



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ



Postup rychlého aproximačního odhadu obsahu lysozymu v mléce rutinní metodou infračervené spektrometrie

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali:

Oto Hanuš¹, Klára Bartáková², Hana Nejeschlebová¹,
Lenka Vorlová², Pavlína Navrátilová², Marcela Klimešová¹,
Jaroslav Kopecký¹, Radoslava Jedelská¹, Ludmila Nejeschlebová¹,

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

2 Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie

ISBN: 978-80-88390-11-4

Prosinec 2025

Vydavatel:

Pro: Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., a Veterinární univerzitu Brno
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/veterinari-lekarstvi>

Pořadí vydání:

1. vydání, 2025

Podíl autorů na tvorbě metodiky:

30 % Oto Hanuš
15 % Klára Bartáková
15 % Hana Nejeschlebová
10 % Lenka Vorlová
10 % Pavlína Navrátilová
5 % Marcela Klimešová
5 % Jaroslav Kopecký
5 % Radoslava Jedelská
5 % Ludmila Nejeschlebová

Podíl firem na tvorbě metodiky:

65 % Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha
35 % Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Podíl projektů na tvorbě metodiky:

65 % QK21010212
35 % QK21010326

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 procesy a analýzy mléka, vedoucí laboratoře a technologie výroby
- 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-V11
- b) Výzkumného projektu č. QK21010326 s názvem: „Možnosti ovlivňování výskytu inhibičních látek v mléce jako účinný nástroj vedoucí k podpoře zdraví zvířat a ke zvyšování kvality a bezpečnosti potravin, jako výsledek QK21010326-V56.

Obsah

Cíl metodiky.....	2
Nejčastěji použité zkratky:	2
Vlastní popis metodiky.....	3
1) Úvod – literární podklady a současná situace	3
2) Cíl metodiky vývoje postupu pro rutinní stanovení Lysozymu (Lys) v syrovém kravském mléce	5
3) Vlastní metodika pro rutinní stanovení Lys v mléce	5
Materiál a metody.....	5
<i>Tvorba reprezentativní, základní kalibrační vzorkové sady pro Lys</i>	5
<i>Statistické postupy vyhodnocení</i>	6
Výsledky a diskuse.....	7
4) Závěr metodiky pro rutinní odhad obsahu lysozymu v mléce	14
Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice	15
Popis uplatnění metodiky.....	15
Ekonomické aspekty.	16
Seznam použité související literatury.....	17
Použité jiné literární prameny při tvorbě metodiky	17
Související normy.....	18
Seznam publikací, které předcházely metodice.	19
Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech a sbornících:.....	19
Předchozí tematicky relevantní metodiky k problematice stanovení složek a vlastností mléka metodou infračervené spektroskopie a kontroly kvality mlékařských analýz:.....	21

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) a kontroly mléčné užitkovosti (KU; individuální vzorky mléka – podpora zdravotního stavu dojnic zefektivněním prevence poruch sekrece mléka) prostřednictvím ověření modelu nepřímého stanovení lysozymu mléka.

Nejčastěji použité zkratky:

BMM = bod mrznutí mléka;

CF nebo C = České strakaté;

ČMSCH a. s. = Českomoravská společnost chovatelů;

ČR = Česká republika;

H = Holštýn;

HB = obsah hrubých bílkovin;

HPLC = vysoce účinná kapalinová chromatografie;

IVM = individuální vzore kmléka – z kontroly mléčné užitkovosti;

KAS = obsah kaseinu;

KKM = kontrola kvality mléka;

KU = kontrola mléčné užitkovosti;

L = obsah monohydrátu laktózy;

LF = laktoferin;

LRM = laboratoř rozborů mléka;

Lys = lysozym;

MIR-FT = technologie infraanalýzy mléka s celým spektrem pomocí Michelsonova interferometru a s využitím Fourierových transformací;

MOC = koncentrace močoviny;

PSB = počet somatických buněk;

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

STP = obsah sušiny tukuprosté;

T = obsah tuku;

VOD = elektrická vodivost (konduktivita) mléka, měrná vodivost;

VMK = obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku;

VÚM = Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha.

Vlastní popis metodiky.

1) Úvod – literární podklady a současná situace

Obecné informace – Lysozym (Lys)

Lysozym (Lys) v mléce je bioaktivní enzym (proteinový nosič apoenzym a aktivní složka koenzym, obsažen ve slinách, slzách, plazmě, vaječném bílku) s antibakteriálními vlastnostmi pro svou schopnost lýzovat bakteriální stěnu. Lys byl popsán již v roce 1922 Alexandrem Flemingem. Z vaječných bílků je prakticky používán jako konzervační složka v minimálních koncentracích např. v sýrařství nebo kosmetice. Bovinní mléko typicky obsahuje 0,05 až 0,22 mg/l Lys (CHANDAN et al., 1964; PICCININI et al., 2005; YANG et al., 2011), zatímco lidské 200 – 400 mg/l (od 3 do 3000 mg/l).

Z uvedených důvodů praktické aplikace je Lys často předmětem izolace z biologických zdrojů a následné purifikace. Nejčastěji se jako zdroj používá vaječný bílek. Již dříve (CHANDAN et al., 1965), při izolaci Lys z bovinního mléka, byla zaznamenána specifická aktivita 0,35 oproti 1 ve srovnání k Lys z vaječnému bílku, pozorovaný izoelektrický bod byl při pH 9,5, přičemž molekulová hmotnost byla mezi zdroji podobná. EITENMILLER et al. (1975) uvedli pro Lys bovinního mléka 154 aminokyselin a nápadnou odlišnost od Lys lidského mléka a vaječného bílku s ohledem na počet aminokyselin. Lys z kravského mléka byl tepelně stabilnější, než z mléka lidského při pH 4,0, ale labilnější při pH 7,0 a 9,0.

YANG et al. (2011) uvedli výrazně nižší obsah Lys v bovinním mléce (stopová množství) oproti lidskému a zmínili potenciál transgenních biotechnologických metod pro možnost zvýšení produkce Lys prostřednictvím kravského mléka. U transgenního skotu (4 ks) našli hladiny Lys v průměru od 13,25 do 25,96 mg/l (exprimace rekombinantního lidského Lys – měřeno radioimunoanalýzou) a uvedli tak podobné nutriční výhody jako pro lidské mléko. Tyto transgenní dojnice, oproti netransgenním (konvenčním), nevykazovaly významné rozdíly pro obsahy tuku, bílkovin, laktózy a sušiny v mléce (4,82, 3,32, 4,81 a 13,65 % versus 4,5, 3,41, 4,89 a 13,5 %).

BRODZIAK et al. (2012) popsali vlivy na obsah Lys v kravském mléce pro plemeno, sezónu a krmný systém v Polsku: Polský Holštýn jaro a léto 8,66 µg/l a podzim a zima 7,36 µg/l; Červený polský Holštýn (Red) 10,17 a 9,64 µg/l; Simmental 10,85 a 10,36 µg/l; Jersey 12,66 a 11,92 µg/l; směsná krmná dávka (TMR) 10,39 a 10,1 µg/l; konvenční krmný systém 11,26 a 10,6 µg/l.

Dlužno rovněž hned v úvodu podotknout, že v relevantní odborná i vědecká literatura zahrnuje značné disproporce v jednotkovém srovnání obsahu Lys v syrovém kravském (ale i jiném) mléce (dále v některých zdrojích Lys – mléko (kravské, buvolí, lidské), krev, vaječný bílek (slepičí vejce), potraviny jako sýr – po přídavcích), v aktivitě nebo hmotnostních jednotkách a výsledcích, dále za různých metodických (analytických i fyziologických) podmínek, což značně komplikuje případná srovnání v diskusi.

