



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra zemědělské, dopravní a manipulační techniky

Bakalářská práce

Stanovení kvalitativních parametrů dojeného mléka indikující
zdravotní stav dojnic

Autor práce: Daniel Prokop

Vedoucí práce: Ing. Kuneš Radim

České Budějovice 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

V době, kdy se k dojení mléka využívají výhradně automatické systémy je důležité vyhodnocovat kvalitu mléka nejlépe v reálném čase, aby bylo možné zachovat vysokou kvalitu produktů a zároveň včasné detekovat zdravotní problém u dojnice. Při včasné detekci zdravotního problému u dojnice, který lze detekovat změnou v kvalitě mléka, je možné také snížit náklady na její léčbu a eliminovat finanční ztráty během období, kdy mléko nemůžeme zpeněžit. Pro efektivní zhodnocení kvality nadojeného mléka je vhodné monitorovat následující parametry: počet somatických buněk, vodivost, obsah tuku, bílkovin, laktózy a močoviny. V bakalářské práci jsou uvedeny hladiny výše zmíněných veličin, které indikují změny v kvalitě dojeného mléka, vnitřní a vnější vlivy, které je ovlivňují a také metody pro jejich detekci a vyhodnocení.

Klíčová slova: kvalita mléka, počet somatických buněk, bílkovina, tuk, laktóza

Abstract

When only automatic systems are used for milking milk, it is essential to evaluate the quality of the milk, preferably in real-time, to maintain the high quality of the products and at the same time to detect health problems in the dairy cow in good time. By early detection of a dairy cow's health problem, which a change in milk quality can detect, it is also possible to reduce the cost of its treatment and eliminate financial losses during a period when we cannot monetize milk. To effectively evaluate the quality of milked milk, it is appropriate to monitor the following parameters: somatic cell count, conductivity, fat, protein, lactose, and urea content. The bachelor's thesis presents the levels of the quantities mentioned above, which indicate changes in the quality of milked milk, internal and external influences that affect them, as well as methods for their detection and evaluation

Keywords: milk quality, somatic cell count, protein, fat, lactose

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu bakalářské práce Ing. Radimu Kunešovi za čas, který mi věnoval při psaní bakalářské práce a také za jeho cenné rady, bez kterých bych tuto práci nebyl schopen napsat.

Obsah

Úvod.....	8
1 Mléko	9
1.1 Chemické složení mléka.....	9
1.2 Složky mléka	9
1.2.1 Mléčný tuk	9
1.2.2 Mléčná bílkovina.....	10
1.2.3 Mléčný cukr	11
1.2.4 Minerální látky	11
1.2.5 Nebílkovinné dusíkaté látky.....	12
1.3 Somatické buňky	12
1.3.1 Buňky pocházející z epitelu mléčné žlázy	12
1.3.2 Buňky pocházející z krve	13
1.3.3 Nebuněčné útvary.....	14
1.3.4 Počet somatických buněk.....	14
1.3.5 Faktory ovlivňující počet somatických buněk	15
2 Nemoci ovlivňující jednotlivé složky v mléce.....	18
2.1 Bachorová acidóza	18
2.2 Alkalóza.....	18
2.3 Ketóza.....	19
2.4 Mastitidy.....	19
2.4.1 Subklinické mastitidy.....	21
2.4.2 Klinická mastitida	21
2.4.3 Diagnostika mastitidy	21
3 Mikrobiologické vyšetření mléka	23
3.1 Odběr a příprava vzorku před odběrem.....	23

3.2	Agarové půdy	23
3.3	Mikrobiologické vyšetření	24
4	Technologie detekující změnu složení mléka	26
4.1	NK test.....	26
4.2	Elektrická vodivost mléka	27
4.2.1	Faktory ovlivňující elektrickou vodivost mléka	28
4.2.2	Způsob měření a následné vyhodnocení elektrické vodivosti.....	28
4.2.3	Vyhodnocení elektrické konduktivity	29
4.3	NIR – blízká infračervená oblast.....	30
4.3.1	Princip fungování NIR spektroskopie.....	30
4.3.2	Infračervený spektroskop	31
4.3.3	Techniky měření v NIR spektroskopii	31
4.4	Využití NIR technologie pro online detekci.....	33
4.5	MIR – infračervené spektrum.....	35
4.6	Širokopásmová laserová střední infračervená spektroskopie využívající kvantový kaskádový detektor pro analýzu mléčné bílkoviny	35
5	Přístroje pro online detekci kvality mléka	37
5.1	TDM Afilab – Analýza mléka v reálném čase	37
5.2	Dojící robot Merlin.....	37
6	Novinky v detekci složek mléka	38
6.1	Testování mléka pomocí mikroRNA	38
6.2	Přenosný detektor pro detekci složení mléka syrového a homogenního.....	38
7	Cíle práce	41
	Diskuse.....	42
	Závěr	44
	Seznam použité literatury.....	45
	Seznam obrázků	50

Seznam vzorců	51
Seznam tabulek	52

Úvod

Základem každého hospodářství, ve kterém se produkuje kravské mléko, jsou dojnice. Při větším množství dojnic je náročnější se o ně starat, dojit, krmit a kontrolovat jejich zdravotní stav. Farmáři, kteří mají více dojnic, je rozdělují do více menších skupin. Tento systém chovu dojnic můžeme nalézt pod anglickým názvem „herd management“.

V době postupné automatizace není ani chov dojnic výjimkou. Proto je vhodné využít moderních technologií ke kontrole dojeného mléka. Důležitá je online detekce z důvodu odklonění závadného mléka. Zamezí se tím jeho smíchání s nezávadným mlékem, zvýší se kvalita jeho následných produktů a zamezí se finančním ztrátám z důvodu finančních srážek při jeho zpeněžení.

Kvalita mléka může být ovlivněna mnoha faktory: welfare, mikroklimatickými podmínkami, technologií ustájení, špatnou krmnou dávkou, kvalitou potravy, časem mezi jednotlivým dojením a také věkem dojnic.

Proto vznikla potřeba vyvinout co možná nepřesnější systém kontroly kvality mléka v reálném čase, který by farmáře okamžitě upozornil na to, že není něco v pořádku a je potřeba jednat, aby nedošlo ke kontaminaci nadojené dávky mléka.

Tyto metody se zaměřují na složky, které mléko obsahuje, a především na jejich množství v dané dávce mléka. Těmito složkami jsou: somatické buňky, obsah močoviny, laktózy a bílkoviny.

Míru zastoupení jednotlivých látek v mléce zjišťujeme pomocí určitých druhů testů. První z testů, které se využívají je NK test, také se využívá elektrická vodivost nebo mikrobiologické vyšetření mléka, které zjišťuje přítomnost mikroorganismů v mléce. Podle přítomnosti těchto organismů se zjišťuje, jestli je mléko nezávadné, případně jak dlouho vydrží nezávadné nebo výrobky z něj.

V posledních letech dochází v této oblasti k vývoji nových, spolehlivých, a především levných technologií, tak, aby nemusely být vzorky testovány v laboratořích a farmář nemusel dlouho čekat na výsledky testů, ale aby mohl testy provádět přímo na farmě bez přidání činidel a aby mohl zjištěné problémy řešit včas. Mezi důležitá kritéria patří finanční dostupnost, nízké provozní náklady, automatické vyhodnocení a upozornění obsluhy.

1 Mléko

Mléko jako takové je tekutina, která je vylučovaná mléčnou žlázou všech savců. Mléko není určeno pouze pro výživu mláďat, ale také se využívá jako jedna z hlavních potravních složek pro člověka, například pro výrobu sýra a jiných mléčných výrobků nebo ke konzumaci samotné. A to hlavně mléko kravské, ovčí, kozí, buvolí a velbloudí (Mlieko.sk, 2021).

Kvalitu mléka a jiných mléčných výrobků v České republice upravovala vyhláška z roku 2003, která byla od 1.1.2020 nahrazena vyhláškou Evropské unie o kvalitě mléka a mléčných výrobků. Tuto vyhlášku najdeme pod označením č. 274/2019 Sb. (Zakonyprolidi.cz, 2020).

