Postup nepřímého, rutinního, rychlého odhadu hodnoty aktivní kyselosti mléka

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali:

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

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

ISBN: 978-80-88390-13-8

Červen 2025

Vydavatel:

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

Místo vydání:

Praha

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce:

https://agronavigator.cz/metodiky/potravinarstvi

Pořadí vydání:

1. vydání, 2025

Podíl autorů na tvorbě metodiky:

40 % Oto Hanuš
25 % Hana Nejeschlebová
10 % Marcela Klimešová
10 % Jaroslav Kopecký
10 % Radoslava Jedelská
5 % Ludmila Nejeschlebová

Podíl firem na tvorbě metodiky:

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

Podíl projektů na tvorbě metodiky:

60 % QK21010212
40 % RO 1425

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

1) **Odborník z daného oboru**: Ing. Václava Genčurová, Ph.D., pracoviště: laboratoř, Vápenka Vitošov s.r.o., manažer jakosti akreditované laboratoře, odborník na analýzy zemědělských materiálů včetně mléka, vody a stavebních hmot;
2) **Pracovník státní správy**: Ing. Martin Hošek, Ph.D., pracoviště: Česká plemenářská inspekce Praha – ředitel, odborník v kontrole užitkovosti zvířat a v mlékařství

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení:

a) Výzkumného projektu č. QK21010212 s názvem: „Vývoj metod pro kontrolu manipulace kvality mléka určeného k dalšímu technologickému zpracování a zajištění jeho autenticity“, jako výsledek QK21010212-V9
b) Podpory na rozvoj výzkumné organizace č. RO 1425

Obsah

Cíl metodiky 2
Vlastní popis metodiky 2
1) Úvod – literární podklady a současná situace 3
Obecné informace 3
Vztah AKM k faktorům mlékařské praxe a TKM 4
Využití infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT) v mlékařství 6
Současné podmínky mlékařského prostředí pro AKM 6
2) Cíl metodiky vývoje a validace postupu pro rutinní stanovení aktivní kyselosti mléka 6
3) Vlastní metodika pro rutinní stanovení aktivní kyselosti mléka v kontrole kvality mléka 7
Tvorba reprezentativní, základní kalibrační vzorkové sady pro AKM 7
Stabilizace a modifikace vzorkové kalibrační sady pro AKM 7
Analýzy a analytické postupy pro vzorky mléka 7
Statistické postupy vyhodnocení 8
Technické omezení rutinních metod stanovení AKM 8
Charakteristiky základních vzorkových kalibračních (referenčních) sad pro AKM 9
Výsledky korelační analýzy kalibračních modelů AKM pro MIR-FT 11
Diskuse vybraných aspektů odhadu AKM kalibračním modelem pro MIR-FT 12
4) Závěr metodiky pro rutinní stanovení aktivní kyselosti mléka (pH) 13
Projektové zdůvodnění potřeby doplňkového řešení metodiky 13
Srovnání „novosti postupů“ 14
Popis uplatnění metodiky 15
Ekonomické aspekty 16
Seznam použité související literatury. 17
Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány 19

Cíl metodiky

Cílem metodiky 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 aktivní kyselosti mléka.

Vlastní popis metodiky

Nejčastěji použité zkratky:

AKM = aktivní kyselost mléka;

BMM = bod mrznutí mléka;

BVM = bazénový vzorek mléka;

CF nebo C = České strakaté;

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;

MOC = koncentrace močoviny;

pH = aktivní kyselost;

PLS = metoda nejmenších parciálních čtverců (Partial Least Squares);

PSB = počet somatických buněk;

RIL = rezidua inhibičních látek;

STP = obsah sušiny tukuprosté;

T = obsah tuku;

TKM (SH) = titrační kyselost mléka;

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 informace

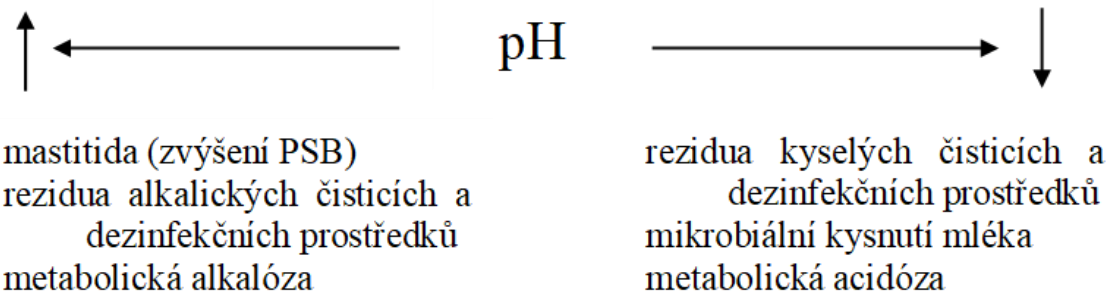
Od počátků průmyslového mlékařství existují určité základní a historické kvalitativní ukazatele syrového mléka, sloužící ke kontrole kvality mlékařských zpracovatelských postupů a mléčných potravin jako výstupů. Sem lze chronologicky počítat obsah mechanických nečistot, obsah tuku v mléce, titrační kyselost mléka a hygienická kvalita mléka formou odhadu bakteriální kontaminace prostřednictvím barevných testů (resazurinový test, později test pyruvátu). Později následovalo určení hygienické kvality mléka mikrobiologickými kultivačními metodami a stanovení aktivní kyselosti mléka (pH). Až později přibyly ukazatele jako bod mrznutí mléka, obsah sušiny a tukuprosté sušiny, obsah bílkovin, počet somatických buněk, testy reziduí inhibičních látek atp.

