

číslo metodiky: QK21010212-V12

METODIKA

Detekce umělého snížení počtu somatických buněk v kravském mléce metodou MALDI-TOF MS

Autorský kolektiv:

Veronika Legarová, Soňa Formánková Herman, Lucie Kejřová Ryřová, Oto Hanuš, Kateřina Bořiková, Hana Neješlebová, Jaromír Ducháček, Matěj Bořik

Květen 2026

Vydavatel:

Česká zemědělská univerzita v Praze a Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce:

<https://agronavigator.cz/metodiky/zivocisna-vyroba>

1. Vydání 2026

ISBN 978-80-213-3561-5

Seznam autorů podílejících se na tvorbě metodiky:

Ing. Veronika Legarová, Ph.D.¹

Ing. Soňa Formánková Herman¹

Ing. Lucie Kejdová Rysová, Ph.D.¹

Prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.²

Ing. Kateřina Božiková¹

Mgr. Hana Nejeschlebová²

Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.³

Ing. Matěj Božik, Ph.D.¹

¹Katedra kvality a bezpečnosti potravin, Česká zemědělská univerzita v Praze

²Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha

³Katedra chovu hospodářských zvířat, Česká zemědělská univerzita v Praze

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

- 1) Odborník z daného oboru: Ing. Libor Janů, Ph.D., NEVITECH s.r.o., vedoucí chemické laboratoře (analýzy potravinových surovin)
- 2) Pracovník státní správy: MVDr. Jana Hornáčková, Státní veterinární správa, Praha, laktologický odborník, kontrola kvality

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum České republiky s číslem QK21010212 a názvem: Vývoj metod pro kontrolu manipulace kvality mléka určeného k dalšímu technologickému zpracování a zajištění jeho autenticity.

Obsah

1. Současný stav problematiky	4
2. Cíl metodiky	6
3. Vlastní popis metodiky	7
3.1 Princip metody	7
3.2 Potřebný materiál a chemikálie	7
3.3 Přístrojové vybavení a software	7
3.4 Pracovní postup	7
3.5 Výsledky vlastního výzkumu a vývoj metodiky	10
3.6 Závěrečné shrnutí	16
4. Srovnání „novosti postupů“	18
5. Popis uplatnění metodiky	19
6. Ekonomické aspekty	20
7. Seznam použité související literatury	22
8. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány	24

1. Současný stav problematiky

Falšování potravin představuje rozšířený fenomén motivovaný primárně ekonomickým ziskem, kdy je produktu o určité kvalitě uměle přisuzována vyšší hodnota. Tento trend se nevyhýbá ani mlékárenskému sektoru. Vedle tradičních forem falšování, jako je ředění nebo úprava chemického složení, se do popředí dostává problematika manipulace s ukazateli zdravotní nezávadnosti syrového mléka – zejména se zaměřením na počet somatických buněk (Ionescu et al., 2023). Pojem falšování mléka definoval Talkhan (2015) jako odstranění nebo nahrazení mléčných složek cizorodými látkami bez vědomí kupujícího. Mezi tyto látky patří voda, mléko jiného živočišného druhu, syrovátka, škrob, hydroxid sodný, formaldehyd, syntetické mléko, melamin, nemléčné bílkoviny, hovězí lůj, vepřové sádlo aj. Hlavním cílem falšování je ekonomický profit, nejčastěji dosažený navýšením objemu nebo zvýšením obsahu složek podléhajících zpeněžení, zejména tuku a bílkovin (Poonia et al., 2017).

Falšování mléka nelze chápat pouze jako přímý přídavek cizorodých látek či záměnu původní suroviny. V širším kontextu zahrnuje také zásahy, které zkreslují vlastnosti mléka a ovlivňují parametry určující jeho zdravotní, hygienickou či technologickou jakost. U syrového kravského mléka se tyto praktiky zaměřují především na ukazatele přímo související se zdravotním stavem mléčné žlázy, mikrobiální čistotou a celkovou vhodností suroviny k dalšímu technologickému zpracování (Hanuš et al., 2025).

V posledních letech nabývá na významu problematika umělé redukce počtu somatických buněk (PSB) v kravském mléce. PSB představuje jeden z nejvýznamnějších ukazatelů zdravotního stavu mléčné žlázy a hygienické kvality suroviny. Zvýšené hodnoty zpravidla signalizují zánětlivé procesy (klinické či subklinické mastitidy), které bývají doprovázeny nežádoucími změnami ve složení mléka, zejména v zastoupení bílkovin, peptidů a enzymů. Tyto změny negativně ovlivňují nejen zdravotní hledisko, ale i technologickou použitelnost mléka při dalším zpracování. Vzhledem k tomu, že PSB je klíčovým kritériem pro stanovení výkupní ceny a překročení legislativních limitů (400 tis./1 ml mléka) je spojeno s finančními postihy či odmítnutím suroviny, vzniká u producentů silná ekonomická motivace k neoprávněným zásahům. Technologické či fyzikální metody zaměřené na snížení deklarovaného PSB – bez reálného zlepšení zdravotního stavu stáda – představují specifickou formu falšování. Taková manipulace s kvalitativním parametrem vede ke zkreslení celkového obrazu o autenticitě mléka a ohrožuje bezpečnost i technologickou stabilitu celého výrobního řetězce (Carmo et al., 2023; Gwardys et al., 2025).

Současné analytické přístupy k detekci falšování mléka se zaměřují na sledování změn chemického složení, proteinového profilu či přítomnost specifických markerů. Tyto přístupy jsou vhodné i pro detekci artificiální redukce PSB z důvodu již dříve sledovaných změn chemického složení takto falšovaného mléka. V posledních letech se prosazují zejména metody hmotnostní spektrometrie, které umožňují detailní charakterizaci nízkomolekulárních i proteinových složek. Tyto metody lze využít jak k posouzení autenticity suroviny, tak k odhalování méně zjevných technologických zásahů. Význam těchto přístupů spočívá v komplexním hodnocení celého peptidického spektra mléka namísto sledování izolovaných ukazatelů. Pro hodnocení biologických a technologických změn v mléce a mléčných výrobcích se jako vysoce perspektivní jeví peptidomické přístupy, konkrétně metoda MALDI-TOF MS. Ta umožňuje rychlou analýzu a zachycení změn souvisejících se zásahy do přirozeného složení suroviny. Klíčovou výhodou je možnost pracovat se spektrálním profilem vzorku jako s celkem a následně vyhodnocovat intenzitu vybraných signálů i s pomocí pokročilých statistických nástrojů (regresivní a korelační analýza; PCA analýza; shluková analýza). (Capriotti et al., 2016; Punia et al., 2020; Wölk et al., 2020; Valletta et al., 2021; Song et al., 2024).