1.1 Chemické složení mléka

Mléko je charakteristická kapalina, která má bílou nebo nažloutlou barvu a má i specifickou vůni a chuť. Je to z fyzikálně-chemického hlediska polydisperzní systém obsahující látky v pravém roztoku. Skládá se ze dvou základních částí, a to z vody, tzv. disperzního prostředí a z disperzní fáze, z malých částic rozptýlených v tomto prostředí (Hrabě, J.et al.. 2006).

Kravské mléko obsahuje několik hlavních složek, o kterých je potřeba vědět alespoň několik základních informací, než budeme pokračovat dále (Mlieko.sk, 2021).

1.2 Složky mléka

Jak jsem již zmínil výše, tak mléko se skládá z několika hlavních složek: voda, bílkoviny, tuk, mléčný cukr a minerální látky (Mlieko.sk, 2021).

1.2.1 Mléčný tuk

Mléčný tuk řadíme mezi živočišné tuky a je směsí triglyceridů, vyšších mastných kyselin, volných mastných kyselin, fosfolipidů a sterolů. V mléce jsou také obsažené nenasycené mastné kyseliny, které si lidské tělo nedokáže vytvořit samo a je nutné je odněkud získat, a to je například kyselina linolová. Tento tuk se mléce nachází rozptýlený v emulgovaném stavu. Jedná se o složku mléka, která je nejsnáze ovlivnitelná, a to jak krmením, tak i zdravotním stavem. Dále ji ovlivňuje zdravotní stav dojníc a roční období. Obsah tuku v mléce se pohybuje mezi 3,0 – 4,6 % (Heraltová, 2010).

Podle Ing. Otrubové ale není dáno, že všechny druhy skotu musejí mít obsah mléčného tuku v tomto rozmezí. Například Jerseyký skot má daleko vyšší obsah mléčného tuku a to okolo 6 % (Otrubová, 2020).

1.2.2 Mléčná bílkovina

Kravské mléko je řazeno mezi kaseinová mléka. Největší podíl bílkovin tvoří v kravském mléce kasein a dále také bílkoviny syrovátkového typu, které není možné z mléka oddělit normálními fyzikálními postupy. Těmito bílkovinami jsou globuliny a albuminy (Heraltová, 2010).

Po chemické stránce jsou bílkoviny řetězce spojené peptidickými vazbami, kdy každý protein má ve svém řetězci charakteristickou sekvenci aminokyselin. Dělí se podle rozpustnosti při pH 4,6 a při teplotě 20 °C do dvou hlavních skupin. Těmito dvěma skupinami jsou nerozpustné kaseiny a rozpustné syrovátkové bílkoviny. (Šopíková, 2017).

Kasein je hlavní bílkovina obsažená v mléce. V kravském mléce je její obsah okolo 80 % z celkových 3,2 g bílkovin obsažených v mléce, tj. zhruba 2,6 g kaseinu na 100 g mléka. Kasein se vyskytuje v typech (α -, β -, γ -, κ -), a ty mají celou řadu genetických variant, které se od sebe liší chemickou strukturou a vlastnostmi. Kasein v mléce vytváří mikroskopické částice tzv. micely. Hodně mléčných výrobků je založeno na srážení kaseinu. Tento proces probíhá za přístupu kyselin a nazývá se „*kyselé srážení*“. Dále se při výrobě mléčných výrobků využívá sířidla (enzym chymosin z telecích žaludků) a nazývá se „*sladké srážení*“. Kasein se využívá nejen k výrobě mléčných produktů, ale také k výrobě řady jiných produktů jako jsou lepidla, návnady pro ryby, ale také na výrobu jedlých fólií používaných v potravinářství proti vysychání potravin, a to nejčastěji u ovoce (Bezpečnostpotravin.cz, 2021).

Syrovátkové bílkoviny jsou bílkoviny, které zůstanou v syrovátce po oddělení kaseinu při pH 4,6. V kravském mléce stejně jako v mléce od jiných přežvýkavců tvoří syrovátková bílkovina zhruba 17–20 % celkového objemu bílkoviny v mléce. B-laktoglobulin tvoří z těchto částí největší podíl, který je stejně jako α -laktalbumin syntetizován mléčnou žlázou. Další dvě bílkovinné části jsou stejné jako bílkoviny v krvi (sérum albumin a imunoglobulin). Jejich podíl v mléce u zdravých dojnic je poměrně nízký naopak se značně zvyšuje v mléce mastitidním a také v mlezivu (Mendelu.cz, 2021).

U Jerseykého skotu se obsah bílkoviny pohybuje okolo 4 % (Otrubová, 2020).

1.2.3 Mléčný cukr

Mléčný cukr, kterému se jinak říká laktóza je disacharid, který se skládá z glukózy a galaktózy. V mléce se vyskytuje ve formě pravého roztoku. Mléčný cukr má nižší sladivost než cukr třtinový, ale má stejnou energetickou hodnotu. Laktózu můžeme rozkládat pomocí enzymů, kdy se hydrolyzou rozloží na monosacharidy nebo na základní složky (organické kyseliny, alkoholy atd.). Obsah cukru v nadojeném mléce je poměrně stabilní a pohybuje se mezi 4,6 – 4,9 % (Heraltová, 2010).

1.2.4 Minerální látky

Minerální látky v mléce jsou definovány jako popeloviny. Většina minerálních látek v mléce obsažených, je navázána na vodu, kterou mléko obsahuje a malá část minerálních látek může být vázána i na bílkovinu v mléce obsaženou. Obsah minerálních látek v mléce se výrazně nemění, jedinou výjimkou je mléko, které je získané od krav mastitidních. Celkový obsah minerálních látek obsažených v mléce je v rozmezí 0,7 – 0,8 %. Zastoupení některých látek obsažených v mléce je zobrazeno na obrázku 1.1. (Pavelka, 1996).

Voda	860 - 880 g
Mléčný tuk jako směs triglicerinů	30 - 45 g
Fosfatidy	0,3 g
Steriny	0,1 g
Gliceridy	0,2 g
Vitamin A	0,1 - 0,5 mg
Provitamin A - karotén	0,1 - 0,6 mg
Vitamin D	0,4 µg
Vitamin E	1,0 g
α-kasein	28 - 32 g
β-kasein	10,3 g
κ-kasein	9,1 g
Albuminy	3,9 g
Globuliny	5,2 g
Enzymy	0,8 g
Laktóza a další cukry	47 - 48 g
Vápník	1,3 g
Hořčík, sodík, draslík	2,1 g
Anióny - Fosforečnany, fosfáty, citrany, chloridy	5,3 g
Vitamin B1	Stopové množství
Vitamin B2	0,4 mg
Vitamin B12	1,3 mg
Vitamin B6	7 µg
Vitamin C	0,7 mg
Nebílkovinné látky	Stopové množství
Plyny	Stopové množství
Kovové prvky	Stopové množství

Obrázek 1.1: Obsah látek v jednom litru kravského mléka (Mlieko.sk, 2021)

1.2.5 Nebílkovinné dusíkaté látky

Tyto látky zůstávají v roztoku po vysrážení veškerých bílkovin mléka. Většina z těchto produktů je součástí metabolismu a nejhojněji je v těchto látkách zastoupena močovina. V průměru se její obsah pohybuje kolem 50 % z bílkovinných dusíkatých látek. Obsah dusíkatých látek v mléce je ovlivněn několika faktory a to jsou: výživa, plemeno, dojivost, sezóna, stádium laktace a pořadí laktace. Vlivy výživy se projevují jak na celkové produkci, tak i na obsahu jednotlivých látek, respektive jejich množství (Heraltová, 2010).

1.3 Somatické buňky

Somatické buňky jsou buňky vlastního těla. Tyto buňky přirozeně patří do mléka. V mléce se nachází několik typů somatických buněk. Somatické buňky dělíme na dva základní typy, tzv. epiteliální buňky, což jsou buňky odloučené z mléčné žlázy a druhým druhem jsou bílé krvinky (typ SB), které se do mléka dostávají z krve. Každý druh dojnic má v mléce obsažený jiný počet somatických buněk typu SB, ale především se obsah somatických buněk v mléce liší podle zdravotního stavu dojnice. Tento typ somatických buněk má za úkol ničit bakterie, které proniknou do mléčné žlázy. Pokud je tedy mléčná žláza infikována, dojde v mléce ke zvýšení počtu somatických buněk typu SB, a proto chápeme obsah somatických buněk typu SB v mléce jako indikátor zdravotního stavu dojnice (Lovasová, 2017).