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

Sledování a vyhodnocování kvality syrového mléka pomáhá plnit důležitou společenskou zakázku (BAUMGARTNER et al., 2000). Infračervená spektroskopie hraje v mlékařství již cca 60 roků stále důležitější 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.

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. Do analytického portfolia MIR-FT v rutinní mlékařské analytice tak postupně vstoupily položky typu minoritních složek mléka, jako např. močovina, volné mastné kyseliny, kyselina citronová, ketony a hlavní mastné kyseliny mléčného tuku a jejich skupiny (SOYEURT et al., 2006; HANUŠ et al., 2008 a, b, 2009 a, b, c, d, f, g, 2011 a, b, 2013; VAN KNEGSEL et al., 2010; SAMKOVÁ et al., 2020). V neposlední řadě může být toto portfolio rozšířeno (současný výzkum a vývoj) dále o specifické položky bioaktivních bílkovin v mléce, jako laktoferin (transferin; SOYEURT et al., 2007, 2012; NEJESCHLEBOVÁ et al., 2023 a, 2024) a lysozym (enzym), které jsou významné v imunitním systému savců a jsou ve významném vztahu k mastitidnímu onemocnění, tedy důležité pro efektivní kontrolu zdravotního stavu mléčné žlázy.

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 lysozymu je méně předpokládanou k využití pro specifické vlastnosti této minoritní složky mléka (velmi nízká koncentrace v multikomponentním systému mléka), spíše jako informace v poradenství ke kvalitě mléka a zdraví dojnic.

Z hlediska měření Lys v kravském mléce prostřednictvím MIR-FT doposud nebyly nalezeny záznamy. Infračervená spektroskopie byla použita při technologických měření (CACCAMO a MAGAZÙ, 2022) vodných roztoků Lys, aby se zvýraznila jeho bioprotektivní role. Stejně tak byla (VENKATARAMANI, et al., 2013) metodou FTIR měřena tepelná stabilita (25 – 95 °C) Lys vaječného bílku slepičích vajec. Z technologických důvodů studia tepelné stability materiálů v potravinářství byly Ramanovou spektroskopií studovány strukturální změny směsi bovinní syrovátka s alfa laktalbuminem, beta laktoglobulinem a lysozymem slepičích vajec (HOWELL a LI-CHAN, 1996). Dále CHIARIN et al. (2023) hodnotili použití metody infračervené spektroskopie v blízké oblasti (FoodScan, NIRS DS2500 SCiO) k detekci přídavku Lys pro posuzování autenticity sýru Grana Padano. Přidání Lys bylo predikováno s citlivostí od 0,52 (SCiO) do 0,73 (kolorimetr). Obecně lze shrnout, jako základní fakt, už jen z často použitého přídavkového postupu, že se vždy jednalo o významně vyšší koncentrace Lys v těchto aplikacích infračervené spektroskopie než u syrového kravského mléka.

Současné podmínky mlékařského analytického prostředí

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.

Analytické servisní laboratoře obecně, tedy i mléčné, musejí své metodické postupy obhajovat zpracovaným systémem metodického zabezpečení kvality výsledků analýz. Použité

postupy by tak měly být přesně popsány a validovány prostřednictvím výsledků účelově provedených testů se statistickým vyhodnocením. Proto dává smysl vyhodnotit a popsat možnosti predikce hodnot lysozymu (Lys) syrového mléka prostřednictvím rychlé nepřímé analytické metody MIR-FT.

Naše pracoviště se již dříve, dlouhodobě, a až doposud, zabývalo vývojem různých kalibračních modelů a referenčních standardů pro kalibrace infračervené spektroskopie a výkonnostní testování analytické způsobilosti v rámci akreditačních procesů i periodickými školeními příslušného odborného personálu v mlékařství k analýzám nejrůznějších mléčných analytů: HANUŠ et al., 2006 a, b, 2007, 2008 a, b, 2009 a, b, c, d, e, f, g, 2011 a, b, 2013; SOJKOVÁ et al., 2009; SAMKOVÁ et al., 2017, 2020; NEJESCHLEBOVÁ et al., 2023 a, b, 2024.

2) Cíl metodiky vývoje postupu pro rutinní stanovení Lysozymu (Lys) v syrovém kravském mléce

Cílem metodiky je vyvinout aproximační kalibračně-predikční model pro stanovení obsahu lysozymu (Lys) nepřímou metodou infračervené spektroskopie ve středové oblasti s Fourierovou transformací (MIR-FT) pro možnost příspěvku ke spektru informací o zdravotním stavu mléčné žlázy v mlékařské praxi.

3) Vlastní metodika pro rutinní stanovení Lys v mléce

Materiál a metody

Tvorba reprezentativní, základní kalibrační vzorkové sady pro Lys

Byly odebírány individuální vzorky mléka dojníc. Pro odběr vzorků v souboru zahrnuté dojnice byly specificky a cíleně selektovány. Charakteristiky mléčných ukazatelů (zejména PSB) jsou zde záměrně ovlivněny směrem k horšímu zdravotnímu stavu dojníc z hlediska pravděpodobnosti výskytu subklinických mastitid. Vzorky (n = 120) byly odebírány ve čtyřech chovech dojeného skotu v České republice (ČR) v oblasti severní Moravy. Zahrnuta byla dvě stáda dojníc plemene České strakaté (Czech Fleckvieh, CF, nadmořská výška chovu 375 a 530 m) a dvě stáda plemene Holštýn (Holstein, H, 258 a 262 m). Korespondující průměrné roční teploty činily: 7,3; 7,4; 9,2; 8,8 °C. Průměrná dojivost stád dojníc (pro počet krav, ks) za normovanou laktaci (305 dní) byla: CF 7 583 (120) a 5 941 kg mléka (297); H 12 105 (439) a 9 557 kg (277). Vzorky byly odebírány během jednoho roku (prosinec 2022 až září 2023). Celkem byly provedeny 4 odběry (CF a H v zimním krmném období a CF a H v letním krmném období), při každém vzorkování bylo odebráno 30 vzorků.

Odběry tak při tvorbě referenční sady vzorků mléka výsledkově zahrnovaly průměrné podmínky chovu dojníc pro ČR z hlediska vlivu sezóny, plemene a dojivosti. Při každém odběru a následné selekci individuálních vzorků mléka při pravidelné kontrole užitkovosti (KU) byla zahrnuta 1/3 vzorků od krav na první laktaci a 2/3 vzorků ze stáda na 2. a vyšší laktaci, maximálně na 6. laktaci. Byly vždy vzorkovány dojnice od 10 do 200 dnů laktace tak, aby cca 1/3 vzorků pocházela od krav s počtem somatických buněk (PSB) do 300 tis./ml a 2/3 od krav s PSB nad 300 tis./ml, maximálně do 5 000 tis./ml v předchozím kontrolním dni (cca před dvěma týdny) pro zajištění potřebné větší variability PSB (z kalibračních důvodů) v referenční sadě vzorků.