S rozvojem sofistikovaných forem falšování vyvstává naléhavá potřeba kontinuální inovace analytických metod zaměřených na integritu a autenticitu mléka. Klíčovou výzvou je právě detekce artificiální redukce počtu somatických buněk, která vyžaduje vývoj nových přístupů schopných zachytit i nepatrné změny v enzymatické aktivitě, proteinovém profilu či fyzikálně-chemických vlastnostech mléka po technologickém zásahu. Tato nutnost neustálého rozšiřování analytického instrumentária je zásadní pro včasné odhalování moderních manipulačních technik a pro dlouhodobé garantování vysoké úrovně bezpečnosti a kvality mléčných výrobků na trhu.

2. Cíl metodiky

Cílem metodiky je detekce falšování mléka připraveného pomocí umělého a cíleného odstranění somatických buněk z kravského mléka metodou hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací v přítomnosti matrice v kombinaci s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF MS). Tato metoda umožňující odhalit tuto cílenou manipulaci je důležitá nejen z hlediska boje proti potravinovým podvodům, ale i z hlediska ochrany férového obchodního prostředí a zachování objektivního systému hodnocení syrového kravského mléka.

3. Vlastní popis metodiky

3.1 Princip metody

Metoda využívá srovnání peptido-proteinových spekter (MALDI-TOF MS) zkoumaného syrového mléka s referenční databází vzorků upravených cíleným odstředěním somatických buněk. Identifikace falšování je založena na statistické významnosti změn v intenzitě charakteristických píků. Výsledkem analýzy je kvantifikace pravděpodobné míry manipulace se vzorkem.

3.2 Potřebný materiál a chemikálie

- Centrifugační zkumavky o objemu 15 ml a 1,5 ml
- Ultračistá voda
- Matrice pro MALDI roztok kyseliny alfa-kyano-4-hydroxyskořicové (acetonitril 50 %, voda 47,5 % a kyselina trifluoroctová 2,5 %; 10 mg/ml alfa-kyano-4-hydroxyskořicové - HCCA)
- MALDI destička z broušené oceli*
* v závislosti na použitém přístroji
- Kalibrační roztoky Bacterial Test Standard (Bruker #255343) a Peptide Calibration Standard II (Bruker #8222570)

3.3 Přístrojové vybavení a software

- Pipety od 1 do 10000 µl
- Laboratorní centrifuga s vhodným rotorem na 15 ml a 1,5 ml zkumavky
- Vortex
- Spektrometr MALDI-TOF s lineárním průletovým detektorem (Bruker Autoflex Speed, nebo podobný)
- Software pro akvizici spekter (např. flexControl, Bruker Daltonics)
- Software pro zpracování a export spekter (např. flexAnalysis, Bruker Daltonics)
- Software pro statistické zpracování výsledků

3.4 Pracovní postup

Odběr vzorku mléka

Pro vlastní analýzu je zapotřebí odebrat minimálně 2 ml reprezentativního vzorku syrového kravského mléka, který byl předem důkladně zhomogenizován. Tento objem se rozdělí na dvě alikvotní části: 1 ml je určen pro primární laboratorní zpracování a zbývající 1 ml slouží jako retenční vzorek (rezerva) pro případnou opakovanou analýzu či verifikaci

výsledků. Během přepravy a manipulace je nezbytné striktně dodržet chladírenský řetězec s teplotou pod 4 °C. Tato teplota je kritická nejen pro inhibici rozvoje mikroorganismů, ale především pro zachování biochemické stability vzorku. Prevence nežádoucích fyzikálně-chemických změn a enzymatické degradace je nezbytnou podmínkou pro udržení autentického peptido-proteinového profilu, který je pro následnou detekci falšování klíčový.

Příprava vzorku pro analýzu MALDI-TOF MS

1. Jeden mililitr vzorku je odpipetován do centrifugační zkumavky a je centrifugován za podmínek zajišťujících efektivní separaci mléčného tuku (doporučený parametr: 9000 × g po dobu 15 minut při teplotě 4 °C).
2. Reprezentativní podíl mléčné plazmy vzniklé v předchozím kroku je smíchán v poměru 1:1 s ultračistou vodou a po dobu 10 sekund je homogenizován*.
**Poznámka: Při zpracování většího počtu vzorků lze k ředění využít mikrotitrační destičky.*
3. Na čistou MALDI destičku je nanesen 1 µl připravené směsi, který je ponechán při pokojové teplotě zaschnout.
4. Po úplném zaschnutí je vzorek překryt 1 µl roztoku matrice a opět je ponechán při pokojové teplotě zaschnout.
5. Bezprostředně po zaschnutí je MALDI destička uložena do ocelového nosiče a je provedena akvizice hmotnostních spekter.
6. Během celého procesu přípravy a analýzy jsou dodržována standardní pravidla bezpečnosti práce v laboratoři a jsou používány odpovídající osobní ochranné pomůcky.

Analýza vzorků pomocí MALDI-TOF MS

Před zahájením samotné analýzy je vytvořena a kalibrována nová měřicí metoda, která je derivována ze standardního protokolu pro systém Biotyper (MBT_FC). Hmotnostní spektra jsou snímána v rozsahu 500 až 4 000 v lineárním pozitivním módu. Parametry iontového zdroje jsou nastaveny následovně: napětí IS1 19 890 V a IS2 18 450 V s napětím na čočce 6 000 V. Celkový záznam jednoho spektra je složen z 6 000 dílčích skenů (akumulovaných po 200 krocích). Každý vzorek mléka je analyzován v duplikátu (dvě nezávislá měření na MALDI destičce). Ke kalibraci přístroje jsou využity výše popsané standardy. Rozsah kalibrace může být mírně odlišný z důvodu užívaného přístrojového vybavení, je ale nutné pojmout rozsah 500 až 4000 Da.

Zpracování a vyhodnocení získaných dat

Veškerá získaná hmotnostní spektra jsou automaticky zpracována v softwarovém prostředí flexAnalysis. V rámci primárního zpracování dat je pro každé spektrum vygenerována základní linie (baseline), jejíž průběh je následně podroben manuální kontrole pro ověření správnosti korekce šumu. Tentýž software je poté využit k automatické detekci a generování seznamu píků (peak list) pro každý analyzovaný vzorek ve formátu (.xlsx). Tento výstup zahrnuje zejména hodnoty ploch píků a jejich přesné polohy, které jsou exportovány jako klíčové parametry pro navazující statistické vyhodnocení a identifikaci markerů falšování.

Míra lineární závislosti mezi plochou píků a PSB je analyzována pomocí Pearsonova korelačního koeficientu r . Statistická významnost tohoto vztahu je testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Síla pozorované závislosti je interpretována na základě absolutní hodnoty získaného koeficientu. Kladná hodnota koeficientu je uvažována jako projev přímé korelace, zatímco záporná hodnota indikuje korelaci nepřímou. Tyto statistické parametry jsou využity k identifikaci píků, jejichž intenzita senzitivně reaguje na změny v zastoupení PSB ve vzorku.