1.3.1 Buňky pocházející z epitelu mléčné žlázy

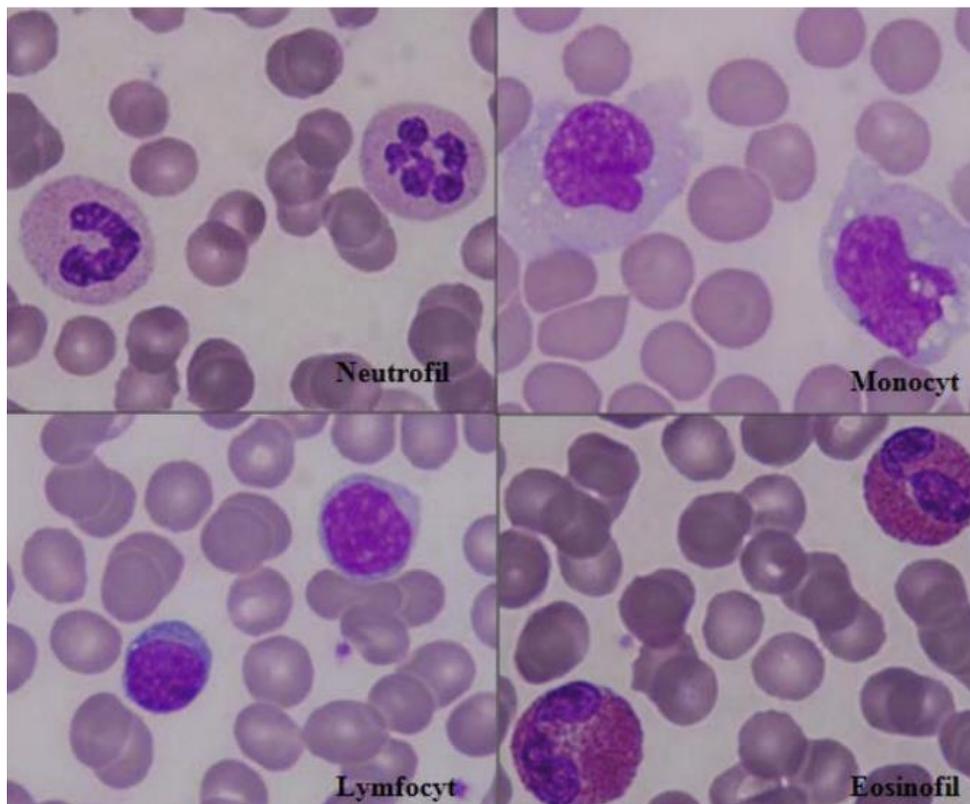
Buňky z epitelu se do mléka dostávají během laktace a také během dojení díky odplouvání buněk. Tyto buňky se odloučují z různých částí mléčné žlázy a vznikají při regenerativních procesech. Avšak zvýšený obsah těchto buněk v mléce může být také zapříčiněn špatným očištěním vemene před dojením. Dalším z faktorů, které mohou ovlivnit počet těchto buněk je špatná technika dojení (Agropress.cz, 2018).

Do mléka se touto cestou dostávají různé typy buněk. Jsou to buď buňky jednovrstvého kubického epitelu nebo buňky dvouvrstvého cyklického epitelu nebo šupiny zrohovatělého dlaždicového epitelu. Z větších mléčných kanálků vznikají buňky dvouvrstvého cylindrického epitelu. Ve strukových vývodech, povrchu struků a mléčné žlázy mají původ šupiny zrohovatělého plochého dlaždicového epitelu (Lovasová, 2017).

V mléce je obsaženo 2–16 % z celkového počtu epiteliálních buněk mléčné žlázy (Agropress.cz, 2018).

1.3.2 Buňky pocházející z krve

Druhou skupinu somatických buněk tvoří somatické buňky pocházející z krve dojnice a mezi tyto buňky řadíme bílé krvinky (leukocyty), a to zejména makrofágy, polymorfonukleární leukocyty a lymfocyty (viz obrázek 1.2) (Agropress.cz, 2018).



Obrázek 1.2 – Druhy somatických buněk pocházejících z krve (Nováková, 2017)

U skotu jsou nejvíce zastoupeny makrofágy, jejichž množství se pohybuje mezi 35–79 %. Polymorfonukleární leukocyty jsou zastoupeny z 5-25 % a lymfocyty z 20-30 %. Lymfocyty jsou zastoupeny dvěma typy, a to typem T a B. T lymfocyty hrají významnou roli v imunitě a B lymfocyty tvoří imunoglobulin. Právě tím, že se lymfocyty typu B přemění na plazmatickou buňku produkují protilátky. (Boutinad a James, 2002).

Makrofágy vznikají z monocytů. Makrofágy jsou fagotující buňky, které pohlcují organismu škodlivé látky, od bakterií, přes viry a také tukové kuličky. Polymorfonukleární lymfocyty jsou jedním z hlavních ochranných prostředků proti mikroorganismům a následným vznikem zánětu. Vyskytují se v mléce před zaprahnutím, v mlezivu a při zánětu (Gajdůšek, 2003).

Tyto typy bílých krvinek hrají důležitou roli v imunitním systému, kde se starají o obnovu tkání něčím poškozených, a také ničí cizorodé látky v organismu. V případě, že je zjištěný zvýšený počet těchto buněk v mléce, tak to jasně značí, že je mléčná

žláza zasažena nějakým zánětem a je potřeba tento problém zavčas řešit. V některých případech je možné v mléce nalézt i další typy bílých krvinek (eozinofily, bazofily) a také červené krvinky (erytrocyty). Erytrocyty se mohou vyskytovat v kolostru, v mléce se vyskytují pouze zřídka, a to hlavně v případech kdy se jedná o těžší zánět nebo nejčastěji při poranění strukových vývodů (Agropress.cz, 2018).

1.3.3 Nebuněčné útvary

Mezi nebuněčné útvary v mléce patří mléčná plazma, která tvoří povlak na samotném mléce, který je síťovitý nebo homogenní. Povlak z mléčné plazmy tvoří okolo buněk albuminy a globuliny. Mléčnou plazmu najdeme v mléce před zasušením, v mlezivu a někdy i při zánětu. Další nebuněčné útvary v mléce obsažené se nazývají mléčné konkrementy. Konkrementy se do mléka dostanou od dojnice s infekcí a také se vyskytují v mlezivu (Lovasová, 2017).

1.3.4 Počet somatických buněk

Podle počtu somatických buněk v nadojeném mléce poznáme jeho kvalitu, ale také zdravotní stav dojnice. Počet somatických buněk v mléce je řízen vyhláškou o jejich maximálním počtu, který může mléko obsahovat. Tento limit se uvádí kolem 400 000 somatických buněk na mililitr nadojeného syrového mléka a je upraven směrnicí EU, (směrnice EU č. 92/46 (Op.europa.eu, 1992).

Na obrázku 1.3 je vidět, že limitu 400 000 somatických buněk se drží většina států, ale některé z nich mohou značně vybočovat, např. USA. Avšak tento počet somatických buněk neznamena, že je dojnice zdravá. Mléko od dojnice, aby se dala považovat za zdravou, by mělo obsahovat do 200 000 somatických buněk na mililitr. U tzv. prvotelk je tento limit ještě o polovinu nižší a to zhruba 100 000 na mililitr. Reálným hodnocením počtu somatických buněk je kontrola užitkovosti. V této kontrole je zahrnuto mléko od všem krav ze stáda (Lovasová, 2017).

Země	Limit PSB [bunĳky.ml ⁻¹]
Austrálie	400 000
Evropská Unie	400 000
Kanada	500 000
Nový Zéland	400 000
Švýcarsko	350 000
USA	750 000

Obrázek 1.3 – Maximální počet somatických buněk (PSB) obsažených v mléce, přípustných ve vybraných zemích. (Nováková, 2017)

1.3.5 Faktory ovlivňující počet somatických buněk

Počet somatických buněk se v průběhu dojení mění (Vovcr.cz, 2020).