Aktivní kyselost mléka (AKM, pH) je, stejně jako titrační kyselost mléka (TKM), důležitým kvalitativně-hygienickým a technologickým ukazatelem nakupovaného syrového mléka, ale také mezistupňových vzorků při zpracování mléka na mléčné potraviny. Interpretace hodnoty ukazatele AKM je však složitější než u TKM s ohledem na fyziologickou funkčnost pufračního systému mléka, který je efektivnější v kyselé oblasti, což je i biologicky poměrně logické.

AKM je měřena jako kyselost pH, tzn. koncentrace vodíkových iontů obvykle referenčně potenciometricky prostřednictvím pH metru s relevantní elektrodou, po kalibraci na příslušné standardní (obvykle certifikované, komerční) roztoky pufrů, podle měřeného materiálu, obvykle.

Mléko z hlediska koncentrace vodíkových iontů vykazuje téměř neutrální reakci pH. Např. kravské mléko 6,5 až 6,8, zatímco ženské 7,0 až 7,2. Dříve významná, dnes neplatná, přesto stále používaná ČSN 57 0529, v roli informativního standardu, nedefinuje hodnotu kyselosti pH jako znak jakosti. Přesto je tato hodnota poměrně často v mlékařství, v různých bodech a pozicích technologie, sledována. Měření pH se provádí specifickými elektrodami potenciometricky a pH-metr je pravidelně kalibrován na hodnoty standardních pufrů (nejčastěji 4, 7 a 9). Proti změně pH vykazuje mléko pufrační schopnost, která je dána přítomností pufrů: kyselina fosforečná, kyselina citrónová, kyselina uhličitá, mléčné bílkoviny. Tlumivé roztoky se projevují zmenšením změn v koncentraci vodíkových iontů při dodání kyselin nebo zásad. Vzhledem ke skladbě mléčných pufrů je pufrační kapacita účinnější při tlumení v kyselé oblasti než v zásadité, jak bylo již zmíněno. Některé látkové změny v mléce pak mají za následek stav kdy, zatímco titrační kyselost mléka (SH) již změny projevuje, pH ještě do určité hranice zůstává konstantní. Faktory schopné působit na změny pH lze rozdělit podle Obr. 1 (HANUŠ a KLIMEŠOVÁ, v monografii SAMKOVÁ et al., 2012).

Obr. 1: Faktory působící na pH (malé kolísání).



Protože je kyselost pH charakteristikou v řadě dalších případů chemických, fyzikálních a biologických materiálů, kde jsou často předepsány standardní hodnoty nebo fyziologické obory, je o měření pH trvalý zájem v řadě oborů činností v hospodářství, často v chemickém průmyslu, energetice, potravinářství, kontrole hygieny či zdravotnictví.

Protože je pH tak frekventovanou materiálovou charakteristikou, vzrůstá zájem i o rychlejší až automatizované metody jeho měření, s nižšími náklady, vyšší frekvencí a tím také efektivitou, a přesto s akceptovatelnou věrohodností výsledků, tedy o nepřímé metody stanovení. Nejinak je tomu i v mlékařství (KUNES et al., 2021).

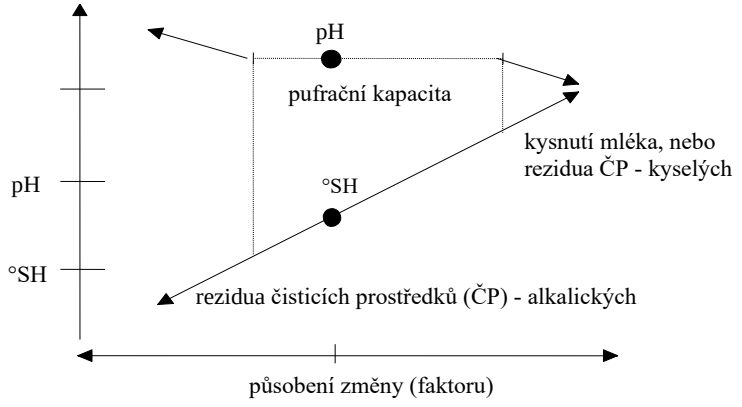
Např. z literatury je možné uvést měření pH mléčných potravin metodou infračervené spektroskopie v oblasti blízké infračervenému záření, s Fourierovou transformací NIR-FT. Ze zkušenosti je pak možné uvést kritické postoje případných chemických puristů, kteří oprávněně namítají, že přece nelze měřit koncentraci H^+ iontů s ohledem na jejich průměr vlnovými délkami NIR a kritizují uvedený postup. Nicméně, jak ukazují praktické výsledky testování analytických metod, 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, ThermoNicolet, 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 %.