Kritické body

V rámci aplikace metody MALDI-TOF MS pro detekci falšování mléka jsou definovány následující kritické body:

- Během přepravy a skladování vzorků mléka je nezbytné striktně dodržet teplotu do 4 °C, aby byla zachována integrita peptido-proteinového profilu a zabráněno aktivaci nativních proteáz, které způsobují degradaci cílových analytů.
- Před zahájením měření je vyžadována precizní kalibrace přístroje s využitím standardů IVD Bacterial Test Standard a Peptide Calibration Standard II v souladu s instrukcemi výrobce pro zajištění reproducibility výsledků.
- Je třeba sledovat efektivitu separace lipidové frakce během centrifugace; nedostatečné odstranění tuku negativně ovlivňuje krystalizaci vzorku na MALDI destičce a vede k nežádoucímu potlačení ionizace.
- Po ukončení akvizice je prováděna systematická kontrola kvality získaných spekter; v případě detekce spekter s nulovými hodnotami nebo nevyhovujícím poměrem signálu k šumu je nutné provést okamžité přeměření vzorku.

Reprodukovatelnost metody

Metoda MALDI-TOF MS je celosvětově akceptována jako vysoce spolehlivý analytický nástroj, využívaný primárně pro klasifikaci a identifikaci mikroorganismů, ale stále častěji také

v rámci kontroly kvality a autenticity potravin. Reprodukovatelnost této techniky je hodnocena mnoha literárními zdroji jako vynikající, a to především díky její robustnosti prokázané v široké škále experimentálních podmínek. Současně je potvrzeno, že při striktním dodržení standardizovaných protokolů pro přípravu vzorků a parametrů měření je dosaženo vysoké míry srovnatelnosti spekter i mezi jednotlivými pracovišti.

3.5 Výsledky vlastního výzkumu a vývoj metodiky

Vlastní výzkum a vývoj metodiky byly zaměřeny na ověření možnosti detekce manipulace se syrovým kravským mlékem spočívající v artificiální redukci PSB pomocí odstředění a na posouzení využitelnosti metody MALDI-TOF MS pro zachycení změn v peptido-proteinovém profilu takto upravených vzorků. Vývoj metodiky byl veden s cílem navrhnout laboratorní postup umožňující odlišit přirozený stav vzorku od stavu vzniklého technologickým zásahem vedoucím k artificiální redukci PSB.

Soubor vzorků a experimentální uspořádání

Vzorky syrového kravského mléka byly odebírány v průběhu let 2023 a 2024 ze čtyř stád dojnic. V rámci sledovaných chovů byla zastoupena dvě nejrozšířenější plemena v České republice, konkrétně holštýnský skot a české strakaté plemeno, přičemž velikost stád se pohybovala v rozmezí 100 až 400 kusů. Dojení bylo prováděno pomocí strojních dojnicích systémů. Krmná dávka byla zajištěna systémem směsné krmné dávky (TMR) a doplňována koncentrovaným krmivem dle úrovně užitkovosti; na vybraných farmách byl uplatňován rovněž sezónní pastevní systém. S cílem eliminovat vliv sezónní variability byly odběry realizovány kontinuálně v průběhu celého kalendářního roku. Do výsledných analýz bylo zahrnuto celkem 68 tankových (směsných) vzorků mléka.

Pro účely vývoje a validace metodiky byly připraveny dva základní typy vzorků. První skupinu tvořily autentické vzorky syrového směsného kravského mléka s úrovní PSB do 400 tis./ml. Druhá skupina byla koncipována tak, aby pokrývala širší rozmezí hodnot PSB nezbytné pro následné testování a statistickou verifikaci citlivosti metody. Tyto vzorky byly připravovány cílenou kombinací syrového směsného mléka a individuálních vzorků mléka se subklinickou mastitidou (PSB nad 600 tis./ml). Takto definovaný soubor umožnil ověřit citlivost navrženého analytického postupu na změny v zastoupení PSB v dostatečně reprezentativním rozmezí hodnot.

Stanovení počtu somatických buněk (PSB)

Stanovení počtu somatických buněk bylo realizováno dvěma nezávislými analytickými postupy. Prvním přístupem byla průtoková cytometrie, při níž byla jádra buněk barvena ethidium bromidem a následně analyzována na přístroji SomaCount 300 (Bentley Instruments, USA). Jako druhý přístup byla využita fluorescenční metoda založená na barvení DNA propidium jodidem, přičemž měření bylo provedeno pomocí přístroje DeLaval Cell Counter (DeLaval, Sweden). Konečná hodnota PSB byla stanovena jako aritmetický průměr výsledků získaných oběma metodami. Tento kombinovaný postup byl zvolen s cílem maximalizovat spolehlivost referenčního stanovení PSB při verifikaci navržené metodiky.

Model umělé redukce PSB

Za účelem simulace manipulace se syrovým kravským mlékem byly všechny odebrané vzorky podrobeny procesu odstředování směřujícímu k redukci PSB. Před tímto zásahem byl soubor 68 vzorků klasifikován jako kontrolní skupina. Z každého vzorku o přibližném objemu 30 l byl nejprve odebrán podíl 1 l určený ke stanovení výchozí hodnoty PSB u neupraveného mléka. Zbývající část objemu byla následně technologicky zpracována centrifugací za účelem snížení počtu somatických buněk. Po provedení tohoto zásahu byly takto modifikované vzorky zařazeny do skupiny falšovaných vzorků.

Redukce PSB byla realizována pomocí kontinuálního odstředivého separátoru odpovídajícího původní konstrukci separátoru DeLaval. Centrifuga byla osazena bubnem s 12 talíři o průměru 100 mm. Separace probíhala při teplotě mléka v rozmezí 10 až 15 °C, frekvenci otáčení 11 000 ot./min, relativní odstředivé síle $3\,500 \times g$ a maximální odstředivé síle při vnějším poloměru bubnu dosahující $7\,000 \times g$. V případech, kdy během centrifugace došlo k oddělení minoritního podílu smetany (přibližně 20 ml), byla tato frakce navracena zpět do odstředěného mléka. Tímto postupem bylo zajištěno, že obsah tuku a ostatních hlavních složek ve falšovaných vzorcích odpovídal jejich původní úrovni v kontrolní skupině.

Odběr a příprava vzorků pro MALDI-TOF MS

Po provedení umělé centrifugace byly kontrolní i falšované vzorky homogenizovány a z každého byl odebrán minimálně 2 ml podíl. Jeden mililitr byl použit pro vlastní analýzu MALDI-TOF MS. Vzorky byly přepravovány při teplotě nižší než 4 °C, aby se zamezilo rozvoji nežádoucích mikroorganismů a jiným fyzikálně-chemickým změnám. Vlastní příprava vzorků pro MALDI-TOF MS byla založena na odtučnění mléka centrifugací, následném odběru mléčné plazmy, jejím ředění ultračistou vodou v poměru 1:1 (v/v), homogenizaci a nanesení na MALDI destičku s použitím vhodné matrice. Tento pracovní postup byl popsán v kapitole 3.4

a v rámci vývoje metodiky byl používán jako standardizovaný způsob přípravy všech analyzovaných vzorků.