Hlavním faktorem ovlivňující počet somatických buněk jsou mastitidy, při kterých se počet somatických buněk zvyšuje. Dalšími faktory ovlivňující počet těchto buněk jsou metabolická onemocnění, kterými mohou zvířata trpět. Vysoký obsah somatických buněk je v mléce také v době laktace, kdy je v mléku obsaženo vysoké množství epiteliálních buněk, kolostrálních tělísek a leukocytů. K mírnému zvýšení somatických buněk dochází také ke konci laktace. Je to díky tomu, že se dojnice připravuje na další laktaci a tím dochází k regeneraci epitelu. Obsah somatických buněk se zvyšuje také časem, s přibývajícím věkem dojnice a při každé další laktaci se také zvýší jejich obsah v mléce (Agropress.cz, 2018).

V prvních střících při dojení je vyšší obsah somatických buněk, při pokračování dojení obsah poklesne a nejvyšší je při posledních střících. Pro vyhodnocení vzorků rozlišujeme:

1. Čtvrťový vzorek (QMS = Quarter milk sample).
2. Vzorek z prvních stříků mléka (FQMS = Foremilk quarter milk sample).
3. Směsný čtvrtý vzorek (QCMS = Quarter composite milk sample).
4. Individuální vzorek (konvový vzorek; ICMS = Individual cows milk sample).
5. Bazénový vzorek mléka (BTMS = Bulk tank milk sample) (Vovcr.cz, 2020).

Anamnéza mléčné žlázy – vyšší počet somatických buněk je u dojnic, které již v minulosti mastitidu prodělaly. Tento počet zůstává při jedné laktaci nad normálem a nezáleží ve většině případů na tom, zda proběhla léčba antibiotiky nebo ne. Po začátku další laktace se většinou obsah buněk normalizuje, avšak v případě, že dojnice prodělala více zánětů, tak standardní obsah somatických buněk zůstává vyšší po zbytek jejího života (Vovcr.cz, 2020), (Gajdůšek, 2003).

Věk dojnice také zastává významnou roli v počtu somatických buněk. Obsah těchto buněk se postupně zvyšuje až do padesáté laktaci, poté zpravidla postupně začíná klesat. Dojnice, které jsou odolné vůči zánětům se zpravidla dožívají vyššího věku než dojnice ostatní (Gajdůšek, 2003), (Samková et al., 2012).

Plemeno sehrává také jednu z důležitých rolí. Obsah somatických buněk se liší podle plemen, která jsou uzpůsobena k životu ve vyšších nadmořských výškách a to okolo

5.10⁴ somatických buněk na jeden mililitr mléka ve prospěch krav žijících ve vyšších nadmořských výškách (Vovcr.cz, 2020), (Navrátilová et al., 2012).

Dojitelnost – u krav, které se lehce dojí, je počet somatických buněk vyšší, i když jsou dojnice zdravé (Navrátilová et al., 2012), (Gajdůšek, 2003).

Stadium laktace je další z faktorů, který ovlivňuje počet somatických buněk. V průběhu laktace se počet somatických buněk mění, na začátku je jejich obsah vyšší, v průběhu klesá a na konci se zase zvýší. Výrazné zvýšení jejich obsahu v mléce je u krav, které dojí pod 4 kg mléka denně tj. krav starodojných (Vovcr.cz, 2020), (Navrátilová et al., 2012).

Části výdojku – v prvních a posledních střících mléka je obsah somatických buněk vyšší, a proto by se měl k určení jejich počtu používat vzorek z průběhu dojení, tj. po odstranění prvních 10–20 ml prvotně nadojeného mléka (Vovcr.cz, 2020).

Frekvence dojení, při vyšší frekvenci dojení se obsah somatických buněk snižuje, a naopak při nižší frekvenci se zase zvyšuje (Vovcr.cz, 2020).

Roční období – v průběhu roku se počty také liší, přes zimu je počet buněk nejnižší (od prosince do března) a přes léto nejvyšší (od května do října), (Samková et al., 2012).

Krmení je dalším činitelem, který ovlivňuje počty somatických buněk. Zvýšení počtu buněk je při přechodu ze zimního krmení na letní a také při začátku pastvy (Vovcr.cz, 2020), (Gajdůšek, 2003).

Metabolická onemocnění zvyšují počty somatických buněk, a to především acidóza a bachorová alkalóza (Vovcr.cz, 2020).

Stres – při manipulaci se zvířaty, změna hierarchie ve stádě a další jiné výkyvy v každodenním stereotypu krav negativně ovlivňují počet somatických buněk v mléce. Naopak krátkodobé změny teplot, a to jak teplé počasí či chladné, je nijak negativně neovlivňují. Při dlouhodobé změně teplot je naopak pozorovatelný pokles buněk v mléce (Samková et al., 2012), (Navrátilová et al., 2012).

Dojení – při jeho praktikování ve stáji se zařízením s nízkým dojícím výkonem, sprchováním vemene před dojením a předdojování je prokázané zvýšení počtu somatických buněk. Důležitá je proto prevence mastitidy a dodržování hygieny. Dezinfekce struku je nutností. Dezinfekci provádíme před dojením a po dojení. Po dojení používáme jednorázové hygienické utěrky (Ježková, 2014).

Ustájení je prokazatelně faktor, který pozitivně i negativně ovlivňuje počet somatických buněk. Jediný typ ustájení, který má prokazatelně pozitivní vliv na jejich počet,

je volné ustájení se slámovou podestýlkou. Jiné druhy ustájení jejich počty zpravidla zvyšují (Vovcr.cz, 2020).

2 Nemoci ovlivňující jednotlivé složky v mléce

Kvalitu mléka ovlivňuje mnoho faktorů, od stáří dojnice přes krmení a tak dále. Jedním z uvedených a hlavních faktorů, které kvalitu mléka ovlivní je zdravotní stav dojnice potažmo celého stáda. Různé nemoci ovlivňují obsah látek v mléce jiným způsobem, a proto v této kapitole budou uvedeny některé z nemocí, kterými dojnice mohou trpět a jak dané nemoci ovlivní obsah látek v něm obsažených.

2.1 Bachorová acidóza

Tato choroba se vyskytuje u všech kategorií skotu, a to zejména u vysoko produkčních krav, které na tuto chorobu trpí nejvíce. Tato choroba je porucha trávení předžaludku a dělíme jí na akutní a chronickou. Hlavní příčina vzniku této nemoci je špatné krmení, a to především lehce stravitelnými sacharidy, díky kterým dochází ke vzniku těžkých mastných kyselin. V bachoru je pak špatné prostředí a je zde moc bakterií mléčného kvašení a tím pádem se zvýší produkce kyseliny mléčné a toxických aminů. Tato příčina není jedinou, existuje jich více, ale všechny souvisí se špatným krmením. Mezi další příčiny řadíme například náhlou změnu krmné dávky nebo nedostatek hrubé vlákniny. Hlavním pozorovatelným příznakem této nemoci je například hubnutí, ale jsou také další jako je schvácení kopyt, snížení tuku v mléce, sušiny a také bílkoviny. Těžké stavy se mohou projevit kolikami, komatózními stavy následovanými úhynem zvířete. Tuto nemoc lze řešit například vypláchnutím bachoru nebo podáním ATB. Chronické stavy provází úbytek mléka, v některých případech úbytek laktózy, mléčné bílkoviny a také mléčného tuku (Slavíková, 2015).

2.2 Alkalóza

Jedná se o jednu z dalších chorob, kterou řadíme mezi choroby předžaludku. Jejími hlavními příznaky je zvýšené pH v bachorové tekutině a také zvýšený obsah amoniaku v bachoru samotném. Opět jako u nemoci předešlé je hlavní příčinou špatné krmení dojníc, v tomto případě ale dávkami, které jsou příliš bohaté na dusíkaté látky a předávky alkáliemi (krmné vápno, nepoměr mezi Ca a P, minerální látky). Hlavními příznaky je snížená chuť přijímat potravu, ulehávání a porucha motoriky. Kvůli této nemoci se snižuje produkce mléka a také klesá jeho tučnost, a to v některých horších případech až o 2 %, zvyšuje se hladina močoviny, zvyšuje se titrační kyselost a zvyšuje se počet somatických buněk v mléce (Kadlec, et al., 1988).

