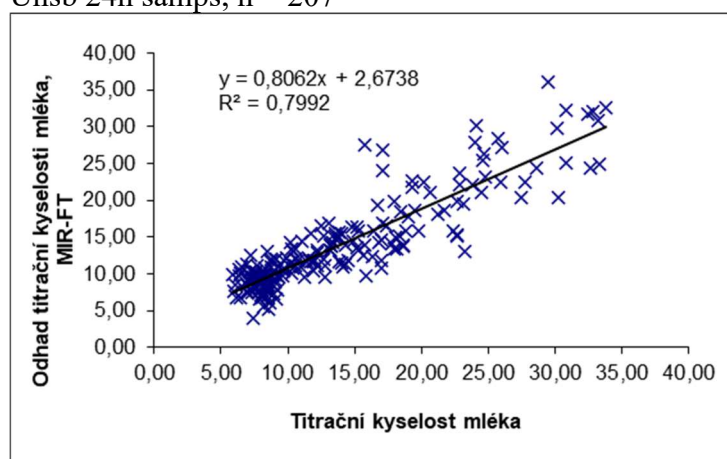
Ze souboru SHParsons2023

Unsb init samps, n = 207



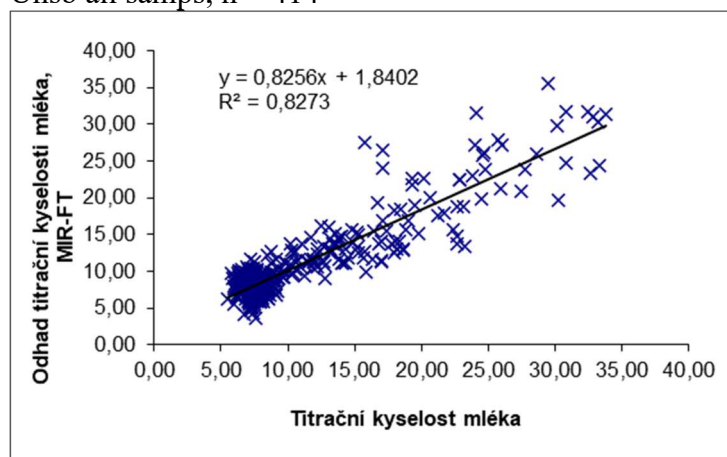
$$y = 0,4483x + 4,0158 \quad R^2 = 0,4826 \quad r = 0,695 \text{ ***}$$

Unsb 24h samps, n = 207



$$y = 0,8062x + 2,6738 \quad R^2 = 0,7992 \quad r = 0,894 \text{ ***}$$

Unsb all samps, n = 414



$$y = 0,8256x + 1,8402 \quad R^2 = 0,8273 \quad r = 0,91 \text{ ***}$$

Výpočet cross validace ze souboru SHParsons2023

Výpočet je z ohraničených hodnot

Celý soubor			Původní mléko			Modifikované vzorky mléka		
	R ² =	r =		R ² =	r =		R ² =	r =
n = 414	0,8273	0,9100	n = 207	0,4826	0,6950	n = 207	0,7992	0,8940
n = 374	0,8328	0,9130	n = 187	0,4764	0,6900	n = 187	0,8120	0,9010
n = 374	0,8292	0,9110	n = 187	0,5169	0,7190	n = 187	0,8042	0,8970
n = 374	0,7947	0,8910	n = 187	0,3841	0,6200	n = 187	0,7666	0,8760
n = 374	0,8266	0,9090	n = 187	0,5720	0,7560	n = 187	0,7990	0,8940
n = 374	0,8288	0,9100	n = 187	0,4893	0,6990	n = 187	0,8056	0,8980
n = 374	0,8292	0,9110	n = 187	0,4785	0,6920	n = 187	0,8030	0,8960
n = 374	0,8261	0,9090	n = 187	0,4344	0,6590	n = 187	0,8028	0,8960
n = 374	0,8316	0,9120	n = 187	0,4600	0,6780	n = 187	0,7990	0,8940
n = 374	0,8402	0,9170	n = 187	0,4783	0,6920	n = 187	0,8299	0,9110
n = 374	0,8276	0,9100	n = 187	0,5037	0,7100	n = 187	0,8146	0,9030
n = 400	0,8285	0,9100	n = 200	0,4855	0,6970	n = 200	0,7983	0,8930
n	10	10		10	10		10	10
x	0,8267	0,909		0,4794	0,692		0,8037	0,897
sx	0,0113	0,006		0,0471	0,034		0,0152	0,008
min	0,7947	0,891		0,3841	0,620		0,7666	0,876
max	0,8402	0,917		0,5720	0,756		0,8299	0,911
n	11	11		11	11		11	11
x	0,8268	0,909		0,4799	0,692		0,8032	0,896
sx	0,0108	0,006		0,0449	0,033		0,0145	0,008
min	0,7947	0,891		0,3841	0,620		0,7666	0,876
max	0,8402	0,917		0,5720	0,756		0,8299	0,911