Analýza vzorků pro MALDI-TOF MS

Analýza MALDI-TOF MS byla provedena pomocí přístroje Autoflex Speed (Bruker Daltonics), který byl vybaven laserem Smartbeam II (355 nm) a softwarem flexControl (verze 3.4, Bruker Daltonics). Pro účely měření byly vyvinuty lineární pozitivní metody s odlišnými hmotnostními rozsahy a variabilní akumulací spekter. Pro samotné vyhodnocení a tvorbu této metodiky byl využit rozsah m/z 500–4 000. Metoda určená pro nízkomolekulární peptidy a proteiny byla realizována s následujícími parametry: napětí IS1 19 890 V, napětí IS2 18 450 V, napětí na čočce 6 000 V a celkem 6 000 laserových výstřelů akumulovaných ve 200 krocích. Každý vzorek mléka byl analyzován ve dvou opakováních. Ke kalibraci metody byly využity standardy Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics) a Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics), přičemž odchylka se pohybovala v rozmezí 1–7 ppm. Kombinací obou standardů byl pokryt celý sledovaný hmotnostní rozsah m/z 500–4 000.

Zpracování spekter a statistické vyhodnocení

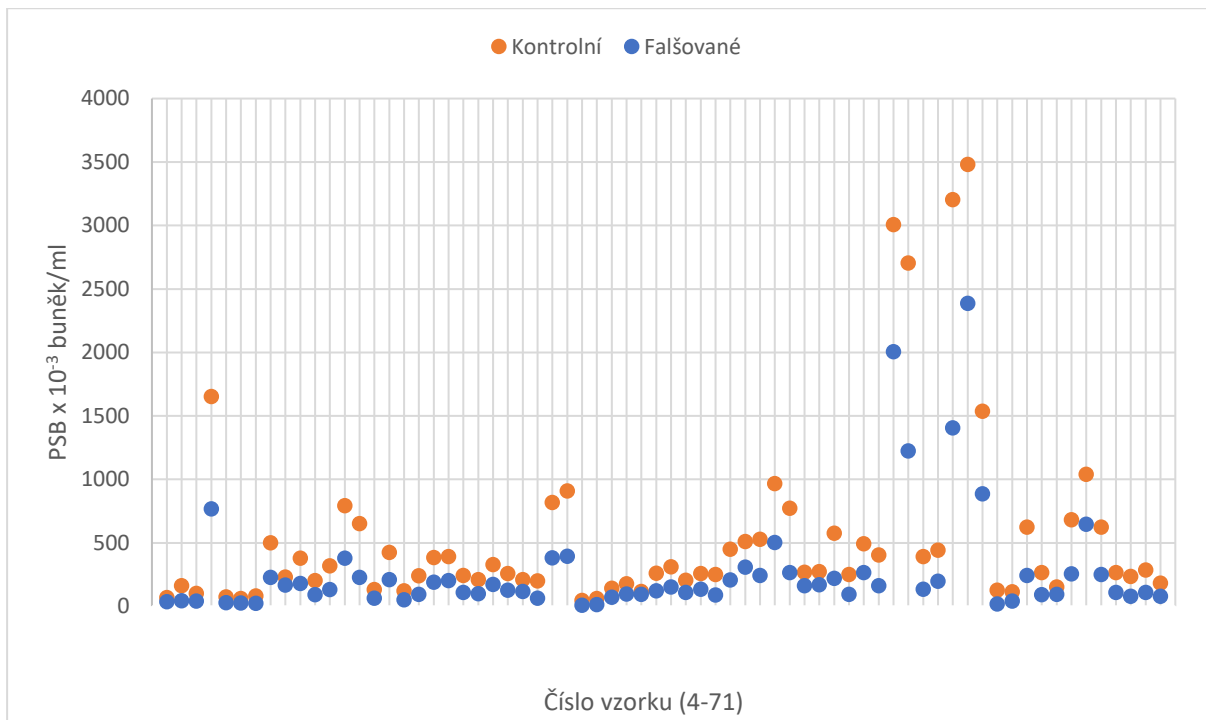
Veškerá získaná spektra byla automaticky zpracována v softwarovém prostředí flexAnalysis (Bruker Daltonics). Pro každé spektrum byla vygenerována základní linie (baseline), jejíž průběh byl následně verifikován, a poté byl vytvořen seznam píků (peak list) obsahující kvantitativní parametry pro jednotlivé vzorky mléka. Takto získaná data byla využita jako vstupní hodnoty pro následné statistické vyhodnocení. Pro ověření efektivity redukce PSB bylo využito grafické znázornění. Stupeň lineární závislosti mezi intenzitou, respektive plochou vybraných píků a hodnotou PSB byl hodnocen pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Statistická významnost těchto vztahů byla posuzována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Síla pozorovaného vztahu byla interpretována na základě absolutní hodnoty korelačního koeficientu a klasifikována do kategorií velmi slabá, slabá, střední, silná a velmi silná závislost. Celkové statistické zpracování bylo realizováno pomocí dedikovaného skriptu navrženého pro automatizované třídění dat a generování výsledkových sestav.

Výsledky analýzy

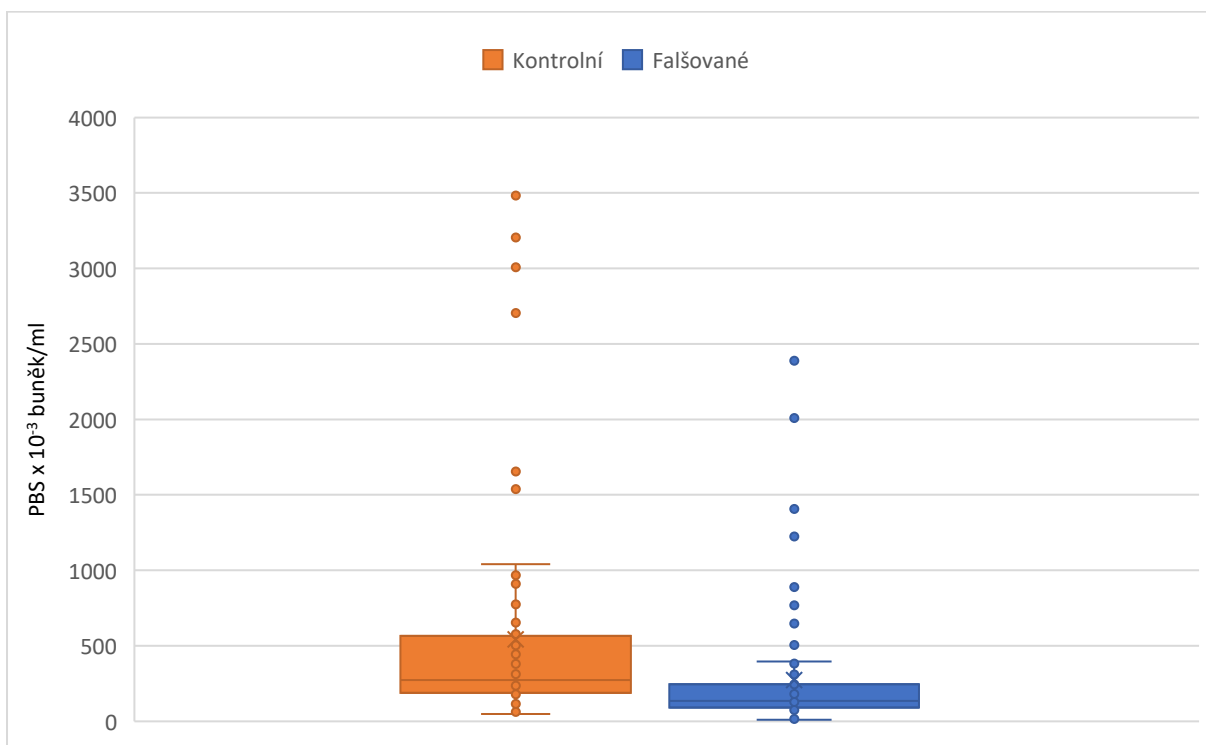
Interpretace výsledků byla zahájena posouzením účinnosti separačního systému při odstraňování somatických buněk. Grafické srovnání výsledků mezi kontrolní a falšovanou skupinou vzorků je znázorněno na obrázcích 1 a 2. Na obrázku 1 jsou zobrazeny všechny vzorky (kontrolní i falšované) spolu s jejich odpovídajícími hodnotami PSB. Obrázek 2 pak