Dalším důvodem zájmu o výsledky pH a jejich měření v mlékařství je jejich význam při možném rozklíčování kvality syrového mléka pomocí tohoto doplňkového ukazatele, při změněné hodnotě TKM, kdy se nemusí vždy jednat o technologickou vadu (podle KRATOCHVÍL, 1984). Zároveň vzrůstá tento zájem o rychlé, průběžné, (nepřímé) měření pH při kontrole kvality mléka v geografických oblastech (subtropy, tropy, kontinentální klima – východní Evropa, střed, východ a jih Asie, Jižní Amerika, Afrika) se ztíženými, klimaticky náročnými a komplikovanými podmínkami transportu syrového mléka ke zpracování s ohledem na faktory jako je členitý terén, horší dopravní infrastruktura, velké vzdálenosti, vysoké či nízké teploty, během déle trvající přepravy, kde se však zároveň mlékařství aktuálně poměrně rychle rozvíjí, což dokládá trvale rostoucí celková produkce mléka (KOPÁČEK, 2023 a, b, c, d, 2024).

Vztah AKM k faktorům mlékařské praxe a TKM

TKM je významné pro technologické zpracování mléka (pro sýrařství – koagulace, i pro fermentované mléčné výrobky), ale i pro trvanlivost mléka (konzumní mléko). Pufrační kapacita mléka pro AKM je silnější v oblasti kyselé než alkalické. Proto když vzroste kyselost mléka, např. rozkladem laktózy bakteriální činností (vzrůst koncentrace kyseliny mléčné), zatímco hodnota pH ještě neklesá, hodnota TKM již vzrůstá (Obr. 2). TKM reaguje tedy citlivěji oproti AKM. Proto někdy mezi AKM a TKM nemusí být příliš těsný vztah. Pufrační 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 pufrační kapacity mléka na změny AKM (pH) a TKM (SH°).



Ve studii s 553 bazénovými vzorky mléka krav plemene české strakaté a černostrakaté nížinné (HANUŠ et al., 1993) byly zjištěny významné ($P < 0,01$) korelace TKM (6,88 ± 0,52 ºSH; vx = 7,6 %) k : - PSB -0,25; - obsahu acetonu -0,17; kyselosti pH -0,28; - elektrické vodivosti -0,33. MARIANI et al. (1989) pro sníženou a normální ($P < 0,001$) TKM 2,82 ± 0,15 a 3,33 ± 0,34 ºSH (50 ml mléka) zaznamenali významné rozdíly ($P < 0,05$ až $P < 0,001$) pro: pH 6,78 ± 0,03 a 6,7 ± 0,03; - obsah kaseinu 2,1 ± 0,16 a 2,24 ± 0,22 %; - kaseinové číslo 76,54 ± 1,7 a 77,87 ± 1,97 %; - celkový P (organický i anorganický) 77,5 ± 4,9 a 87,3 ± 5,8 mg/100 ml; a nevýznamné ($P > 0,05$) pro: - celkový Ca (organický i anorganický) 104,7 ± 4,8 a 107,7 ± 6,7 mg/100 ml; - kyselinu citronovou 171,9 ± 18,3 a 182,7 ± 19,7 mg/100 ml; - obsah monohydrátu laktózy 4,82 ± 0,11 a 4,89 ± 0,12 g/100 ml.

PATSCHOVÁ a ŠMIDRIAKOVÁ (1990) nalezly rozdílné korelační vztahy mezi laktózou a AKM a TKM u skupin dojnic se sníženou (pod 6,2 ºSH; 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 TKM 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.

MOLINA et al. (2001) neuvedli v korelační matici významný vztah TKM ani k alkoholovému testu ($r = 0,14$), ani k termostabilitě mléka ($r = 0,03$), ale pouze k aktivní kyselosti pH ($r = -0,47$, $P < 0,05$). ROSA et al. (2020) v uvedené souvislosti popsali schéma aktuální analytické metody identifikace tzv. UNAM bazénových vzorků, tedy nestabilních (pozitivní etanolový test 72 ºGI a negativní test varem) nekyselých vzorků kravského mléka (pH ≥ 6,6 nebo TKM ≤ 18 ºD). Zabývali se dále také vysvětlením možných faktorů zmíněného efektu.

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 ºSH. Za těchto okolností byla prokázána významná ($P < 0,01$) negativní korelace mezi koncentrací laktózy a pH mléka ($r = -0,91$). Stejně tak JAĎUĎ 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 $mmol \times l^{-1}$ na tendenci k poklesu TKM na průměrnou hodnotu 6,3 ± 0,6 ºSH a při výlučku kyselém k nárůstu na 7,8 ± 0,3 ºSH. Snížení pH krve pod 7,3 bylo spojeno se vzestupem TKM k 7,2 ºSH, a naopak vzestup pH krve nad 7,4 znamenal pokles TKM k 6,4 ºSH. Pokles TKM pod 6,2 ºSH 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 ºSH a sníženou TKM pod 6,2 ºSH 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 $mmol \times l^{-1}$), zatímco nejméně výrazné u močoviny (8,54 a 8,53 $mmol \times l^{-1}$) a hrubých bílkovin (3,28 a 3,33 %).