Analýzy a analytické postupy pro vzorky mléka

Stanovení lysozymu (Lys) metodou vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s iontově-párovacím činidlem. Vzorky mléka byly odstředěny (3 000 otáček/15

minut/5 °C) a z povrchu byl mechanicky odebrán tuk, 50 ml takto upraveného vzorku bylo vysráženo 10% kyselinou octovou na hodnotu pH 4,6. Po odstředění byla syrovátka oddělena od kaseinu, a před vlastním stanovením přefiltrována přes nylonový membránový filtr (0,22 µm) do vialek pro HPLC stanovení. Vlastní stanovení bylo provedeno kapalinovým chromatografem Alliance 2695 s PDA 2996 detektorem (Waters, USA) a kolonou Poroshell 300SB-C8, 2,1 x 75 mm, 5 µm (Agilent Technologies, USA). Bylo použito gradientové eluce a průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min (voda/acetonitril/kyselina trifluoroctová), teplota kolony činila 50 °C, objem nástřiku byl 10 µL. Analyty byly detekovány při 205 nm. Pro sběr a vyhodnocování dat a chod kapalinového chromatografu byl použit software Empower 2 (Waters, USA).

Všechny vzorky byly dále změřeny metodou MIR-FT (BENTLEY INSTRUMENTS: DAIRYSPEC FT, 2012) za použití přístroje DairySpec FT (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA). Při kalibrační a kontrolní činnosti bylo postupováno v rámci norem: ČSN EN ISO/IEC 17025; ČSN 57 0536; ČSN 57 0530; ČSN ISO 8196-1 (570536); ČSN ISO 8196-2 (570536) a ČSN ISO 8196-3 (570536). MIR-FT metodou:

- byly vzorky analyzovány na obsah laktoferinu (LF) s využitím firemní kalibrace Bentley Instruments Inc. (Chaska, MN, USA);
- byla zaznamenána IR (infračervená) spektra vzorků pro možnost vývoje nové kalibrace využívající referenční hodnoty Lys získané metodou HPLC;
- byly vzorky analyzovány na obsahu tuku (%), hrubých bílkovin (%), kaseinu (%), monohydrátu laktózy (%), tukuprosté sušiny (%), celkové sušiny (%), močoviny (mg/l), volných mastných kyselin (mg/100g tuku) a kyseliny citronové (%).

Ve všech vzorcích bylo také provedeno stanovení PSB (tis/ml), měrné vodivosti (mS/cm) a bodu mrznutí (BMM; °C). PSB byl stanoven metodou průtokové cytometrie na přístroji Somacount 300 (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA) v souboru A a přístrojem Fossomatic 7 (Foss Analytical A/S, Hillerød, Dánsko) v souboru B. Přístroje byly pravidelně kalibrovány (ČSN EN ISO 13366-1 a ČSN EN ISO 13366-2) a kontrolovány. Elektrická konduktivita (měrná 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. BMM byl stanoven kryoskopem Cryo-Star automatic (Funke-Gerber, Německo). Přístroj byl pravidelně kalibrován standardy solných roztoků (Funke-Gerber, Německo).

Laboratorní analýzy probíhaly na pracovištích:

- Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., pracoviště Šumperk (všechny analýzy kromě stanovení Lys a LF metodou HPLC);
- Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie (stanovení Lys a LF metodou HPLC).

Statistické postupy vyhodnocení

Soubor byl popsán základními statistickými parametry (aritmetický průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient, minimum, maximum a medián). Vyhodnocení bylo provedeno s použitím programu MS Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA). Hodnoty PSB, LF a Lys byly pro výpočty použity v původní a logaritmicky transformované (log₁₀) formě pro vyrovnání frekvenční distribuce dat ke statistice a také pro získání geometrického průměru.

Zaznamenaná spektra MIR-FT vyhodnotil s ohledem na referenční hodnoty Lys HPLC 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 Lys metodou MIR-FT za použití statistické metody částečných nejmenších čtverců (PLS). Po některých záchytech Lys pod detekční limit metodou HPLC bylo do hodnocení kalibračního modelu nakonec zahrnuto 90 vzorků z 3 ze 4 odběrů.

Byly vypočteny lineární regrese a korelační koeficienty (r) mezi vybranými ukazateli, tedy především mezi referenčními hodnotami Lys a dalšími mléčnými ukazateli. Významné korelace (s pravděpodobností nulové hypotézy $P \leq 0,05$, nebo $P > 0,05$ a na dalších konvenčních hladinách) byly testovány.

Výsledky a diskuse

Charakteristiky základní vzorkové kalibrační (referenční) sady pro Lys

Základní charakteristiky (parametry) kalibrační sady, z hlediska sledovaných mléčných ukazatelů, jsou v Tab. 1 s uvedením referenčních hodnot pro Lys. Výsledky poukazují na celkem běžné složení a vlastnosti kravského mléka v ČR. Dále, z rozdílu mezi aritmetickým průměrem a geometrickým průměrem PSB (656 a 131 tis./ml ($n = 90$)) je zřejmé vyšší zastoupení subklinických mastitid, na což bylo pro referenční sadu i cíleno. Referenční (HPLC) sada pro Lys vykazovala následující charakteristiky: $x = 35,0 \pm 53,3$ mg/l; $x_g = 27,7$ mg/l; $v_x = 152,0$ % ($n = 90$).

Korelační analýza hodnot Lys HPLC v kravském mléce, k ostatním vybraným mléčným (PSB, L (Obr. 1), VOD) ukazatelům s ohledem na vztah k mastitidnímu onemocnění mléčné žlázy (subklinická mastitida), ukázala poměrně významné vztahy k těmto ukazatelům, čímž potvrdila jasné vazby Lys na zdravotní stav mléčné žlázy, resp mastitidní situaci:

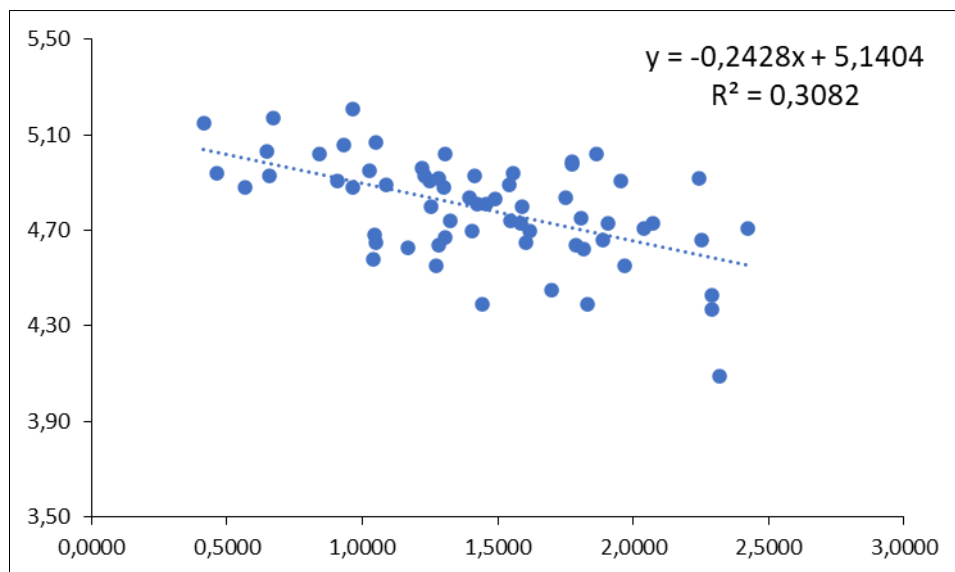
Lys HPLC \times PSB, $n = 90$, $r = 0,413$ ($P < 0,001$);

log Lys HPLC \times L, $n = 64$, $r = -0,555$ (Obr. 1; $P < 0,001$);

log Lys HPLC \times VOD, $n = 64$, $r = 0,409$ ($P < 0,01$).