prezentuje distribuční test pro celý soubor vzorků. Průměrný procentuální pokles PSB u všech hodnocených párů činil $45,9 \pm 11,6 \%$.

Obrázek 1: Rozdíly PSB ve vzorcích před a po falšování pomocí odstředění



Obrázek 2: Test distribuce PSB vzorků před a po odstředění



Navazujícím krokem byla detailní analýza získaných spekter z několika perspektiv. Nejprve byla ve všech vzorcích provedena detekce všech přítomných píků, reprezentujících jednotlivé peptidy. Data z této databáze byla následně využita pro identifikaci diferencí mezi kontrolními a falšovanými vzorky. Primárně byly výsledky zkoumány z hlediska výskytu píků specifických pouze pro jednu skupinu vzorků, avšak bylo zjištěno, že žádný z píků není charakteristický výhradně pro jednu sledovanou skupinu.

Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k porovnání kvantitativních parametrů (velikosti píků) mezi kontrolními a falšovanými vzorky, což vedlo k dosažení relevantních výsledků. Při zohlednění maximálního zastoupení píků v co nejvyšším počtu vzorků byl identifikován peptid o hmotnosti 901 m/z, u kterého byl ve falšovaných vzorcích zaznamenán 41% pokles intenzity ve srovnání s kontrolní skupinou. Podobně významný rozdíl byl pozorován u sloučeniny o hmotnosti 1 768 m/z, u které byl zaznamenán nárůst o necelých 29 %. Dosažené výsledky naznačují, že pro detekci falšování je sledování změn v kvantitativním zastoupení peptidů vhodnějším přístupem než pouhá detekce jejich přítomnosti či absence.

Vzhledem k tomu, že mezi srovnávanými skupinami (pomocí statistické metody ANOVA) nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly, bylo rozhodnuto o uplatnění alternativního metodického přístupu. Hmotnostní spektra byla statisticky vyhodnocena ve vztahu ke konkrétní hodnotě PSB v každém vzorku, nikoliv pouze na základě kategorizace do skupin. Píky, které byly dříve detekovány a jejichž plochy byly zaznamenány v databázi, byly podrobeny korelační analýze ve vztahu k variabilitě hodnot PSB. Tento přístup vedl k získání výrazně jasnějších a lépe verifikovatelných výsledků. Tabulka 1 prezentuje výstupy korelační analýzy vybraných píků v závislosti na změnách PSB.

Tabulka 1: Výsledky Pearsonovy korelační analýzy ploch píků v závislosti na změnách počtu somatických buněk (PSB) (n = 68)