Primární TKM v individuálních vzorcích z první třetiny laktace ($n = 662$; 7,34 ± 0,83 ºSH; vx = 11,3 %) českého strakatého plemene a černostrakatého nížinného plemene (HANUŠ et al., 1992) 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 dojivosti -0,24; - obsahu tuku 0,27; - obsahu hrubých bílkovin 0,43; - obsahu monohydrátu laktózy 0,25; - obsahu tukuprosté sušiny 0,23; - koncentraci chloridů -0,45; - aktivní kyselosti pH -0,29; - chlorcukrovému číslu -0,46; - elektrické konduktivitě -0,43; - hodnotě mastitis testu -0,21.

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 analyzátory) 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.

S nástupem analytické technologie MIR-FT se skenováním (pomocí Michelsonova interferometru) a analýzou celého infraspektra a vyhodnocením signálu prostřednictvím Fourierových transformací bylo toto spektrum mlékařských analýz podstatně rozšířeno.

Potřebné validace dalších efektivních kalibrací z infraspekter, 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 AKM je méně předpokládanou, resp. očekávanou, ale také možnou variantou, za předpokladu dodržení technických podmínek průtočné analýzy (spolehlivá tekutost vzorku).

Současné podmínky mlékařského prostředí pro AKM

Přes historické skutečnosti technologického a analytického vývoje v mlékařství je však analyticky možnost rychlého stanovení AKM výhodná. Současné globální, provozní podmínky mlékařského prostředí ukázaly na potřebu vývoje rychlého stanovení hodnoty AKM 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 aktivní kyselosti syrového mléka prostřednictvím rychlé nepřímé analytické metody MIR-FT.

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

Cílem metodiky je vyvinout efektivní kalibračně-predikční model pro stanovení aktivní kyselosti syrového mléka (AKM) 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 aktivní kyselosti mléka v kontrole kvality mléka

Materiál a metody

Tvorba reprezentativní, základní kalibrační vzorkové sady pro AKM

Byly opakovaně odebrány bazénové vzorky syrového kravského mléka (n = 214 redukováno na 207 validací kvalifikovaným odhadem) 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 (H, 62 %) a České strakaté (CF, 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 (207 × 2 = 414 (A + B) s redukcí kvalifikovaným odhadem při lineárním regresním hodnocení kalibračního modelu na 413, model I 225 + model II 188). Tím byla pokryta možná, a pro kalibraci analytické techniky potřebná, variabilita AKM, pramenící z četných biologických a technologických zdrojů mlékařské praxe. Vzorky byly přepraveny do laboratoře (VÚM Praha, pracoviště Šumperk) v chladových podmínkách (≤ 6 ºC) v termoboxu bez chemické konzervace. Dále byly původní vzorky mléka, v systému oficiální kontroly kvality mléka, bez konzervace nebo konzervovány Heschenovým činidlem a bronopolem (0,03 %), podle účelu analýzy (bod mrznutí mléka, mikrobiologická vyšetření, složky mléka a počet somatických buněk) přepraveny v chladových podmínkách (≤ 6 ºC) do akreditované (ČSN EN ISO/IEC 17025) laboratoře rozborů mléka ČMSCH a.s., LRM Brno.

Stabilizace a modifikace vzorkové kalibrační sady pro AKM

Každý vzorek byl, po důkladné, ale šetrné homogenizaci, rozdělen do dvou subvzorků. První subvzorek (A) představoval původní mléko s AKM a byl uložen v chladničce (≤ 5 ºC; cca 18 hodin). Druhý subvzorek (B) byl ponechán po cca 18 hodin do druhého dne při pokojové teplotě (16 – 22 ºC), čímž došlo k náhodné modifikaci vzorku podle podmínek a případné změně AKM cestou přirozeného pomnožení přítomné mikroflóry (modifikovaný vzorek). Bylo tak postupováno pro potřeby zisku dostatečného variačního rozpětí kalibrační škály AKM. Vzorky A (původní mléko) byly druhý den analyzovány na AKM a řadu souvisejících mléčných ukazatelů, především metodou MIR-FT. Vzorky B (modifikované) byly druhý den měřeny na AKM a metodou MIR-FT. To znamená, že pro všechny vzorky, A i B, tak byla zaznamenána relevantní spektra MIR-FT.

Analýzy a analytické postupy pro vzorky mléka

Aktivní kyselost mléka (AKM = 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 a poskytl tak referenční hodnoty pro konstrukci kalibračního modelu MIR-FT.

Infraspektra pro aktivní kyselost mléka (AKM) 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. 1) na relevantně kalibrovaných (v měsíčních intervalech) a kontrolovaných (proficiency testing) infraanalyzátorech 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 10^3.ml^{-1}.

Počet somatických buněk (PSB) v mléce byl stanoven pomocí metody průtočné cytometrie (FC; Tab. 1) na fluoro-opto-elektronických čítačích částic CombiFoss FT+ Fossomatic 7 (Foss Electric, Hilleröd, 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 × ml^{-1} podle referenční kultivační metody dle ČSN EN ISO 4833-1 (2014).

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

Elektrická konduktivita (vodivost; VOD) mléka byla měřena za použití konduktometru Hanna (Rumunsko) při 20 °C. Přístroj byl kalibrován příslušným solným roztokem (KCl; 10,2 mS × 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) inhibičním testem (růst při 65 °C) s pH indikátorem Eclipse 50 (ZEU-INMUNOTEC, Španělsko) podle manuálu výrobce a podle relevantního standardního operačního postupu.