Tyto výsledky ovšem, z hlediska odborné mlékařské literatury, zatím, není s čím srovnávat a možná jsou proto ojedinělé (pro L a VOD). PRIYADARSHINI a KANSAL (2002) však poukazují na prudký nárůst aktivity Lys v mléce bovinním, u krav s vysokým PSB (již nad 500 tis./ml), který je ještě strmější v mléce buvolím. Podobně zaznamenali dříve CARLSSON et al. (1989) u krav s akutní mastitidou. LITWIŃCZUK et al. (2011) také zaznamenali, že zvýšení PSB vyvolalo významné zvýšení imunoaktivních proteinů laktoferinu a lysozymu.

Obr. 1 Vzťah Lys HPLC k obsahu laktózy v kravskom mléce v IVM.



n = 64; r = -0,555 (P < 0,001).

Tab. 1 Základní statistické charakteristiky referenční sady vzorků pro model Lys (HPLC) kalibrace MIR-FT ohledně vybraných mléčných ukazatelů v individuálních vzorcích kravského mléka.

Ukazatel/Parametr	Lys	log Lys	PSB	log PSB	VOD	T	HB	KAS	L	STP	SC	VMK
Jednotka	mg/l	-	tis./ml	-	mS/cm	%	%	%	%	%	%	mmol/100 g tuku
n	90	64	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
x	35,0	1,4431	656	2,1171	4,65	4,03	3,54	2,81	4,82	9,07	13,81	0,64
xg	27,7		131									
sd	53,3	0,4834	1 190	0,9069	0,34	0,75	0,36	0,41	0,23	0,35	1,09	0,09
vx (%)	152,0		181,4		7,4	18,7	10,3	14,5	4,8	3,9	7,9	14,3

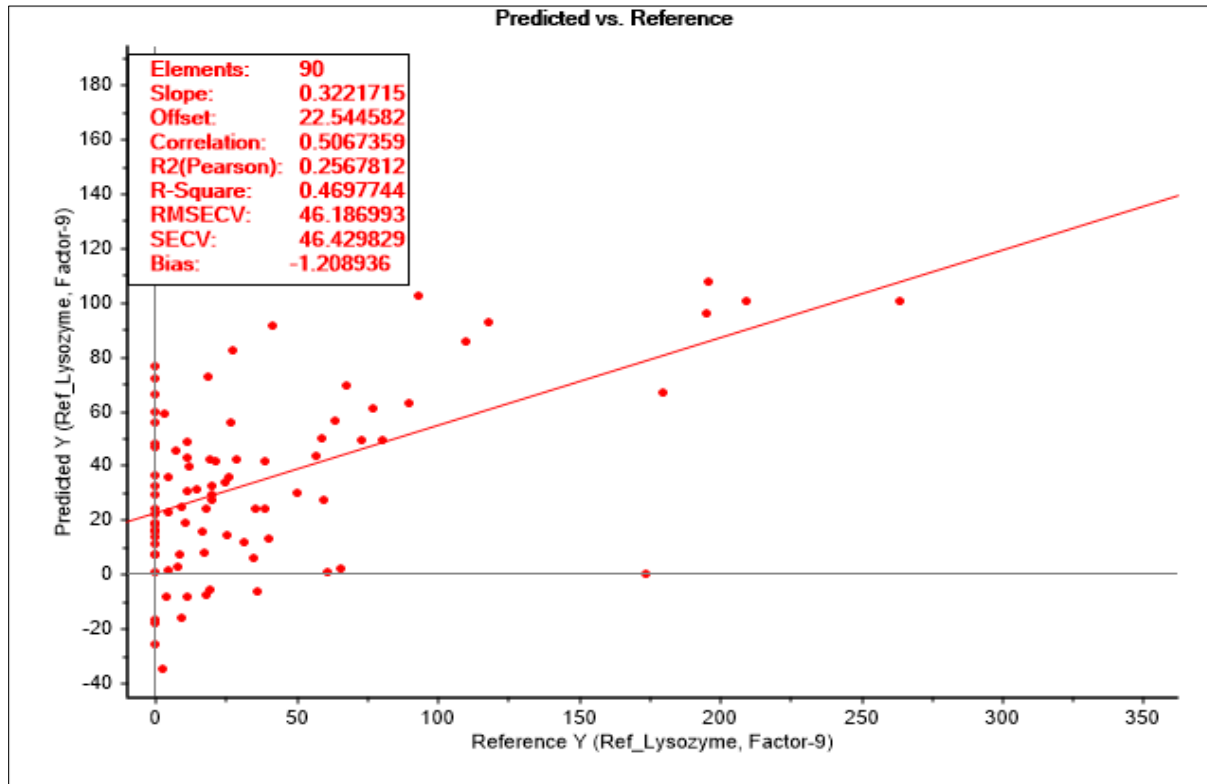
n = 90; n počet případů; x aritmetický průměr; xg geometrický průměr; sd směrodatná odchylka; vx variační koeficient; Lys = lysozym; PSB počet somatických buněk; VOD elektrická vodivost (konduktivita, měrná vodivost); T obsah tuku; HB obsah hrubých bílkovin; KAS obsah kaseinu; L koncentrace monohydrátu laktózy; STP obsah sušiny tukuprosté; SC obsah sušiny celkové; VMK obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku.

Výsledky korelační analýzy kalibračních modelů Lys pro MIR-FT

V současnosti se jeví jako aktuální rozšířit analytické portfolio MIR-FT na bioaktivní molekuly mléka, laktoferin (LF) a lysozym (Lys). Zatímco k tomuto typu analýzy pro laktoferin informace existují (SOYEURT et al., 2007, 2012; NEJESCHLEBOVÁ et al., 2023 a, 2024), pro lysozym nebyly zatím nalezeny žádné podklady. Je dost dobře možné, že tyto výsledky jsou jedny z prvních, nebo možná úplně první pokus pro stanovení Lys prostřednictvím MIR-FT v kravském mléce.

Metoda PLS se získaným pro kalibračním modelem pro měření Lys MIR-FT a lineárním regresním vztahem mezi výsledky Lys HPLC a Lys MIR-FT (Obr. 2) vykazala korelační koeficient 0,507. Ačkoliv je to vztah významný ($P < 0,001$), z analytického hlediska pro měření Lys v kravském mléce není příliš nadějný. Spíše se jedná o přibližný odhad Lys. Je zjevné, že řada měření, i když vzorky byly selektovány pro zahrnutí vyšší frekvence výskytu abnormálního mléka (subklinická mastitida dle PSB), se pohybovala kolem hodnoty 0, nebo pod detekčním limitem HPLC pro Lys ($n = 26$). Lze oprávněně očekávat, že se zde, s velkou pravděpodobností, při nízkém PSB, u normálního mléka bez mastitidní zátěže, pohybuje koncentrace Lys v kravském mléce až řádově podstatně níže. To by mohly dokládat i některé literární výsledky (PRIYADARSHINI a KANSAL, 2002). To jsou faktory, které také pravděpodobně neumožňují dosahovat lepší shody výsledků měření Lys MIR-FT v případě kravského mléka s Lys HPLC. Jen 25,7 % variability Lys ve výsledcích MIR-FT je tak determinováno variacemi ve výsledcích HPLC. Proto je takový případný výsledek MIR-FT jen velmi přibližným odhadem obsahu Lys v kravském mléce.

Obr. 2 Výsledný kalibrační model lineární regrese MIR-FT pro aproximační odhad obsahu lysozymu (Lys; mg/l) v syrovém kravském mléce ($n = 90$).



Craig Parsons (2024), Bentley Instruments, USA.