m/z (Da)	2960,89	2960,2	2933,96	2922,16	2922,75	1786,56	2261,17	2943,75	2795,75	2261,75	939,746	939,098	1635,41	2908,12	1777,69
Korelace (Plocha vs PSB)	0,8482	0,8457	0,7019	0,6939	0,6905	0,6428	0,6363	0,6323	0,6195	0,6030	0,5963	0,5941	0,5939	0,5862	0,5860
Píky v x vzorcích	13	14	8	117	117	4	21	6	4	21	22	22	2	4	2
m/z (Da)	2785,17	1055,32	1055,75	2907,17	2934,84	2804,11	3477,44	1192,84	1192,47	1768,32	1768,69	3516,36	1807,01	1806,42	3517,35
Korelace (Plocha vs PSB)	0,5748	0,5486	0,5474	0,5296	0,5256	0,5242	0,5230	0,5163	0,5157	0,5134	0,5129	0,5105	0,5057	0,5041	0,4991
Píky v x vzorcích	4	75	75	3	6	2	2	55	56	133	133	3	31	31	3
m/z (Da)	901,15	1488,5	1886,04	1886,41	2813,77	2805,61	2113,52	2805,14	839,758	1093,15	1790,27	3478,57	2221,95	2811,58	1999,72
Korelace (Plocha vs PSB)	0,4852	0,4820	0,4817	0,4701	0,4629	0,4504	0,4502	0,4470	0,4402	0,4402	0,4402	0,4307	0,4165	0,4146	0,4143
Píky v x vzorcích	118	2	12	10	3	3	5	3	1	1	1	3	8	2	2
m/z (Da)	2905,99	2267,57	1168,7	1911,13	897,922	1154,38	2908,81	897,013	1450,88	1882,27	1882,99	802,421	801,732	2813,1	1998,13
Korelace (Plocha vs PSB)	0,4066	0,4058	0,4004	0,4004	0,3850	0,3844	0,3806	0,3405	0,3380	0,2956	0,2931	0,2900	0,2870	0,2797	0,2574
Píky v x vzorcích	2	3	1	1	3	136	2	4	3	8	8	73	81	6	22
m/z (Da)	2176,32	2437,56	1459,4	1622,56	1388,73	1722,74	1722,29	782,674	1623,43	1225,55	1350,58	3250,7	2837,11	2055,04	923,233
Korelace (Plocha vs PSB)	0,2442	0,2291	0,2121	0,2090	0,2014	0,1818	0,1815	0,1785	0,1526	0,1468	0,1189	0,1170	0,1020	0,0999	0,0906
Píky v x vzorcích	15	1	4	16	5	101	102	1	15	2	10	1	2	8	1
m/z (Da)	1453,06	2479,2	2489,87	1380,87	2489,32	1901,66	1539,4	3876,81	3877,33	2479,67	1200,69	1395,76	1494,94	2382,94	3261,89
Korelace (Plocha vs PSB)	0,0906	0,0800	0,0774	0,0678	0,0657	0,0590	0,0575	0,0544	0,0322	0,0301	0,0169	0,0123	0,0120	0,0071	0,0036
Píky v x vzorcích	1	78	6	9	7	1	5	51	51	77	5	1	122	3	12
m/z (Da)	1631,55	1268,7	1632,07	1386,05	1267,66	747,934	1494,27	2838,47	2774,01	1684,05	2332,23	930,659	3041,74	1602,61	792,156
Korelace (Plocha vs PSB)	-0,0014	-0,0027	-0,0067	-0,0102	-0,0103	-0,0112	-0,0115	-0,0169	-0,0177	-0,0245	-0,0295	-0,0321	-0,0374	-0,0408	-0,0426
Píky v x vzorcích	36	79	35	2	136	63	125	53	136	1	1	1	3	2	1
m/z (Da)	1181,46	1441,62	1489,66	1589,01	1646,39	1736,45	3742,88	3131,73	1603,67	933,248	948,954	2315,84	2481,3	1583,72	1063,37
Korelace (Plocha vs PSB)	-0,0441	-0,0451	-0,0451	-0,0451	-0,0451	-0,0451	-0,0451	-0,0461	-0,0467	-0,0477	-0,0477	-0,0477	-0,0477	-0,0494	-0,0495
Píky v x vzorcích	1	1	1	1	1	1	1	16	2	1	1	1	1	1	1
m/z (Da)	878,216	2709,14	525,839	570,415	649,623	684,425	690,155	830,54	1260,77	829,276	2839,18	828,83	1933,06	1739,52	3364,19
Korelace (Plocha vs PSB)	-0,0500	-0,0503	-0,0549	-0,0549	-0,0549	-0,0549	-0,0549	-0,0552	-0,0562	-0,0599	-0,0648	-0,0673	-0,0677	-0,0749	-0,0750
Píky v x vzorcích	2	3	1	1	1	1	1	2	1	84	51	87	9	5	5
m/z (Da)	3413,5	2348,06	1740,83	765,979	1418,01	775,051	2285,59	3132,49	708,605	2774,6	1742,4	1593,74	3412,77	2506,93	2575,31
Korelace (Plocha vs PSB)	-0,0760	-0,0779	-0,0780	-0,0842	-0,0865	-0,0896	-0,0930	-0,0953	-0,0983	-0,0993	-0,1064	-0,1130	-0,1148	-0,1195	-0,1202
Píky v x vzorcích	19	5	4	7	17	11	3	16	11	135	6	136	21	121	8
m/z (Da)	2507,41	2241,64	2241,06	1594,48	1312,01	3145,21	2136,13	2135,42	1131,25	1015,3	3144,7	1254,67	1340,5	1997,17	1984
Korelace (Plocha vs PSB)	-0,1219	-0,1299	-0,1306	-0,1316	-0,1387	-0,1461	-0,1466	-0,1531	-0,1559	-0,1612	-0,1632	-0,1667	-0,1723	-0,1854	-0,1885
Píky v x vzorcích	121	61	62	134	13	15	16	18	10	23	18	136	15	121	18

Nejvyšší kladné korelace byly zaznamenány u peptidů s hodnotou m/z 2 922 ($n = 117$; $r = 0,69$), které vykazovaly vysokou četnost výskytu napříč souborem vzorků. Tuto korelaci lze klasifikovat jako silnou, což umožňuje považovat tyto peptidy za potenciálně spolehlivé markery sledovaného parametru. Dalším významným zjištěním je identifikace početné skupiny píků vykazujících střední míru závislosti, jako například m/z 1 768 ($n = 133$; $r = 0,51$) nebo m/z 901 ($n = 118$; $r = 0,49$). Relevantním aspektem je rovněž přítomnost negativních korelací u vybraných píků (např. m/z 2 507; $r = -0,12$), což může indikovat pokles koncentrace těchto peptidů v přímé souvislosti s rostoucími hodnotami PSB.

Získané výsledky potvrzují, že diferenciace mezi vzorky by se neměla opírat o pouhou přítomnost specifických píků, nýbrž o kvantitativní změny v jejich intenzitě. Tento metodický přístup je v souladu s postupy využívanými v peptidomice, kde relativní změny v abundanci peptidů slouží jako klíčový nástroj pro identifikaci změn v biologickém systému během technologických zásahů, jako je například cílená redukce PSB centrifugací.

3.6 Závěrečné shrnutí

Na základě provedeného výzkumu a vývoje byla formulována metodika umožňující detekci manipulace se syrovým kravským mlékem, spočívající v cílené redukci počtu somatických buněk. Bylo experimentálně potvrzeno, že tento zásah vyvolává prokazatelné změny v peptido-proteinovém profilu mléčné suroviny. Tyto změny jsou efektivně detekovatelné metodou MALDI-TOF MS v hmotnostním rozsahu m/z 500–4 000 a následně vyhodnotitelné pomocí pokročilých statistických postupů.

Při verifikaci navrženého postupu bylo doloženo, že proces centrifugace vedl k průměrnému poklesu PSB o $45,9 \pm 11,6$ %, což reprezentuje účinný zásah schopný signifikantně zkusit deklarovanou hodnotu PSB. Výsledky analýz prokázaly, že pro identifikaci této formy falšování není rozhodující přítomnost unikátních píků specifických pro modifikované vzorky, nýbrž kvantitativní změny v intenzitě a ploše vybraných signálů v hmotnostních spektrech.

Jako klíčové indikátory byly identifikovány píky v oblasti m/z 2 922, 1 768 a 901, jejichž intenzita vykazovala statisticky významnou korelaci s hodnotami PSB. Zejména u píků m/z 2 922 byla potvrzena silná kladná závislost, což tyto peptidy definuje jako spolehlivé markery sledovaného parametru. Dosažené výstupy tak stvrzují, že pro odhalování cílené redukce PSB je nezbytné aplikovat přístup založený na striktně standardizované přípravě vzorků a kvantitativním hodnocení intenzity píků.

Navržená metodika představuje laboratorně využitelný a reprodukovatelný postup pro ověřování autenticity syrového kravského mléka. Umožňuje odhalovat specifické formy manipulace, které by jinak negativně ovlivňovaly hodnocení zdravotního a hygienického stavu suroviny. Kombinace standardizovaného pracovního postupu, hmotnostně-spektrometrické analýzy a statistické verifikace dat vytváří robustní předpoklad pro uplatnění této metody v kontrolní i výzkumné praxi.