Statistické postupy vyhodnocení

Databáze 207 původních vzorků a 414 (lineární regrese 413, 225 + 188) vzorků celkem (původní a modifikované) byly vyhodnoceny základními statistickými metodami (MS Excel, Microsoft, Redmond, Washington, USA). Pro stanovené mléčné ukazatele byly vypočteny střední hodnoty (aritmetický průměr (x), medián (m)), variabilita ve formě směrodatné odchylky (sd = sx) a variačního koeficientu (vx v %). Dále hodnoty PSB (SB) a CPM, jako ukazatele s možnou, resp. předpokládanou odchylkou od normální frekvenční distribuce byly logaritmicky transformovány (dekadický log) pro regresní hodnocení a výpočet hodnoty geometrického průměru (g).

Zaznamenaná spektra MIR-FT vyhodnotil s ohledem na referenční hodnoty AKM pan Craig Parsons (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA) relevantním software, ve spolupráci s panem Gavinem Thompsonem (Bentley Czech s.r.o.), čímž byly získány predikční odhady AKM metodou MIR-FT za použití statistické metody částečných nejmenších čtverců (PLS).

Byly vypočteny lineární regrese a korelační koeficienty (r) mezi vybranými ukazateli, tedy především mezi referenční hodnotami AKM a odhady AKM (predikce) pomocí MIR-FT. Významné korelace (s pravděpodobností nulové hypotézy $P < 0,05$) byly testovány.

Výsledky a diskuse

Technické omezení rutinních metod stanovení AKM

Je celkem technicky snadné provádět náhradní (nepřímou) metodu analýzy AKM 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 ºC a dále mléko během měření musí strávit určitý čas v temperované kyvetě bez sražení. Zde existuje technologické riziko (při nižší, případně získané AKM), hrozící 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. AKM skotu to znamená

rozsah měření vyšší než limitní pH cca 5, 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 pro AKM

Základní charakteristiky (parametry) kalibrační sady z hlediska sledovaných mléčných ukazatelů jsou v Tab. 1 s uvedením referenčních hodnot AKM pro původní mléko, pro všechny vzorky mléka (původní plus modifikované) a pro poškozené vzorky mléka. Je samozřejmé, že hodnoty sady A + B, ale i B, stanovené MIR-FT (složky a vlastnosti mléka), jsou již ovlivněny stavem vzorků (částí po snížení AKM), 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 AKM). Hodnoty VOD a referenční pH jsou samozřejmě reálné.

Referenční průměr AKM sady A + B činil 6,5 ± 0,464, při variabilitě 7,1 % (minimum a maximum 2,65 a 6,93). To odpovídá zřetelnému vlivu narušeného syrového mléka, podle potřeby záměru pokusu. Základní sada referenčních vzorků A (původní mléko) uvádí běžné parametry mléčných ukazatelů pro podmínky chovu dojnic a produkce mléka v ČR, referenční průměr AKM byl 6,75 ± 0,059, při variabilitě 0,9 % (minimum a maximum 6,59 a 6,93). Všechny tyto vzorky mléka (soubor A) byly negativní na vyšetření RIL, tedy prakticky bez vlivu antibiotik, dezinfekčních prostředků a přirozených inhibitorů. Soubor B (technologicky a přirozeně poškozené mléko) naznačuje hodnoty pH, ale i jiných mléčných ukazatelů, již modifikované, které jen samy o sobě, bez hodnot přirozených, také nejsou vhodné pro derivaci samostatného kalibračního modelu MIR-FT. Uvedené dokládá vhodnost referenční sady A + B k použití pro zamýšlený účel derivace kalibračního modelu MIR-FT pro predikci AKM.

Z variability pH hodnot v Tab. 1 souborů A (0,9 %, původní čerstvé syrové mléko v důsledku pufrační kapacity mléka) a A + B (7.1 %, v důsledku neadekvátního uložení a zdržení k analýze), je zřejmý značný rozdíl, podle ošetření vzorků mléka, který zdůvodňuje, proč konstruovat kalibrační model pro soubor A nedává smysl. Smysl však prakticky dává kalibrovat na hodnoty, které rovněž, vedle běžných hodnot, zahrnují kvalitativní deficit, který znamená prolomení pufrační kapacity mléka, a který má být fakticky kontrolován (tedy soubor A + B).

Průměr AKM souboru B (poškozené mléko) činil 6,25 ± 0,553 (n = 207) a byl významně odlišný ($P < 0,001$) od průměru souboru A (původní mléko), podobně, jako to s menší intenzitou ($P < 0,01$) platilo i pro soubor A + B. Variabilita pH souboru B byla 8,8 % a minimum a maximum pak 2,65 a 6,8.

Tab. 1 Základní charakteristiky mléčných ukazatelů kalibračních sad referenčních vzorků mléka pro tvorbu kalibračních modelů k odhadu hodnot AKM prostřednictvím MIR-FT.

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

AKM (pH) aktivní kyselost mléka; TKM titrační kyselost mléka; MIR-FT infračervená spektroskopie mléka ve středové oblasti s Fourierovou transformací; A původní mléko (primární AKM a TKM); B mléko s vyšší TKM a nižší AKM (primární a sekundární, získaná TKM a snížená AKM); n počet případů; x aritmetický průměr; sx směrodatná odchylka; vx variační koeficient; g geometrický průměr; min. minimum; max. maximum; VOD vodivost; 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.