2.3 Ketóza

Toto onemocnění je chronická porucha metabolismu sacharidů u dojnice. Tato nemoc je jednou z nejhorších u dojnic s vysokou produkcí mléka a převážně se vyskytuje od druhého do čtvrtého týdne, potom, co dojnice porodí tele. Hlavní příčinou, proč tato nemoc vzniká, je nedostatek energie v krmné dávce a další častou příčinou bývá zase nedostatek minerálních látek, vitamínů či stopových látek. Mezi hlavní příznaky nemoci řadíme pokles glukózy v krvi a také špatnou tvorbu glykogenu v játrech. Další příznak je zvýšená tvorba a zvýšené vylučování ketonových látek. Nemoc opět může probíhat ve dvou formách. Jedna forma je akutní a druhá je chronická. Trávicí forma se projevuje na trávicím ústrojí dojnice. Poznáme jí podle toho, že dojnice trpí průjmem, malátností, zácpou, anémií sliznic a také dehydratací. Její pot, dech a moč jsou cítit po acetonu a snižuje se produkce mléka při klinické ketóze o 50 až 80 % a při subklinické ketóze se snižuje o zhruba 20 %. Dochází ke snížení obsahu laktózy a zvýšení obsahu ketolátek v nadojeném mléce. Nervová forma se pozná podle neklidu dojnice, podrážděností, neklidem, ospalostí, skřípáním zubů, strnulou chůzí, křečemi svalů a obrnou (Haták et al., 2008).

Důležitou cestou, jak zvíře vyléčit je okamžitá změna krmné dávky. Důležité je, aby krmná dávka obsahovala velké množství lehce stravitelných sacharidů, minerálních látek, vitamínů a vlákniny. U nervové formy se zase podávají narkoleptika pro zklidnění zvířete. Prevence této nemoci zahrnuje vyrovnanou a kvalitní krmnou dávku. Také je doporučeno nechat dojnícím volný pohyb po výběhu, což podporuje odbourávání ketolátek (Slavíková, 2015).

2.4 Mastitidy

Mastitida je zánětlivá reakce nebo změna tkání mléčné žlázy na chemické, bakteriální nebo mechanické podněty. V nejvyšším počtu případů můžeme mastitidu identifikovat zvýšením počtem somatických buněk. Mastitidu může způsobit hned několik faktorů, ať už se jedná o činitele fyzikální, chemické nebo biologické povahy. Mastitida jako taková není pouze moderním problémem, který trápí chovatele až v posledních pár stoletích, ale již od počátku samotné domestikace skotu (Agropress.cz, 2017).

Záněty mléčné žlázy mohou vyvolat jak činitelé, kteří jsou infekčního nebo neinfekčního původu (Vovcr.cz, 2020).

K rozšíření zánětu pomocí infekční cesty dochází ve většině případů přes strukový kanálek. K nakažení pomocí krevního přenosu dochází u dojnic velmi zřídka. To znamená, že pouze v nízké míře případů se přenáší zánět z jedné dojnice na druhou. Avšak v případě, že se zánět šíří infekční cestou, může zasáhnout i celé stádo, a to díky přenosu z jedné dojnice na druhou. Druhou formou způsobující zánět je, jak už jsem zmiňoval, způsob neinfekční. Mezi vlivy, které jsou řazeny mezi neinfekční patří například poranění vemene, špatné krmení (vliv plísňe a jiných patogenů), stres nebo také špatné dojení (kolísání tlaku při dojení) (Agropress.cz, 2017).

Mastitidy z dojení vznikají při dojení buď při kolísání tlaku nebo také ze špatné hygieny dojení. K nejčastějším původcům patří (obrázek 2.1): *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis* aj. Přenáší se především díky vlivu člověka. Mastitidní mléko má jiné složení, lišící se od mléka dojnice, která je zdravá. Má nižší obsah tuku, laktózy, vápníku, fosforu, draslíku, sušiny a kaseinu. Na druhou stranu má mastitidní mléko vyšší obsah bílkovin, chloridu a také sodíku. Obsahuje také patogenní látky, v době léčby se v něm vyskytují antibiotika a je v něm zvýšený obsah somatických buněk. Jeho kyselost je pod 6,2 pH. Toto mléko se nedá využít pro technické účely, protože se špatně sráží syřidlem a vůbec nebo velice špatně v něm rostou mikrobiologické kultury. Významné jsou i sensorické změny (vločky, krev, slanost a vodnatost) (Vover.cz, 2020).

Druh bakterie	Počet vzorků	%
<i>St. Agalactia</i>	1389	0,63
<i>St. Dysgalactiae</i>	9397	4,29
<i>St. Uberius</i>	10767	4,91
a-haemolytic streptococci	1553	0,71
<i>S. aureus</i>	42546	19,42
Koaguláza negativní staphylococci	30417	13,88
<i>E. coli</i>	3178	1,42
<i>Klebsiella</i>	722	0,33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	144	0,07
<i>Actinomyces pyogenes</i>	1272	0,58
Kvasinky, plísňe a houby	1224	0,56
Jiné	10615	4,84
Součet	113224	51,67
Žádný nárůst	105892	48,33
Všechny vzorky	219116	100

Obrázek 2.1 – Frekvence bakterií způsobujících mastitidu (Ing. Dohnal, 2011)

2.4.1 Subklinické mastitidy

U těchto druhů mastitid nelze pozorovat klinické příznaky onemocnění a na první pohled nejsou jednoznačně poznat. Jedním z faktorů, jak je můžeme poznat, je zvýšený obsah somatických buněk (<200 000/1 ml), dále se také snižuje dojivost a snižuje obsah laktózy. Tento druh je také většinou příčinou, proč je klinická mastitida léčena špatně nebo také vůbec. Dále se také projevuje ve fyzikálních vlastnostech mléka jako jsou pH, vodivost a obsah chloridů (Agropress.cz, 2017).

2.4.2 Klinická mastitida

Dojde – li ke klinické mastitidě, tak se projevují typické klinické příznaky jako je zarudnutí, otok, vyšší citlivost daného místa a také zvýšená teplota dané čtvrti. Dochází také ke změně konzistence mléka, které se mění na mléku nepodobný sekret, který může být i krvavý, hnisavý, vodnatý nebo dokonce může změnit barvu. V případě, že zánět není tak rozsáhlý, mohou být jediným příznakem vločky v mléce. K výše zmíněným příznakům jako je změna barvy a konzistence dochází až v případech, kdy je zánět těžký. V těžkých případech není postižené pouze mléko dojnice, ale zhoršuje se i celkový zdravotní stav dojnice, například se projevuje vysoká horečka v dané čtvrti, dojnice nežere, nepřežvykuje, ulehá, a nakonec dochází k pomalému uhynutí zvířete (Agropress.cz, 2017).

2.4.3 Diagnostika mastitidy

Při diagnostice se posuzuje anamnéza. Musíme vyhodnotit vícero faktorů jako je například užitkovost dané dojnice a v jaké fázi laktace se nachází. Všechny tyto faktory je nejlepší srovnat v rámci stáda, kde se dojnice nachází. Dále také posuzujeme vzorky z tzv. bazénů nebo vzorky od jednotlivých dojnic, které můžeme mezi sebou porovnat. Ve výsledcích z jednotlivých testů nás především zajímá obsah močoviny v mléce, obsah tuku a také obsah již zmiňovaných somatických buněk jako ukazatele zdraví dojnice. Doporučuje se také zkontrolovat celkový zdravotní stav stáda, kde je dojnice chována (Forstagro.cz, 2016).

Při anamnéze je také důležité zahrnout faktory, které ovlivňují celkový zdravotní stav dojnic. Tyto faktory jsou vypsány a podrobněji rozebrány v kapitole „Faktory ovlivňující počet somatických buněk“ (Agropress.cz, 2018).