4. Srovnání „novosti postupů“

Inovativnost předkládané metodiky spočívá především v zaměření na detekci specifické formy manipulace se syrovým kravským mlékem, konkrétně na cílené snížení PSB technologickým zásahem. Na rozdíl od běžně používaných přístupů, které jsou orientovány na samotné stanovení hodnoty PSB, případně na odhalování tradičních forem falšování mléka, je v tomto případě pozornost věnována zachycení změn v peptido-proteinovém profilu mléka vznikajících v důsledku umělé redukce PSB. Novost přístupu tedy spočívá v celkovém přístupu k řešení problematiky.

V dostupné odborné literatuře jsou metody MALDI-TOF MS využívány zejména pro detekci falšování mléka spojeného se změnami hlavních proteinových frakcí, například při přidavku mléka jiného živočišného druhu nebo obecně pro charakteristiku proteinového a peptidového profilu mléka. Předkládaná metodika tento princip rozvíjí pro odlišný typ manipulace, při němž nedochází k přidavku cizorodé složky, nýbrž ke změně biologicky významného kvalitativního ukazatele suroviny. Novost metodiky tak spočívá v aplikaci MALDI-TOF MS na oblast, která je analyticky náročnější než rutinní stanovení PSB a která vyžaduje integraci spektrální analýzy a statistického vyhodnocení dat (Rysova et al., 2022).

Dalším inovativním prvkem je skutečnost, že metodika není založena na identifikaci jednoznačně unikátních píků, ale na hodnocení kvantitativních změn intenzity vybraných spektrálních znaků. Tento přístup koresponduje se současnými trendy v peptidomických analýzách, v nichž jsou relativní změny abundance peptidů považovány za klíčový zdroj informací o procesech v analyzovaném systému. V rámci předkládané metodiky je tento princip využit pro odhalování zásahů do autenticity syrového kravského mléka souvisejících s umělou redukcí PSB.

Novost metodiky dále spočívá v propojení několika navazujících kroků do jednoho funkčního celku, zahrnujícího standardizovanou přípravu vzorku, měření MALDI-TOF MS v definovaném hmotnostním rozsahu a následné statistické hodnocení intenzity vybraných píků. Přínosem metodiky není pouze využití samotné instrumentální techniky, ale především vytvoření uceleného a reprodukovatelného postupu, který umožňuje tuto formu manipulace v laboratorní praxi exaktně posoudit a následně využívat.

5. Popis uplatnění metodiky

Předkládaná metodika je určena pro implementaci v laboratořích specializovaných na kontrolu jakosti, bezpečnosti a autenticity syrového kravského mléka. Primární uplatnění nachází v oblasti detekce sofistikovaných forem falšování, konkrétně při odhalování technologických zásahů směřujících k artificiální redukci PSB. Své využití může nalézt nejen v akreditovaných kontrolních a výzkumných laboratořích, ale také na specializovaných pracovištích zabývajících se komplexním hodnocením hygienické kvality mléčné suroviny a v institucích vykonávajících dozor nad zdravotní nezávadností a autenticitou potravinářských produktů.

Metodika významně rozšiřuje stávající analytické portfolio o postup, který se neomezuje pouze na rutinní stanovení aktuální hodnoty PSB, ale zaměřuje se na verifikaci integrity vzorku. Umožňuje posoudit, zda sledovaná surovina nebyla podrobena nelegitimní technologické úpravě, která by zkreslovala skutečný zdravotní stav mléčné žlázy dojnic a tím i hygienickou úroveň mléka. V tomto kontextu slouží jako efektivní nástroj při řešení sporných případů v rámci dodavatelsko-odběratelských vztahů, při hloubkovém ověřování autenticity suroviny nebo jako referenční rámec pro výzkum nových přístupů k detekci falšování mléka na bázi nízkomolekulárních proteinových frakcí.

Současně je metodika využitelná jako teoretický i praktický podklad pro další rozvoj rutinních analytických platforem založených na hmotnostní spektrometrii a pokročilém statistickém zpracování dat. Klíčovým benefitem je využití přístroje MALDI-TOF MS, který je v současné době standardní součástí vybavení moderních analytických laboratoří, zejména v oblasti klinické mikrobiologie a proteomiky. Díky identifikaci specifických markerů a definování jejich korelačních vztahů k PSB tak tato metodika nabízí snadno přenositelný a robustní postup využitelný v peptidomické praxi při hodnocení kvality živočišných produktů bez nutnosti investic do specifické, úzce profilované instrumentace.

6. Ekonomické aspekty

Ekonomický přínos předkládané metodiky spočívá především v možnosti identifikovat specifickou formu manipulace se syrovým kravským mlékem, která vede k neoprávněnému zkreslení jeho hygienické a zdravotní klasifikace. Včasná detekce technologického zásahu zaměřeného na umělé snížení PSB umožňuje eliminovat ekonomické ztráty spojené s nesprávným zařazením suroviny do kvalitativních tříd. Pokud budeme uvažovat roční produkci mléka v ČR 3,4 miliard litrů, a že takto je falšováno např. 5 % produkce, tak dojdeme k celkovému množství takto narušeného mléka 170 milionů litrů. Při rozdílu ve zpeněžení odhadem 0,05 Kč na litr v rámci tříd kvality pak ztráty činí 8 500 000 Kč. Odhad snížení ztrát při využívání této metodiky může tedy být v řádu několika milionů Kč. Navíc s využitím této metodiky je zamezeno situacím, kdy je mléko s nevyhovujícím zdravotním statutem uvolněno do dalšího zpracovatelského řetězce, což by mohlo negativně ovlivnit technologické vlastnosti výsledných produktů a jejich tržní hodnotu.

Vzhledem k tomu, že je metodika založena na technologii MALDI-TOF MS a následném statistickém vyhodnocení spekter, její ekonomická náročnost je přímo odvislá od dostupnosti odpovídajícího přístrojového a softwarového zázemí v dané laboratoři. Pro pracoviště, která již disponují tímto vybavením (například pro mikrobiologickou diagnostiku), nepředstavuje implementace metody nákladnou investici do nového instrumentária. Ekonomická efektivita je v tomto případě podpořena maximálním využitím stávající analytické infrastruktury a rozšířením jejího aplikačního potenciálu o oblast kontroly autenticity potravin. Přímé provozní náklady na provedení analýzy jsou tvořeny běžným laboratorním spotřebním materiálem, chemikáliemi pro přípravu vzorků, kalibračními standardy a energetickými nároky provozu přístroje. Významnou složku tvoří rovněž odborná práce personálu zahrnující standardizovanou preparaci vzorků, vlastní měření a expertní statistické vyhodnocení získaných dat. Zde můžeme zhruba náklady na analýzu jednoho vzorku odhadnout na 800 Kč, a to včetně pracovních nákladů a nákladů spojených s odběrem vzorků mléka. Tyto náklady by ovšem mohly být například částečně sníženy využitím metodiky při stávajících postupech běžné kontroly mléčné užitkovosti. Nicméně ve srovnání s potenciálními riziky spojenými s výkupem falšované suroviny jsou však tyto provozní náklady vysoce rentabilní.