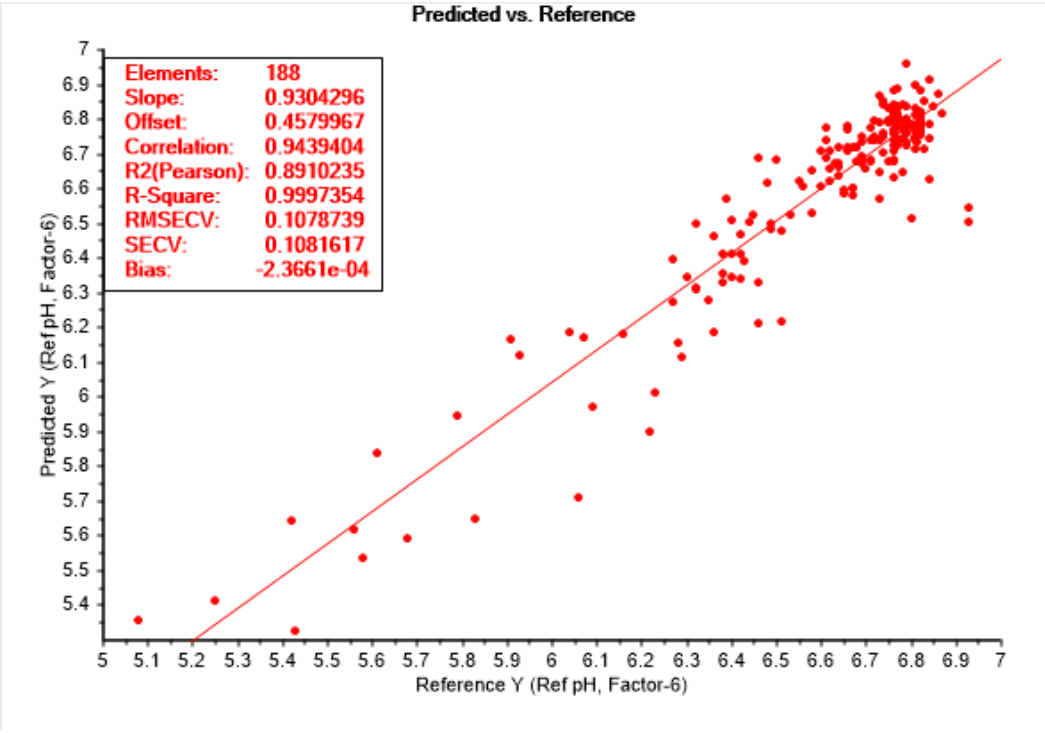
Výsledky korelační analýzy kalibračních modelů AKM pro MIR-FT

Během ročního experimentu bylo nezbytné z technických důvodů cca uprostřed časové periody vyměnit měřicí kyvetu analytického přístroje. Tato skutečnost se neprojevila na měření běžných složek mléka (T, HB, L, STP atd.), neboť přístroj byl následně na nové poměry aktuálně kalibrován. Nicméně, protože kyvety z objektivních technických důvodů nejsou pro optická měření absolutně stejné, z hlediska tloušťky (optické dráhy paprsku) projeví se tato skutečnost na charakteristice získaných spekter. Proto vyhodnocení souboru A + B (Tab. 1; pH) při hledání kalibračního modelu pro MIR-FT bylo rozděleno do dvou částí, odpovídajících časové návaznosti provozu dvou kyvet (I, n = 225 a II, n = 188).

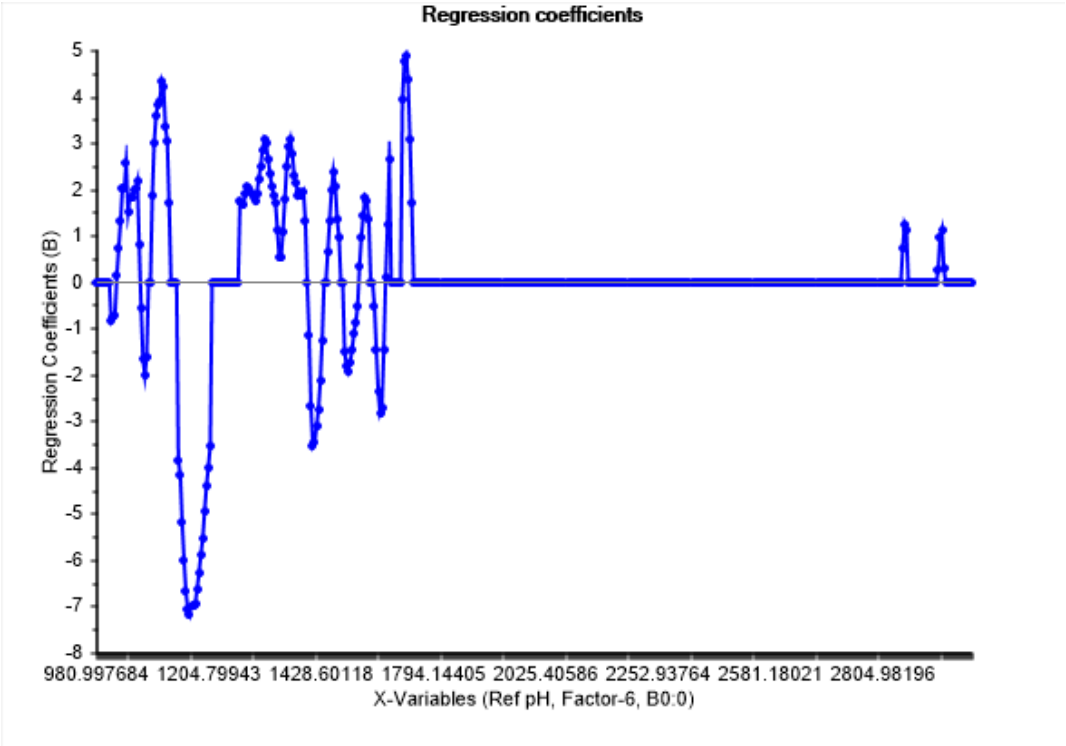
Kalibrační model I (y = 0,9761433x + 0,1526856) vykázal korelační koeficient vztahu referenčních a predikovaných hodnot 0,974 (P < 0,001), tedy velmi těsný vztah, který je obvykle získáván na úrovni kalibrace hlavních složek mléka jako T, HB, L nebo STP. Až 94,8 % variability predikovaných hodnot pH MIR-FT bylo vysvětlitelných variacemi referenčních hodnot pH. Model tak lze považovat za velmi výhodný a věrohodný pro praktická, nepřímá, rutinní měření.