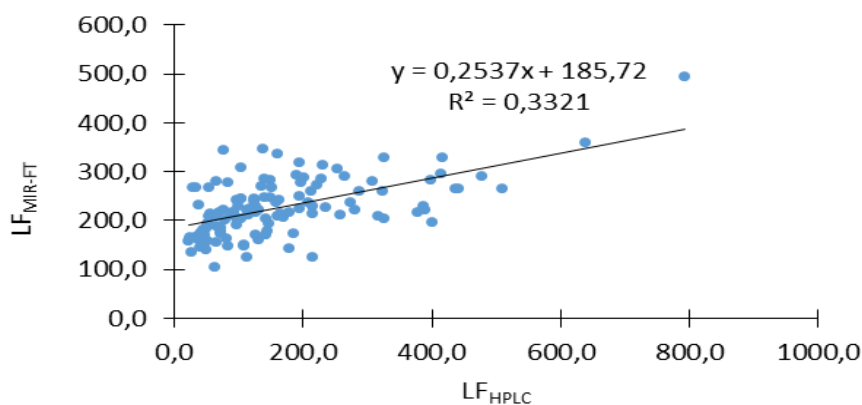
Počet metodou PLS zahrnutých faktorů do kalibračního modelu, pro vysvětlení variability referenčních dat lysozymu, byl vyšší (9), což model prakticky interpretačně oslabuje pro analytická měření právě jen na stupeň věrohodnosti výsledku jako aproximačního odhadu.

Diskuse vybraných aspektů aproximačního odhadu Lys kalibračním modelem pro MIR-FT

Pro měření Lys v kravském mléce nebyly zaznamenány odkazy odhadu prostřednictvím metody MIR-FT. Podobnou bioaktivní molekulou budící zájem výzkumu v mléce je laktoferin (LF). Jeho koncentrace v mléce je výrazně vyšší, i kdy stále i zde se jedná o velmi minoritní složku mléka. V této souvislosti již byly uvedeny některé záznamy výsledků stanovení LF metodou MIR-FT.

Koncentrace LF v kravském mléce může být obecně několikanásobně vyšší než Lys, za běžných okolností až 1000×, zatímco za podmínek výskytu mastitidy cca 10× (PICCININI et al., 2005; LITWIŃCZUK et al., 2011; YANG et al., 2011; BRODZIAK et al., 2012). To je tedy značný koncentrační rozdíl, který pro Lys metodicky zatěžuje samozřejmě věrohodnost výsledků analýz všech metod, nejen MIR-FT. Když byla provedena validační analýza měření LF v kravském mléce (Obr. 3) metodou MIR-FT (s původní kalibrací LF na metodu ELISA), korelace výsledků vztahu k referenční metodě HPLC činila 0,576. Nebyla tak obecně, pro měření stejného analytu, příliš přesvědčivá.

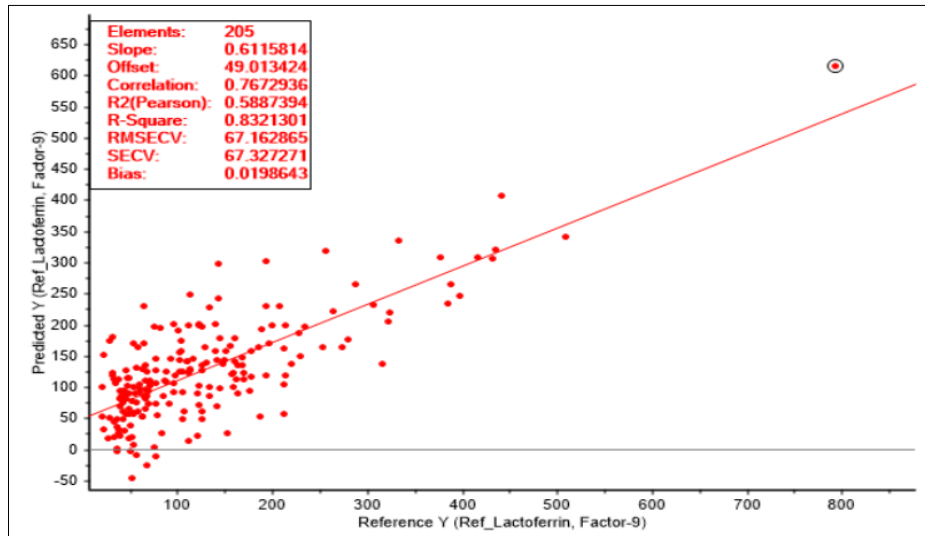
Obr. 3 Lineární regrese mezi laktoferinem (LF; mg/l) referenční metodou (LF-HPLC) a nepřímou metodou (LF-MIR-FT, DairySpec FT (kalibrace ELISA)) pro soubor IVM v kravském mléce (NEJESCHLEBOVÁ et al., 2024).



n = 120 (1/2 H + 1/2 C, 60 + 60; 1/2 léto + 1/2 zima, 60 + 60; jeden odběr 30); r = 0,576 (P < 0,001).

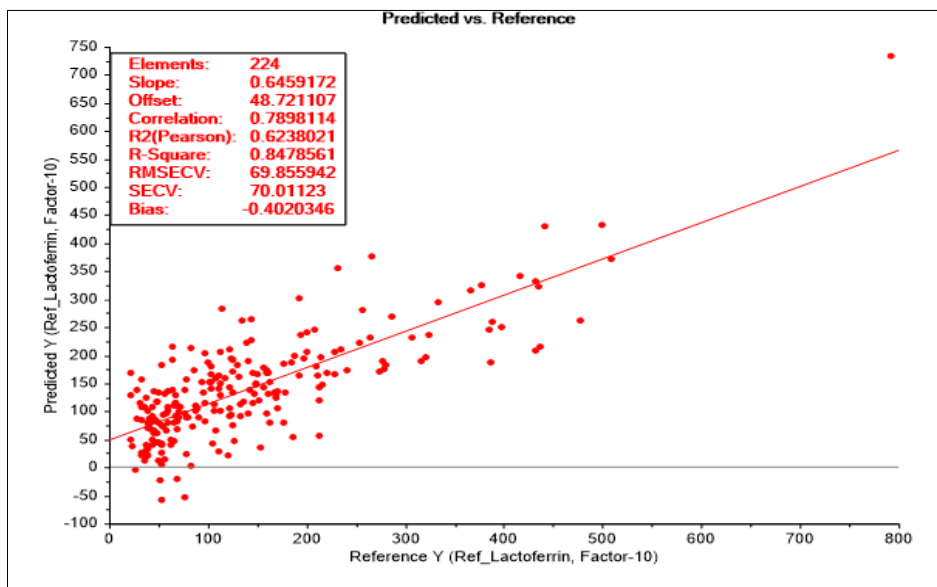
Tato byla zlepšena (Obr. 4) po derivaci nového kalibračního modelu (podle LF HPLC) MIR-FT na 0,767 (n = 205), což je již přijatelné (i když byl počet zahrnutých faktorů PLS vyšší, 9). Posléze bylo relativně „mírné zlepšení“ (Obr. 5) dosaženo po dalším přidavku selektovaných vzorků mléka (n = 224), při korelaci 0,79, ovšem se zahrnutím PLS faktoru 10. Při jednotkovém zvýšení LF HPLC pak vzrůstá LF MIR-FT o 0,612 a 0,646 mg/l (Obr. 4 a 5). Pracuje se však dále na možném zlepšení dalšími analýzami specificky selektovaných vzorků.

Obr. 4 Kalibrační model vztahu referenční LF HPLC (mg/l) a nepřímou LF MIR-FT (DairySpec FT) metodou v kravském mléce (NEJESCHLEBOVÁ et al., 2024).



n = 205 (2/3 H + 1/3 C; léto + zima); r = 0,767 (P < 0,001), 9 PLS faktorů; Craig Parsons (2024), Bentley Instruments, USA.