Po vyhodnocení anamnézy se dále přistupuje k celkovému klinickému vyšetření, ve kterém se zaměřujeme na zdravotní stav vemene a všech jeho čtyř čtvrtí. Následné nálezy se posuzují a srovnávají s dalšími dostupnými daty. Posuzuje se i velikost

vemene. Při tomto vyšetření je důležité vědět, že zadní čtvrti jsou přirozeně větší než čtvrti přední, pokud je tomu opačně, indikuje to problém. Dále se hodnotí zbarvení vemene. Zaznamenáváme všechny anomálie na vemeni, tj. například přítomnost různých pastruků, bradavic či jiných nežádoucích výrůstků. Po vizuální kontrole vemen se provádí ještě diagnostika hmatem. Můžeme zaznamenat bolestivost v určitých oblastech a temperaci, která souvisí se zánětlivým procesem, který je v danou chvíli přítomný. Dalším vyšetřením, které se provádí, je rozbor sekretu mléčné žlázy. Za normálních podmínek toto zajišťují dojiči před dojením. Nejprve se provádí smyslové hodnocení, na to potřebujeme nádobu s černým dnem. Uděláme pár odstříků, vizuálně a pomocí čichu zhodnotíme nadojený vzorek. Další možností je provést zkoušku varem. Normální mléko se po uvedení do varu nezmění, zatímco mastitidní mléko se vysráží. Při změně barvy dochází většinou ke změně na červenou, což souvisí s přítomností krve v mléce. Při posuzování pomocí čichu si dáváme pozor, jestli není vůně nasládlá, což má na svědomí přítomnost ketolátek nebo vůně hnilobná, která je typická pro těžkou mastitidu. Konzistenci mléka posuzujeme podle přítomného hleny nebo vloček. Přesnější možností pro vyšetření našeho vzorku mléka se využívají rychlé stájové testy (Vfu.cz, 2019).

3 Mikrobiologické vyšetření mléka

Zjišťování mikroorganismů má v mlékárenství důležitou pozici, díky které určujeme kvalitu mléka i následného výrobku. Podle obsahu mikroorganismů lze odvodit, jak dlouho mléko vydrží nezávadné a případně jak dlouho z něj vydrží výrobky nezávadné. Podle tohoto kritéria můžeme odhadnout hygienické podmínky ve kterých dojnice žijí (Vlková et al., 2009).

Pro vyšetření na mikroorganismy se odebírají vzorky buď od jednotlivé dojnice nebo také z celého nadojeného bazénu. Při odběrech vzorků od jednotlivých dojnic se mléko odebírá po provedení toalety a před dojením samotné dojnice. Také je nutno, aby byl vzorek odebrán po prvních pár střících (Vfu.cz, 2019).

Ve vzorku, který jsme odebrali od dojnice, se zkouší pouze mikroorganismy, které jsou životaschopné a zároveň ty, které jsou technologicky a hygienicky významné. Ty, které nejsou životaschopné, nejsou pro nás důležité. Podle druhů sledovaných mikroorganismů se vybírá diagnostická živá půda a musí se dodržovat optimální podmínky pro život mikroorganismů, které hodláme sledovat (Pláničková, 2012).

3.1 Odběr a příprava vzorku před odběrem

Vzorky mléka k mikrobiologickému vyšetření jsou odebírány do sterilní vzorkovnice. Namíchá se dohromady syrové a pasterované mléko. Před otevřením vzorkovnice se mléko důkladně promísí, tj. již zmiňované syrové a pasterované mléko. Vzorkovnice se otevírá asepticky nad plamenem nebo se vzorkovnice očišťuje etanolem za účelem nekontaminování vzorku. K vyšetření se z našeho vzorku odebere zhruba jeden mililitr mléka a je smíchán s devíti mililitry fyziologického roztoku s peptonem. Tímto postupem je získáno primární ředění (10^{-1}). Poté opět odebereme jeden mililitr z primárního ředění a opět předešlý postup opakujeme a tím získáme sekundární ředění (10^{-2}). Dále pokračujeme, než získáme terciální ředění (10^{-3}). Důležité je každé ředění pečlivě promíchat na mixeru, aby se vzorek důkladně promíchal (Pláničková, 2012).

3.2 Agarové půdy

Agar je hlavní nosnou částí většiny pevných půd. Jeho výhodou je stabilita. Skládá se z více složek, a to konkrétní ze dvou, z agarózy a agropeptinu. Dříve se přidával do tekutých základů půd a dnes se nejčastěji přidává do hotových sušených půd. Pevné půdy obvykle obsahují kolem 2 % agaru (Mikrobiologie.lf3.cuni.cz, 2005).

K mikrobiologickému vyšetření se využívají běžně dostupné agarové živné půdy.

GTK – M – agarová živná půda s glukózou, tryptonem, kvasničným extraktem sušeným odstředěným mlékem.

VČŽG (VRBG) – selektivní agarová živná půda s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a glukózou.

VČŽL (VRBL) – agarová živná půda s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a laktózou (Mikrobiologie.lf3.cuni.cz, 2005).

3.3 Mikrobiologické vyšetření

Jako nejčastější metoda k mikrobiologickému vyšetření se využívá metoda zaléváním do agarových půd nebo jinak se jí také říká očkování přelivem. Všechny věci, které se využívají při tomto druhu vyšetření musejí být sterilní. Pomocí pipety se náš vzorek, který je již desetinásobně zředěný nanáší do středu Petriho misek. Na každé výše zmiňované ředění se připraví dvě Petriho misky a vložíme do nich daný vzorek. Náš ředěný vzorek se přelije agarovou půdou, která bude ohřátá na hodnotu mezi 40° - 45°C. Množství agarové půdy, která se použije do vzorku se stanovuje na zhruba 15–20 ml. Vzorek, který nám tímto postupem vznikne, necháme na našem pracovním stole a důkladně promícháme. Všechny tyto postupy se opět provádějí pomocí sterilních nástrojů. Po promíchání necháme vzorek utuhnout. Po ztuhnutí vzorku se Petriho misky vloží do termostatu a o teplotě 30° se nechají inkubovat dnem vzhůru. Když chceme zjistit přítomnost psychotropních organismů, tak se v termostatu udržuje teplota zhruba 6,5°C. Po uplynutí inkubační doby se odečtou vzrostlé kolonie na půdách (viz obrázek 3.1). Při stanovování všech mikroorganismů se odečítají všechny kolonie. Když určujeme kolonie taxonomických mikroorganismů, tak se určují pouze kolonie daných vlastností, které hledáme (Pláničková, 2012).



Obrázek 3.1 – Krevní agar s několika koloniemi (Mikrobiologie.lf3.cuni.cz, 2005)

Počet kolonií na misce se stanovuje pomocí sečtení všech kolonií, které vznikly na misce. Po odečtení dané kolonie se na spodní straně misky udělá čárka za danou kolonií, tak, abychom na konci odečítání věděli, kolik kolonií jsme napočítali. V běžných případech se napočítá od 30 kolonií do 300 kolonií a specifických kolonií je běžně zjištěno od 10 do 150 kolonií. Počet mikroorganismů v našem vzorku se počítá pomocí aritmetického průměru. Podle následujícího vzorce (Pláničková, 2012).

$$N = \Sigma_c / [(n1 + 0,1n2) d] \quad (1)$$

Kde:

N – Počet mikroorganismů ve vzorku

Σ_c – součet kolonií vyrostlých na všech plotnách, které byly k výpočtu použité

n1 – počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění

n2 – počet ploten použitých pro výpočet ze druhého ředění

d – první pro výpočet použité ředění.

4 Technologie detekující změnu složení mléka

Při detekci zdravotního problému u dojnice je důležité mít data o jejím zdraví co nejdříve. V tomto dnes pomáhá moderní technologie, která umí rozpoznat složení mléka. V online režimu umí přijít na to, co je v mléce obsaženo a následně vyhodnotit, jestli je tam daných složek dostatek, nedostatek nebo tam jisté složky nemají být obsaženy vůbec.

Velkou výhodou nových technologií je, že mohou analyzovat více složek mléka najednou a může tak být učiněno přímo v místě, kde se dojnice dojí. To v případě nějakého zdravotního problému umožní rychlou reakci.