Kalibrační model II, ačkoliv jsou si oba (I a II) velmi podobné, vykázal mírně slabší korelační koeficient vztahu referenčních a predikovaných hodnot 0,944 (P < 0,001; Obr. 3), tedy rovněž velmi těsný vztah. To znamená, že 89,1 % variability v predikcích MIR-FT je determinováno variabilitou v hodnotách referenční metody AKM. I tento model (Obr. 4) tak lze, kvalifikovaným odhadem, považovat stále za velmi výhodný a dostatečně věrohodný pro nepřímá, rutinní měření. Je možné konstatovat, že měření pH MIR-FT je způsobilé, daným postupem, k praktické aplikaci. Po vyhodnocení kalibračních modelů pro pH prostřednictvím MIR-FT byly doporučeny kroky postupu tvorby relevantní sady referenčních vzorků AKM.

Obr. 3 Výsledný kalibrační model II (soubor A + B) lineární regrese MIR-FT pro odhad AKM.



Obr. 4 Doplňková charakteristika kalibračního modelu II (soubor A + B) pro nepřímé MIR-FT odhady hodnot pH v mléce.



Také počet metodou PLS zahrnutých faktorů do kalibračního modelu, pro vysvětlení variability referenčních dat, nebyl příliš vysoký (6), resp. byl přijatelný pro analytická měření k podobným účelům.

Diskuse vybraných aspektů odhadu AKM 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.

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 AKM, jako jednoho z důležitých, technologických, mlékařských ukazatelů.

I dnes může však, zejména v obtížnějších geografických a klimatologických podmínkách, být technickým problémem uchladit 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 aktivní kyselosti stále významnou, kvalitativní, kontrolní metodou. Celkem existuje velmi málo prací na rychlé rutinní určení hodnoty AKM nepřímou metodou (MIR-FT) a některé také s NIR-FT.

4) Závěr metodiky pro rutinní stanovení aktivní kyselosti mléka (pH)

Postup tvorby praktické referenční sady pro zisk aktuálního kalibračního modelu MIR-FT pro nepřímý odhad hodnot AKM by, po této validaci, měl respektovat zde v metodice uvedená pravidla, a základní statistické charakteristiky v Tab. 1, kdy kvalifikovaným odhadem by počet vzorků v sadě měl být minimálně 50 až 60, aby model mohl dosahovat uspokojivých výsledků:

- bazénové vzorky mléka (BVM) od komerčních stád dojnic;
- BVM z dané relevantní země, oblasti, regionu či lokality;
- BVM v přibližném poměru podle zastoupení hlavních dojených plemen;
- BVM mléka s primární kyselostí do analýzy uložené v chladničce;
- totožné BVM ponechané přirozené fermentaci (cca 18 – 20 hod.) při cca 20 °C s polovičním zastoupením v referenční sadě vzorků;
- měření referenčních hodnot pH BVM potenciometrickou metodou po příslušné kalibraci na relevantní standardní roztoky pufrů (pH 4 a 7).

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

Ve specificky definovaných případech konfigurace podmínek technologického prostředí v mlékařství může být odhad hodnoty aktivní 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 metodiky

Pro projekt MZe NAZV ZEMĚ QK21010212 „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 artificiální 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 aktivní kyselosti mléka je důležitý pro posouzení kvality mléka i věrohodnost výsledků PSB. Automatizovaná infračervená spektroskopie nabízí možnost simultánní kontroly AKM za existence příslušné kalibrace souběžně s pokusným záchytem spektra pro případnou identifikaci manipulace s mlékem a artificiální redukce PSB. Proto byl, pro metodické potřeby projektů, vyvinut model determinace AKM prostřednictvím infračervené spektroskopie k simultánní kontrole kvality vzorků v souvislosti s kontrolou případných variací PSB.