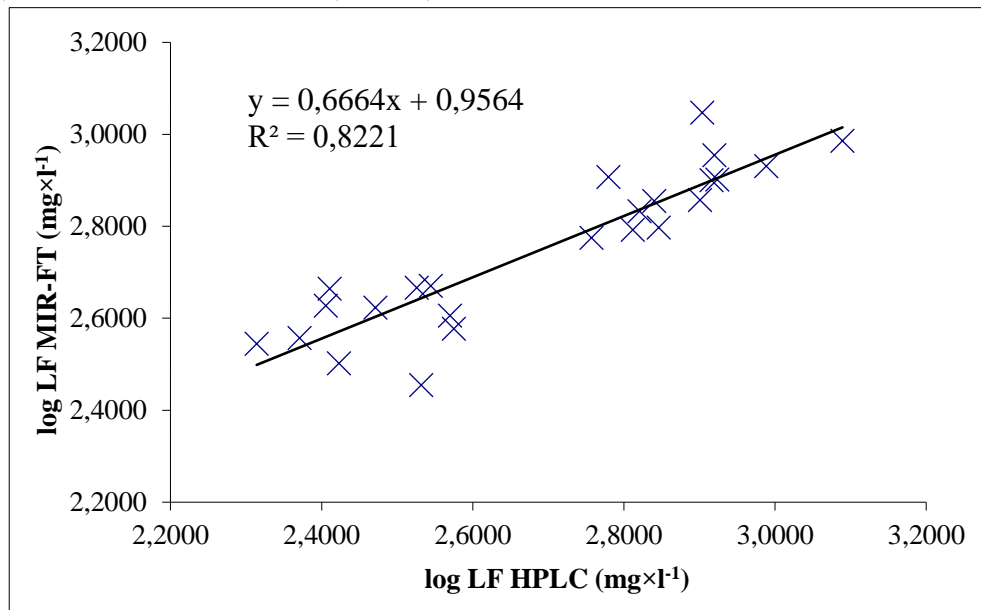
Obr. 5 Kalibrační model vztahu referenční LF HPLC (mg/l) a nepřímou LF MIR-FT (DairySpec FT) metodou v kravském mléce.



n = 224 (2/3 H + 1/3 C; léto + zima); r = 0,79 (P < 0,001), 10 PLS faktorů; Craig Parsons (2024), Bentley Instruments, USA.

Překvapivě zajímavý výsledek byl pak dosažen při v podstatě „nestandardním měření“ LF v kozím mlezivu (Obr. 6) pomocí MIR-FT s LF kalibrací na kravské mléko (původní, podle metody ELISA) při dosažení korelačního koeficientu k výsledkům LF referenční metodou HPLC 0,907.

Obr. 6 Vztah mezi výsledky stanovení laktoferinu v kozím mlezivu (NEJESCHLEBOVÁ et al., 2025) nepřímou metodou MIR-FT (s kalibrací na metodu ELISA v kravském mléce) a metodou referenční (HPLC).



$n = 24$; $r = 0,907$ ($P < 0,001$).

Takový výsledek je již příznivý z analytického pohledu, přestože variabilita průměrné diference činila $44,55 \pm 124,4$ mg/l (LF MIR-FT – LF HPLC), který byl však neýznamný ($P > 0,05$). Na první pohled je zřejmé, že vztah výsledků se zlepšil (r Obr. 2 $0,576 <$ Obr. 3 $0,767$) i přes použití nespécifické (irelevantní) kalibrace MIR-FT (r Obr. 3 $0,767 <$ Obr. 4 $0,899$ v původních hodnotách LF ($0,907 \log$ LF)) podél rostoucí koncentrace LF podle matrice. Zatímco v kravském mléce činila koncentrace LF $167,4 \pm 133,8$ ($n = 120$) mg/l a $96,1 \pm 91,2$ ($n = 91$) mg/l (HPLC; $n = 120$ (Obr. 2) a $n = 120 + 91$, Obr. 3), v kozím mléce byla $560,83 \pm 279,36$ mg/l (HPLC; $n = 24$; Obr. 4).

Uvedeným srovnáním lze metodicky vysvětlit, proč s dalším poklesem koncentrace Lys o 1 až 3 řády oproti LF v kravském mléce významně klesá schopnost MIR-FT v multikomponentním systému mléka detekovat specificky Lys s dostatečnou citlivostí, jakkoliv tyto dvě bioaktivní molekuly proteinů mohou být přibližně, z velikostního hlediska, porovnatelné.

Z diskutovaného výsledkového materiálu (Lys, LF) je zjevné, že koncentrace Lys v kravském mléce je tak velmi nízká, že se skutečně jedná o pomyslné „hledání jehly v kupce sena“ při představě jak komplikovaný, multikomponentní systém mléko vlastně představuje. Koncentrace Lys je tak blízká nejnižšímu detekčnímu limitu MIR-FT, ale částečně i použité metody HPLC, takže vlastní měření Lys MIR-FT nelze v podstatě nazvat ani měřením v pravém slova smyslu, ale spíše jen velmi přibližným odhadem, protože na druhé straně, nějaká pozitivní korelace ve vztahu výsledků obou metod pro Lys přece jen existuje.

4) Závěr metodiky pro rutinní odhad obsahu lysozymu v mléce

Postup tvorby praktické referenční sady pro získání aktuálního kalibračního modelu MIR-FT pro nepřímý odhad hodnot Lys by, po této validaci, měl respektovat zde v metodice uvedená pravidla:

- kvalifikovaným odhadem by počet vzorků v sadě měl být minimálně 90, aby model mohl dosahovat alespoň poměrně uspokojivých výsledků;
- individuální vzorky mléka (IVM) od stád dojnic v KU;
- IVM z dané relevantní oblasti, regionu či lokality;
- IVM v přibližném poměru podle zastoupení hlavních dojených plemen;
- IVM blízké po mlezivovém období do 1 měsíce laktace v cíleně zvýšeném zastoupení – specifický výběr;
- IVM mléka s vyšším zastoupením dojnic (60 - 70 %) s podezřením na subklinickou mastitidu (PSB cca mezi 700 až 2 500 tis/ml), do analýzy uložené v chladničce;
- měření referenčních hodnot relevantní referenční metodou, nikoliv semikvantitativními testy.

I za uvedených okolností je metoda MIR-FT při možnosti analýzy lysozymu v kravském mléce v podstatě na nejnižším limitu své schopnosti zachytu pro velmi nízkou běžnou koncentraci lysozymu v kravském mléce, kdy věrohodnost případně získávaných výsledků lze pak označit jen za velmi přibližný odhad.

Metodika nabízí validaci a možnosti selektivního použití nepřímé metody MIR-FT pro rychlý aproximativní odhad hodnot lysozymu v kravském mléce. Metodika je inovativním rozšířením portfolia nabízených analytických, rutinních, laboratorních služeb v oboru infračervené spektroskopie mléka.

Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice

- vyvinutá metodika byla předána pro užívání v systému kontroly kvality mléka a laboratorní práce (Svaz výrobců mléka a. s. Šumperk a Moravia Lacto a.s., Jihlava) v elektronické i písemné formě 14. 4. 2025;
- jedná se o nový a validovaný postup rychlého stanovení minoritní složky mléka, lysozym (Lys), které může být zařazeno do rutinního servisu mléčných laboratoří pro případ specifických požadavků chovatelů dojnic v doplňkové diagnostice zdraví mléčné žlázy jako použitelný aproximační odhad. Metodika rozšiřuje škálu analýz mléka metodou MIR-FT pro analytický potenciál portfolia rutinních mléčných laboratoří v ČR. Výsledky jsou jednak rozšířením dosavadních poznatků (použití metody HPLC jako referenční metody pro validaci stávajícího a vývoj nového kalibračního modelu, popis kalibrační sady vzorků pro stanovení Lys, analýza vztahů obsahu Lys stanoveného dvěma různými metodami k vybraným mléčným ukazatelům) a dále uvedením známých poznatků v nových souvislostech;
- vývoj postupu a metody rutinního aproximačního odhadu hodnoty obsahu Lys v mléce 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 mléčné užitkovosti a kvality mléka pro podporu kontroly zdravotního stavu dojnic a kvality mléka;
- uvedený postup rychlých analýz mléka zatím nebyl v ČR v kontrole mléčné užitkovosti ani kvality mléka používán.

Popis 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. Laboratoř rozborů mléka Brno, Českomoravská společnost chovatelů a. s. (ČMSCH a.s.) nebo provozní laboratoř mlékárny a výkupu mléka Moravia Lacto a.s., Jihlava);
- metodika postupu aproximačního rutinního stanovení lysozymu v syrovém kravském mléce pro podporu poradenství ke kvalitě mléka a zdraví mléčné žlázy dojnic byla vydána elektronicky. Informace o ní na MZe a do RIV. Pro širokou odbornou veřejnost bude metodika dostupná také z webových stránek <https://agronavigator.cz/>

Ekonomické aspekty.

Ekonomický dopad občasného rutinního stanovení lysozymu (Lys) může být součástí kontroly kvality mléka (KKM) a kontroly mléčné užitkovosti (KU) při využití výsledků ke zpřesnění diagnostiky zdravotního stavu mléčné žlázy dojnic a případně prevence produkčních poruch mléka. Vyvinutý a testovaný postup podporuje možnost zlepšení kontroly zdraví dojnic. Na bázi preventivní podpory zdraví dojnic může tvořit podíl do 0,2 % v celém segmentu.

Přímé ekonomické možnosti:

- v případě existence analytického zařízení (modu) na lokalitě rutinní mléčné laboratoře může kvalifikovaným odhadem náklad na rozběh analytické činnosti činit u uživatele metody cca 100 tis. Kč;
- v případě promítnutí rozšíření servisu do ceny za vzorek v mléčné laboratoři (vzrůst o 0,1 Kč na vzorek), u menšího podílu vzorků v KU, může přímá tržba uživatele metodiky (chovatelská organizace) vzrůst o cca 150 tis. Kč ročně (250 tis. analýz měsíčně v KU v ČR, individuální vzorky mléka). Efekt je opakovatelný po rocích;

Nepřímý ekonomický přínos:

- lze velmi těžko kvantifikovat, proto výše uvedení 0,2 % efektu z přínosu předpokládaného recovery v mléčné užitkovosti. Pokud by příspěvek Lys diagnostiky a všech dalších preventivních opatření ke zlepšení zdravotní situace z pohledu poruch sekrece mléka činil přínos znovunabytí mléka z předpokládané ztráty (během předchozího horšího stavu – dynamika lepšího PSB) plošně v ČR 0,3 %, bylo by to 8 085 000 kg mléka (roční produkce ČR 2 695 000 000 kg, nákup mlékáren 2023), při ceně v ČR 11,44 Kč za kg (září 2024) je výsledná suma 92 492 400 Kč, z ní 0,2 % je 184 984 Kč ročně přínosu metodického postupu. Efekt je opakovatelný po rocích.

Seznam použité související literatury.

Použité jiné literární prameny při tvorbě metodiky

- 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.
- BRODZIAK A., BARLOWSKA J., KRÓL J., LITWIŃCZUK Z.: Effect of breed and feeding system on content of selected whey proteins in cow's milk in spring-summer and autumn-winter seasons. *Annals of Animal Science*, 12, 2, 2012, 261–269. DOI: 10.2478/v10220-012-0022-6
- CACCAMO M. T., MAGAZÙ S.: Multiscale Spectral Analysis on Lysozyme Aqueous Solutions in the Presence of PolyEthyleneGlycol. *Molecules*, 27, 2022, 8760. DOI: 10.3390/molecules27248760
- CARLSSON A., BJÖRCK L., PERSSON K.: Lactoferrin and Lysozyme in Milk During Acute Mastitis and Their Inhibitory Effect in Delvotest P. *Journal of Dairy Science*, 72, 1989, 3166–3175.
- EITENMILLER R. R., FRIEND B. A., SHAHANI K. M.: Relationship Between Composition and Stability of Bovine Milk Lysozyme. *Journal of Dairy Science*, 59, 5, 1975, 834–839.
- HOWELL N., LI-CHAN E.: Elucidation of interactions of lysozyme with whey proteins by Raman spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 1996, 439–451.
- CHANDAN R. C., PARRY JR. R. M., SHAHANI K. M.: Purification and some properties of bovine milk lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, 110, 2, 1965, 389–398. DOI: 10.1016/S0926-6593(65)80046-7
- CHANDAN R. C., SHAHANI K. M., HOLLY R. G.: Lysozyme Content of Human Milk. *Nature*, 204, 1964, 76–77.
- CHIARIN E., NIERO G., CASSANDRO M., DE MARCHI M., PENASA M.: Application of UV-visible and near-infrared spectroscopies for the assessment of lysozyme addition, season of production and cow feeding in Grana Padano PDO cheese. *International Dairy Journal*, 142, 2023, 105642.
- LITWIŃCZUK Z., KRÓL J., BRODZIAK A., BARLOWSKA J.: Changes of protein content and its fractions in bovine milk from different breeds subject to somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 94, 2011, 684–691. DOI: 10.3168/jds.2010-3217
- PICCININI R., BINDA E., BELOTTI M., CASIRANI G., ZECCONI A.: Comparison of blood and milk non-specific immune parameters in heifers after calving in relation to udder health. *Veterinary Research*, 36, 2005, 747–757.
- PRIYADARSHINI S., KANSAL V. K.: Lysozyme Activity in Buffalo Milk: Effect of Lactation Period, Parity, Mastitis, Season in India, pH and Milk Processing Heat Treatment. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 5, 6, 2002, 895–899. DOI: 10.5713/ajas.2002.895
- 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, 1830-8.
- SOYEURT H., COLINET F. G., ARNOULD V. M. R., DARDENNE P., BERTOZZI C., RENAVILLE R., PORTETELLE D., GENGLER N.: Genetic Variability of Lactoferrin Content Estimated by Mid-Infrared Spectrometry in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 9, 2007, 4443–4450.