Z dlouhodobého strategického hlediska lze ekonomický přínos spatřovat v posílení kontrolních mechanismů používaných při ověřování autenticity mléka. Metodika přispívá k ochraně transparentního obchodního prostředí a posiluje důvěru v systém objektivního hodnocení kvality syrového kravského mléka v rámci celého mlékárenského sektoru.

Preventivní charakter této kontroly zároveň působí jako ekonomický nástroj proti šíření nekalých praktik při produkci a primárním zpracování mléčné suroviny.

7. Seznam použité související literatury

- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Samperi, R., Laganà, A. Recent trends in the analysis of bioactive peptides in milk and dairy products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016 Apr;408(11):2677-85.
- Carmo, R. M. do, Nascimento, L. E. C. do, Leão, P. V. T., de Paula, G. H., Dias, M. B. de C., Fernandes, P. B., Mesquita, A. A., Nicolau, E. S., Rezende, M. M. R., Sousa, W. A. de, Silva, E. C. N. M. da, Silva, M. A. P. Influence of Somatic Cell Removal on Milk Quality and Yield. *Beverages*. 2023 Dec 27;10(1):5.
- Gwardys, G., Grodkowski, G., Kostusiak, P., Mendelowski, W., Słószarz, J., Satława, M., Śmietanka, B., Gwardys, K., Gołębiewski, M., Puppel, K. Molecular Remodeling of Milk Fat Globules Induced by Centrifugation: Insights from Deep Learning-Based Detection of Milk Adulteration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025 Dec 10;26(24):11919.
- Hanuš, O., Nejeschlebová, H., Legarová, V., Kejdová-Rysová, L., Říha, J., Samková, E., Thompson, G., Němečková, I., Klimešová, M., Kopecký, J., Jedelská, R. The effect of artificial reduction of the somatic cell count, as a violation of authenticity, on milk quality indicators. *Czech Journal of Animal Science*. 2025 Aug;70(8):319-334.
- Ionescu, A. D., Cîrîc, A. I., Begea, M. A Review of Milk Frauds and Adulterations from a Technological Perspective. *Applied Sciences*. 2023 Aug 30;13(17):9821.
- Poonia, A., Jha, A., Sharma, R., Singh, H. B., Rai, A. K., Sharma, N. Detection of adulteration in milk: A review. *International Journal of Dairy Technology*. 2017 Feb;70(1):23-42.
- Punia, H., Tokas, J., Malik, A., Sangwan, S., Baloda, S., Singh, N., Singh, S., Bhuker, A., Singh, P., Yashveer, S., Agarwal, S., Mor, V. S. Identification and detection of bioactive peptides in milk and dairy products: Remarks about agro-foods. *Molecules*. 2020 Jul 22;25(15):3328.
- Rysova, L., Cejnar, P., Hanus, O., Legarova, V., Havlik, J., Nejeschlebova, H., Nemeckova, I., Jedelska, R., Bozik, M. Use of MALDI-TOF MS technology to evaluate adulteration of small ruminant milk with raw bovine milk. *Journal of Dairy Science* 2022 Jun;105(6):4882-4894.
- Song, D., Dong, K., Liu, S., Fu, S., Zhao, F., Man, C., Jiang, Y., Zhao, K., Qu, B., Yang, X. Research advances in detection of food adulteration and application of MALDI-TOF MS: A review. *Food Chemistry*. 2024 Oct 30;456:140070.

- Talkhan, O. Milk adulteration: Some Chemical Adulterants of Milk. *Egyptian Journal of Chemistry and Environmental Health*. 2025 Nov;1(1):694-703.
- Valletta, M., Ragucci, S., Landi, N., Di Maro, A., Pedone, P. V., Russo, R., Chambery, A. Mass spectrometry-based protein and peptide profiling for food frauds, traceability and authenticity assessment. *Food Chemistry*. 2021 Dec 15;365:130456.
- Wölk, M., Milkovska-Stamenova, S., Hoffmann, R. Comprehensive profiling of the native and modified peptidomes of raw bovine milk and processed milk products. *Foods*. 2020 Dec 10;9(12):1841.

8. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány

Problematice autenticity mléka a možnostem jejího analytického ověřování se autorský kolektiv věnoval již v předchozích publikovaných výstupech. Za nejvýznamnější práce, které tematicky a metodicky předcházely předkládané metodice, lze považovat následující publikace:

Hanuš, O., Nejeschlebová, H., Legarová, V., Kejdová-Rysová, L., Říha, J., Samková, E., Thompson, G., Němečková, I., Klimešová, M., Kopecký, J., Jedelská, R. **The effect of artificial reduction of the somatic cell count, as a violation of authenticity, on milk quality indicators.** Czech Journal of Animal Science. 2025 Aug;70(8):319-334. Tato publikace je základem zkoumané problematiky z teoretického i praktického hlediska.

Kejdová Rysová, L., Cejnar, P., Legarová, V., Hanuš, O., Mascellani Bergo, A., Havlík, J., Nejeschlebová, H. **Centrifugation-Induced Somatic Cell Count Reduction in Milk as a Form of Adulteration Detected by ¹H NMR spectroscopy and Multivariate Modeling.** Journal of Dairy Science. 2026. V recenzním řízení. Tato publikace popisuje obdobný výzkum, kde je užívána metoda NMR spektroskopie. Tato studie byla prováděna souběžně s vývojem metody k ověření falšování počtu somatických buněk metodou MALDI-TOF MS.

Legarová, V., Formánková Herman, S., Kejdová Rysová, L., Formánek, Z., Hanuš, O., Božiková, K., Nejeschlebová, H., Ducháček, J., Božik M. **Detection of milk manipulation for the purpose of targeted reduction of somatic cell count using the MALDI-TOF MS method.** Czech Journal of Animal Science. 2026. V recenzním řízení. Tato publikace shrnuje výsledky získané metodou MALDI-TOF MS využitou k sepsání této metodiky.

Rysová, L., Cejnar, P., Hanuš, O., Legarová, V., Havlík, J., Nejeschlebová, H., Němečková, I., Jedelská, R., Božik, M. **Use of MALDI-TOF MS technology to evaluate adulteration of small ruminant milk with raw bovine milk.** Journal of Dairy Science. 2022 Jun, 105(6), 4882–4894. Tato publikace je pro předkládanou metodiku zvláště významná, protože dokumentuje předchozí využití MALDI-TOF MS týmem autorů při detekci falšování mléka a představuje přímý metodický předstupeň současného přístupu.

Rysová, L., Cejnar, P., Hanuš, O., Božik, M., Legarová, V., Nejeschlebová, H., Němečková, I. **Detekce falšování kozího a ovčího mléka kravským mlékem metodou MALDI-TOF MS.** Certifikovaná metodika. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2021. ISBN 978-80-213-3154-9. Tato certifikovaná metodika představuje publikovaný aplikační

výstup téhož výzkumného směru a je relevantní zejména z hlediska převodu analytických poznatků do metodického dokumentu určeného pro praktické využití.