Tato kapitola je zaměřena na technologie, které umí detekovat jednotlivé složky mléka.

4.1 NK test

Název testu vznikl odvozením zkratky od slovního spojení „Natural killers“ – odtud tedy NK test. Tento druh testu se používá k detekování neklinické mastitidy, která probíhá plíživě – tzn. že při ní nedochází ke změnám mléka, a proto je potřeba využít tohoto testu k jejímu odhalení. Pomocí testu určíme počet somatických buněk především leukocytů. Při reakci s NK testem se ze somatických buněk vytvoří gel. Hustota gelu nám signalizuje počet somatických buněk v mléce obsažených. Čím je gel hustější tím více je v mléce obsažených somatických buněk (Forstagro.cz, 2016).

V rámci testu se využívá barevný indikátor, která se nazývá fenolová červeně. Tato látka v mléce reaguje na změny pH. Při normálním pH mléka, tj. mírně zásadité (7 – 7,5) způsobuje chemická reakce zbarvení do lehké růžové, takto poznáme, že je mléko v pořádku. V jiném případě, kdy je mléko kyselé, vede chemická reakce ke zbarvení žlutavému (viz obrázek 4.1). Když je mléko silně alkalické, barví se do sytě červené až fialové barvy. Při skutečnosti, že mastitidní mléko je silně zásadité, lze z tohoto testu snadno odhalit, že dojnice není v dobrém zdravotním stavu. Jako každý jiný test nebo metoda vyšetření má svoje limity i tento druh testu. NK test se nedá využít na testování přítomnosti kolostra. Mléko je totiž za přítomnosti kolostra kyselé a test tak pak může vyjít falešně pozitivní. Pro zhodnocení NK testu jsou důležití činitelé tzv. detergenty. Detergenty nebo také jinak speciální saponáty způsobují rozpad somatických buněk, které jsou v nadojeném vzorku mléka a uvolňují jejich nukleové kyseliny.

Na základě objemu nukleových kyselin obsažených v mléce, pak určíme počet somatických buněk. Tuto metodu nazýváme nepřímou, protože se nezjišťuje přímo počet somatických buněk, ale množství nukleových kyselin těchto buněk (Vfu.cz, 2019).



Obrázek 4.1 – NK test (Agropress.cz, 2018)

4.2 Elektrická vodivost mléka

Velmi často se využívá měření elektrické vodivosti v rámci rychlých screeningových metod. Tento parametr se využívá v rámci komplexní diagnostiky – klinické vyšetření, biochemické, senzorické a laboratorní. Mléko od dojnice se zánětem má zvýšený obsah iontů, který lze snadno detekovat pomocí elektrické vodivosti. Těmito ionty jsou Na a Cl (Vfu.cz, 2019).

Specifická měrná elektrická vodivost mléka neboli konduktivita je měřítkem obsahu a typů iontů v mléce obsažených. Soli, které jsou rozpuštěné v kapalinách jako již zmíněné soli Na^+ a Cl^- jsou vodivé. To znamená, že čím více solí je obsažených v mléce, tím vyšší bude specifická měrná elektrická vodivost daného vzorku mléka. Podle definice specifické měrné elektrické vodivosti mléka je jednotka dána $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Při měření a následném zaznamenávání výsledků do tabulky je doporučeno zaznamenávat i teploty média (mléka i vody). Protože při rostoucí teplotě média roste i elektrická vodivost. Při teplotách od 15 do 40 °C se udává elektrická vodivost od 0,0146 až do 0,0241 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Tyto jednotky jsou udávány při tom, když je dojnice zdravá a nemá zdravotní problém. Při zánětu mléčné žlázy tyto hodnoty narůstají, protože se zvyšuje obsah iontů v mléce a ty následně zvyšují elektrickou vodivost. Metoda měření specifické měrné elektrické vodivosti je další z metod, mimo NK testů, jak se dá zjistit zdravotní problém u dojnice. I tato metoda je nepřímá, protože se nezjišťuje přímo obsah somatických buněk v mléce obsažených, ale pouze obsah iontů a z toho se poté určuje počet somatických buněk. Referenční hodnota zdravého mléka je od 4

do $6 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Nemoci mléčné žlázy, říjový cyklus i jiné nemoci dojnic ovlivňují výklad naměřených hodnot a se všemi těmito proměnnými musíme počítat (Ing. Dohnal, 2011).

4.2.1 Faktory ovlivňující elektrickou vodivost mléka

Vemeno je rozloženo do čtyř čtvrtí, které spolu sousedí a jsou na sobě nezávislé. Ovšem i přesto je zánět problémem všech čtyř čtvrtí. Zánět začíná v jedné čtvrti a poté se šíří do další až se nakonec dostane v krátké době do všem čtyř (Michel, 1994).

V každé čtvrti měříme elektrickou vodivost zvlášť. Naměřené hodnoty se mohou u zdravého vemene lehce lišit, ale tyto rozdíly nejsou příliš výrazné. Hodnoty se také lehce odlišují po každém dojení, v závislosti na okolnostech. Elektrická vodivost se u čtvrtí se zánětem postupně zvyšuje oproti hodnotám u zdravé čtvrti. Nesmíme brát v potaz pouze hodnoty naměřené celkově, ale musíme brát v potaz hodnoty naměřené v průběhu času a jejich postupný vývoj a odchylky (Kawasaki et al., 2004).

Faktorů ovlivňujících elektrickou vodivost mléka je několik. Elektrická vodivost je závislá na počtu laktací, kterými dojnice prošla. Se zvyšujícím počtem laktací se zvyšují i námi naměřené hodnoty. Jak bylo již uvedeno výše, s přibývajícemi laktacemi se zvyšuje počet somatických buněk u zdravých dojnic, proto se zvyšují i naměřené hodnoty. Zároveň se zvyšují naměřené hodnoty i podle fáze laktace. S měnícím se složením mléka se zvyšují i naměřené hodnoty a totéž platí i u přibývajících dní laktace. Při dojení mají různé části mléka různou elektrickou vodivost. Mléko ihned po začátku dojení, tj. po prvních pár střících má nejvyšší hodnoty. V průběhu dojícího procesu se elektrická vodivost snižuje až je nejnižší u reziduálního mléka. Nižší hodnoty jsou zaznamenávány u zvířat, která mají přístup na volnou pastvu během roku. Kdežto způsob, jakým jsou zvířata chována má pouze velmi malý vliv. Jeden z nejdůležitějších faktorů je doba mezi jednotlivými dojeními. Čím déle není dojnice podojena, tak narůstá nitrovenenní tlak a s tím vzrůstá propustnost vyměšovacího epitelu. Individualita zvířete také hraje svojí roli. Každé plemeno má optimální hodnoty elektrické vodivosti na jiné úrovni. Při vyšším obsahu mléčného tuku, klesá elektrická vodivost (Ing. Dohnal, 2011).

4.2.2 Způsob měření a následné vyhodnocení elektrické vodivosti

V současné době nejvíce používanou metodou, při které se stanoví obsah iontů, je gravimetrie. Tato metoda ale nepatří mezi ty nejnovější. Mezi nejvíce technologicky vyspělé metody tak řadíme atomovou absorpční spektrometrii (Ing. Dohnal, 2011).

V oblasti zdravotnictví, zejména v hematologii, se používají takzvané iontoselektivní elektrody, které jsou založené na potenciometrickém měřicím principu. To umožňuje rychlé měření 10-20 s v maloobjemových vzorcích. Tyto metody jsou nabízeny jako dvoutyčový měřicí článek (zvláštní elektroda a odloučená referenční elektroda) nebo jednotyčový měřicí článek (vše v jedné elektrodě). Obvykle jsou velmi citlivé, avšak ohrožené elektrodovou trvanlivostí, která je jen několik měsíců (4-12 měsíců). Máme na výběr z více metod měření iontů v mléce. Metody opět dělíme na přímé a nepřímé. Mimo zjišťování změny obsahu iontů v mléce můžeme zjišťovat i změnu obsahu jiných složek, a včas tak indikovat zdravotní problém u vemene. Na počátku dvacátého prvního století došlo k výzkumu změn enzymů v mléce jako je například laktát dehydrogenáza. Vzhledem k časové náročnosti těchto technik, jich bylo uplatňováno v minulosti spíše v laboratořích než běžně v terénu u dojnic. V posledních letech se tento způsob testování začíná objevovat i v „terénu“ (Agris. Fao.org, 1998).