Srovnání „novosti postupů“

- jedná se o nový a validovaný postup kontroly podmínek analýz aktivní 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 aktivní 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.

Popis uplatnění metodiky

- Uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postup v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) k řešení rutinních systémů analytické laboratoře v kontrole kvality mléka k testaci vlastností bazénových vzorků mléka a pro zvýšení věrohodnosti analytických výsledků prostřednictvím validace postupu.
- 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 možné 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. Laboratoř rozborů mléka Brno, Českomoravská společnost chovatelů a. s. (ČMSCH a.s.));
- Metodika „Postupu rutinního stanovení aktivní kyselosti mléka pro podporu věrohodnosti získávaných analytických výsledků a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce“ je vydána elektronicky.
- Údaje o uplatnění metodiky pro evidenci v Rejstříku informací o výsledcích (RIV) dodá příslušný poskytovatel účelové podpory.
- Vlastní metodika bude uvedena ve zprávě o řešení výzkumného projektu QK21010212 a ve zprávě o využití podpory na rozvoj výzkumné organizace za rok 2025.

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 1,7 % 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 desetitisíců.

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 60 tis. Kč ročně při redukci chybovosti výsledků analýz a prevenci případných sporných jednání. Tento efekt je opakovatelný po rocích. Uvedené může přispět k redukci nákladů na provoz KKM.

Seznam použité související literatury.

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.

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., VÁĽKA J., STANKO P.: Vzťahy medzi ukazovateľmi profilového testu dojníc 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.

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.

JAĎUĎ P., BESEDA I., KRÁLIKOVÁ J., VÁĽKA 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) *Veterinární 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.

KLÍČNÍK, V.: Technologie živočišných produktů (Mlékařství). Animal Product Technology (Dairy). (In Czech) SPN, VŠZ Brno, 1978, 270.

KOPÁČEK, J.: Situace na trhu s mlékem. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 34, 199, 4, 2023 a, IV–VII.

KOPÁČEK, J.: Situace na trhu s mlékem. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 34, 200, 5, 2023 b, IV–VI.

KOPÁČEK, J.: Situace na trhu s mlékem. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 34, 201, 6, 2023 c, III–VI.

KOPÁČEK, J.: Aktuální trh s mlékem a jeho dynamika - 1. Současná situace ve světovém mlékárenství. PP prezentace, Seminář 24. a 25. 10. 2024, Dny prvovýroby mléka 2023 d, Brněnská přehrada, OREA Resort Santon, Brno, Českomoravská společnost chovatelů a.s.

KOPÁČEK, J.: Situace na trhu s mlékem. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 35, 202, 1, 2024, III–V.

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

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.

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*, 33, 2, 2001. http://dx.doi.org/10.4067/S0301,732X2001000200012

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.

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) *Veterinářství*, 40, 4, 1990, 188–189.

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., VÁĽKA J.: Hodnotenie niektorých parametrov mlieka při 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.

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.

RŮŽIČKOVÁ J.: Aplikace NIR spektrometrie v kontrole kvality zemědělských materiálů a produktů. Disertační práce, MZLU Brno, 2007, 136.

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.

Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány

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) *Výzkum v chovu skotu*, 1984, 3, 5–9.

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. *Výzkum v chovu skotu*, 1998, 3, 11–16.

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, 38, 7, 635–644.

HANUŠ O., BJELKA M., TICHÁČE 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., GAJDŮŠEK S., BEBER K., FICNAR J., JEDELSKÁ R.: Složení a technologické vlastnosti mléka od dojnic 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, 149–160.

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*, 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., HEGEDÜŠOVÁ 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, 2021, 1–8.

HANUŠ O., ŘÍHA J., KUČERA J., HEGEDÜŠOVÁ 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, 2021, 1–7.

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, 37, 11, 595–604.

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, 2022, 16–22.

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.

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

HANUŠ O., JANŮ L., GENČUROVÁ V., JEDELSKÁ R., KOPECKÝ J., DOLÍNKOVÁ A.: Adjustační principy a postupy – centrální adjustace rutinních měření chemických složek v mléčných laboratořích. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci metodiky mezi Výzkumným ústavem pro chov skotu, s.r.o., Rapotín a ČMSCH a.s., Praha, z 12.12.2006

HANUŠ O., JANŮ L., GENČUROVÁ V., JEDELSKÁ R., KOPECKÝ J., DOLÍNKOVÁ A.: Principy a postupy výkonnostního testování analytické způsobilosti měření chemického složení v mléčných laboratořích. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci metodiky mezi Výzkumným ústavem pro chov skotu, s.r.o., Rapotín a ČMSCH a.s., Praha, z 12.12.2006

Hanuš O., Hulová I., Genčurová V., Vyletělová M., Kopecký J., Jedelská, R.: Kalibrace metod MIR a MIR,FT v laboratořích kvality mléka za účelem měření koncentrace volných mastných kyselin (VMK) v mléčném tuku. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 10.09.2009.

NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., KLIMEŠOVÁ M., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R., NEJESCHLEBOVÁ L.: Postup nepřímého, rutinního, rychlého odhadu hodnoty titrační kyselosti mléka. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a Czech Bentley s.r.o. z 14.09.2023. ISBN 978-80-88390-08-4

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.

Za zhotovitele: Prof. Ing. Oto Hanuš, PhD.