- 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, 3690–3695.
- VAN KNEGSEL A. T. M., VAN DER DRIFT S. G. A., HORNE MAN M., DE ROOS A. P. W., KEMP B., GRAAT E. A. M.: Short communication: 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, 7, 2010, 3065–3069.
- VENKATARAMANI S., TRUNTZER J., COLEMAN D. R.: Thermal stability of high concentration lysozyme across varying pH: A Fourier Transform Infrared study. *Journal of Pharm Bioall Science*, 5, 2013, 148–153.
- YANG B., WANG J., TANG B., LIU Y., GUO C., YANG P., YU T., LI R., ZHAO J., ZHANG L., DAI Y., LI N.: Characterization of Bioactive Recombinant Human Lysozyme Expressed in Milk of Cloned Transgenic Cattle. *PLoS ONE*, 6, 3, 2011, 1–10. e17593. DOI: 10.1371/journal.pone.0017593

Související normy

- ČSN 57 0530 (570530). Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Český normalizační institut, 1973.
- ČSN EN ISO 13366-1 (57 0531): Mléko - Stanovení počtu somatických buněk – Část 1: Mikroskopická metoda. Český normalizační institut. Praha, 2008.
- ČSN EN ISO 13366-2 (57 0531): Mléko - Stanovení počtu somatických buněk – Část 2: Návod pro ovládání fluoro-opto-elektronického přístroje. Český normalizační institut. Červenec 2007.
- ČSN EN ISO/IEC 17025. Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Praha, 2018.
- ČSN ISO 8196-1 (570536). Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 1: Analytické atributy alternativních metod. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Praha, 2016.
- ČSN ISO 8196-1 (570536). Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 1: Analytické atributy alternativních metod. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Praha, 2016.
- ČSN ISO 8196-2 (570536). Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 2: Kalibrace a řízení kvality v laboratoři při analýzách mléka alternativními metodami. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Praha, 2016.
- ČSN ISO 8196-3 (570536). Mléko - Definice a hodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 3: Protokol pro hodnocení a validaci alternativních kvantitativních metod pro analýzu mléka. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Praha, 2016.

Seznam publikací, které předcházely metodice.

Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech a sbornících:

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.* (In Czech) Sborník přednášek, 2 THETA Analytical standards and equipment, Zajištění kvality analytických výsledků, ISBN: 978-80-86380-37-7, Komorní Lhotka, 2007, 33–50.

HANUŠ O., GENČUROVÁ V., JEDELSKÁ R., ŠTOLC L., KLÍMOVÁ Z., MOTYČKA Z., KOPECKÝ J.: *Validace a nejistoty měření koncentrace močoviny a bodu mrznutí mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR-FT) pro laboratoře kvality mléka. Validation and uncertainties of urea concentration and milk freezing point measurement via infrared spectroscopy (MIR-FT) for laboratories of milk quality.* (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 186, 2, 2009 a, 40–53.

HANUŠ O., GENČUROVÁ V., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R., MOTYČKA Z. jun., ČERNOCKÝ M.: *Interpretace výsledků experimentální kalibrace rutinních IR přístrojů pro měření látkového obsahu volných mastných kyselin (VMK) mléčného tuku. The interpretation of experimental calibration results of routine IR instruments for determination of free fatty acid contents of milk fat.* (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, L, 182, 2, 2008 a, 55–62.

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 Czech) 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, 2008 b, ISBN: 978-80-86380-46-9, 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).* (In Czech) Sborník přednášek, 2 THETA Analytical standards and equipment, Zajištění kvality analytických výsledků, ISBN: 978-80-86380-49-0, Komorní Lhotka, 2009 b, 211–237.

HANUŠ O., GENČUROVÁ V., ŠTOLC L., KUČERA J., SOJKOVÁ K., JEDELSKÁ R., KOPECKÝ J., DOLÍNKOVÁ A.: *Srovnání a vyhodnocení parametrů kalibrací metody infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT) podle výsledků referenčních metod pro složení kravského, kozího a ovčího mléka. A comparison and evaluation of calibration parameters of infrared spectroscopy method (MIR and MIR-FT) according to results of reference methods for cow, goat and sheep milk composition.* (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 187, 3, 2009 c, 51–59.

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 mikrodiffúzi a pomocí infračervené spektroskopie FT.* *Journal of Agrobiology*, 28, 1, 2011 a, 33–48.

- 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*, LVII, 5, 2009 d, 87–101.
- HANUŠ O., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R., ŠTOLC L., GENČUROVÁ V., SOJKOVÁ K., DOLÍNKOVÁ A.: Výsledky NRL-SM v internacionálním testování analytické způsobilosti referenčních metod pro základní složení syrového kravského mléka. Results of NRL-RM in international proficiency testing of reference methods for basic composition of raw cow milk. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 185, 1, 2009 e, 32–38.
- 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 Mendelianae Brunensis*, LXI, 6, 2013, 1669–1679.
- Nejeschlebová H., Hanuš O., Bartáková K., Samková E., Vorlová L., Navrátilová P., Borková M., Kučera J., Hasoňová L., Hálová K., Kopecký J.: Vybrané analytické a interpretační aspekty obsahu laktoferinu v kravském mléce. Selected analytical and interpretative aspects of lactoferrin content in cow milk. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 34, 196, 1, 2023 a, 1–7.
- NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., BARTÁKOVÁ K., VORLOVÁ L., NAVRÁTILOVÁ P., SAMKOVÁ E., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R.: Potenciál metody MIR-FT pro aproximační záchyt koncentrace laktoferinu v kozím mlezivu. Potential of the MIR-FT method for approximate detection of lactoferrin concentration in goat colostrum. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 2025, v tisku.
- 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. DOI: 10.3390/ani10061095; <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/6/1095>
- SOJKOVÁ K., HANUŠ O., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R.: Stanovení teplotního gradientu mezilaboratorního transportu vzorků mléka. Determination of thermogradient for interlaboratory milk sample transport. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 187, 3, 2009, 35–41.

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 a.

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 uplatněné metodiky mezi Výzkumným ústavem pro chov skotu, s.r.o., Rapotín a ČMSCH a.s., Praha, z 12.12.2006 b.

HANUŠ O., JEDELSKÁ R., GENČUROVÁ V., VYLETĚLOVÁ M., KOPECKÝ J., SOJKOVÁ K.: Metodika validace a odhadu nejistoty výsledků měření u minoritních složek a vlastností mléka pro nepřímé metody MIR a MIR-FT v laboratořích kontroly užitkovosti a kvality mléka. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 13.08.2009. Datum uznání 30.09.2009 f.

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. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 10.09.2009. Datum uznání 30.09.2009 g.

HANUŠ O., ROUBAL P., VYLETĚLOVÁ M., ELICH O., JEDELSKÁ R., HÖFER J.: 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 b. Datum uznání 13.12.2011.

SAMKOVÁ E., HANUŠ O., ŠPIČKA J., KLIMEŠOVÁ M., HASOŇOVÁ L., JEDELSKÁ R., TRÁVNÍČEK J., KOPECKÝ J., KALA R., ELICH O.: Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích a Českomoravskou společností chovatelů a. s. z 27.09.2017. Datum uznání 22.12.2017.

NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., KLIMEŠOVÁ M., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R., NEJESCHLEBOVÁ L.: Postup nepřímého, rutinního, rychlého odhadu hodnoty titrační kyselosti mléka. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha, Czech Bentley s.r.o. z 14.09.2023 a Svazem výrobců mléka a.s. Šumperk z 25.11.2024. Datum uznání 29.09.2023 b (osvědčení číslo 7632/2023-ČPI). ISBN 978-80-88390-08-4 (MILCOM)

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

NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., BARTÁKOVÁ K., SAMKOVÁ E., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R.:
Postup rychlého stanovení obsahu laktoferinu v mléce rutinní metodou infračervené
spektrometrie. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci metodiky mezi
Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha, Veterinární univerzitou Brno, Jihočeskou
univerzitou v Českých Budějovicích a Svazem výrobců mléka a.s., Šumperk z 25.11.2024 a
15.01.2025. Datum uznání 05.12.2024 (osvědčení číslo SVS/2024/176939-G). ISBN: 978-
80-88390-12-1 (MILCOM)

https://agronavigator.cz/sites/default/files/users/user446/Postup_rychleho_stanoveni_laktoferinu.pdf

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.

Datum: 10.03.2025

Za zhotovitele:

Prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.