V dnešní moderní době mohou být hodnoty elektrické vodivosti měřeny v reálném čase a v reálném čase i kontrolovány. V případě, že chceme měřit elektrickou konduktivitu jedné dojnice, tak je elektroda umístěna ve sběrném potrubí nebo chceme-li kontrolovat zdravotní stav jednotlivé čtvrti vemene, tak je elektroda umístěna v hadici, která vychází od jednotlivých struků. Problémy se ale nevyhýbají ani tomuto modernímu systému. Jedním z problémů měření elektrické konduktivity mléka v reálném čase je vkládání elektrod a také pění mléka, díky kterému je měření nepřesné (Ing. Dohnal, 2011).

4.2.3 Vyhodnocení elektrické konduktivity

Zdravotní stav dojnic můžeme kontrolovat jako celek celého stáda, jednotlivé dojnice nebo jednotlivé čtvrti vemene dojnice. Měřené hodnoty mají určitou hranici, která by neměla být překročena, pokud je překročena, tak musíme diagnostikovat problém, kterým dojnice trpí. Nebo můžeme porovnávat naměřené hodnoty s minulými měřeními a pozorovat změny. Riziko u tohoto způsobu je, že poslední měření byla zkreslena nějakým zdravotním problémem a nemusí znamenat, že je dojnice zdravá. Je několik způsobů, jak můžeme vyhodnocovat data, která dostaneme při našem měření. První z metod je rozdílová (Agris. Fao.org, 1998).

Jedná se o rozdíl mezi nejnižší čtvrtově specifickou hodnotou elektrické vodivosti jednoho dojení a další zbývajících čtvrtí vemene. Výpočet je podle následujícího vzorce (Agris. Fao.org, 1998).

$$\Delta EC_{\text{abs}} = EC_a - EC_{\text{min}} \quad (2)$$

Kde:

EC_{min} – minimální hodnota aktuálního dojení = reference

EC_a – elektrická vodivost aktuální čtvrti

ΔEC_{abs} – absolutní odchylka zkušební vzorku k referenci [$\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$]

Druhou používanou metodou je metoda podílová:

Zde je podíl mezi nejnižší čtvrtově specifickou hodnotou EC jednoho dojení a zbývajících čtvrtí stejného vemene-inter-čtvrtový-poměr. Výpočet je podle následujícího vzorce.

$$\Delta EC_{\text{rel}} = \frac{EC_a * 100}{EC_{\text{min}}} \quad (3)$$

Kde: EC_{min} – minimální hodnota aktuálního dojení = reference

EC_a – elektrická vodivost aktuální čtvrti

ΔEC_{rel} – relativní odchylka zkušební vzorku k referenci [%]

Infekce mléčné žlázy není ve všech čtvrtích ve stejnou dobu, a právě proto má nejvyšší vypovídající hodnotu maximální hodnota elektrické vodivosti v jednotlivých čtvrtích (Agris. Fao.org, 1998).

4.3 NIR – blízká infračervená oblast

4.3.1 Princip fungování NIR spektroskopie

Infračervené záření je záření v rozsahu vlnočtů od $12\,800 - 10\text{ cm}^{-1}$ a vlnových délek od $0,75$ do $1\,000\ \mu\text{m}$. Toto záření je specifické v tom, že infračervené záření navazuje na jedné straně na viditelné záření a na straně druhé na záření mikrovlnné (Irudayaraj, 2008).

Pásma, která jsou nejdůležitější v infračerveném záření, jsou v rozmezí od 700 do $1\,800\text{ nm}$ a v kombinačním přechodu od $1\,800$ do $2\,700\text{ nm}$ způsobených vibrací vazeb molekul (Metrom.cz, 2020).

NIR je velmi často volen jako hlavní prostředek pro všechny hlavní parametry potravin. Příklady těchto parametrů jsou: stanovení vlhkosti, tuku, bílkovin, škrobu

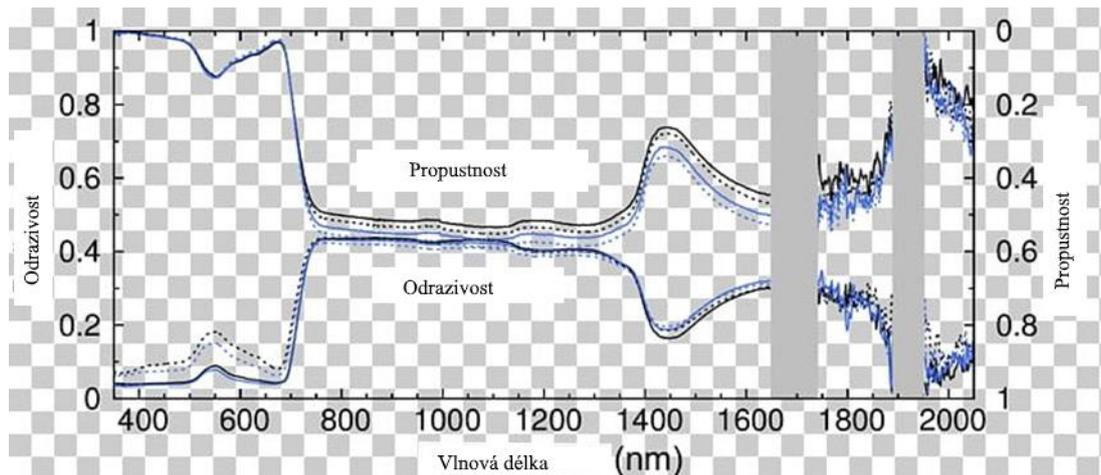
nebo aminokyselin. Princip fungování infračervené spektroskopie s Furierovou transformací je založen na spojení interferometru s velice citlivým detektorem a počítačem. Interferometr zesiluje nebo zeslabuje záření z polychromatického zdroje. Interferometr se skládá ze tří částí, ze dvou na sebe kolmých zrcadel, jedno z nich je pohyblivé a druhé se nehýbe a polopropustného děliče svazku paprsků tzv. beamsplitteru, který je umístěn na linii těchto zrcadel pod úhlem 45° . Další základní částí interferometrických spektrometrů bývá zdroj světla, což velmi často bývá keramická tyčka např. z karbidu křemíku. Jako další zdroj světla se využívají také žárovky, např. žárovka s wolframovým vláknem nebo halogenová žárovka, které při zahřátí emitují záření v infračervené oblasti. K detekci je možno využívat mnoho typů detektorů, ale fotodetektory není možné používat k přímé detekci, kvůli neschopnosti infračerveného záření excitovat elektrony. Mezi jedny z nejvyužívanějších detektorů patří PbS, PbSe a InSb. Po vložení kvety do dráhy paprsků dojde k zeslabení záření charakteristických vlnových délek. Za komorou, ve které je umístěn vzorek, je vhodně zvolený detektor pro daný spektrální obor záření. V detektoru je umístěn fotočlánek, který mění světlo, které na něj dopadá na elektrický signál. (Dvořáková, 2016).

4.3.2 Infračervený spektroskop

V dnešní době se využívají k získávání spekter detektory s Furierovou transformací, které pracují na principu interference záření, kde se získaný signál převede na infračervené spektrum za pomoci matematické operace, která se nazývá Fourierova transformace. Před těmito přístroji se používali filtrové přístroje, které pracovaly pouze s určitými vlnovými délkami, právě tyto přístroje nahradily spektroskopy. K NIR detekci se využívají přístroje, které se jmenují disperzní spektroskopy. Tyto spektroskopy pokrývají oblast záření viditelného spektra a případně i ultrafialovou. Avšak i tyto spektroskopy jsou postupně nahrazovány těmi s Furierovou transformací. V odborném textu, lze také nalézt zkratku FT-NIR, kterou jsou myšleny právě spektroskopy s Furierovou transformací. FT-NIR spektroskopy se využívají posledních více než dvacet let. Díky reakci mezi vzorkem, zrcadly a referencí jsou nastaveny speciální energetické modely, vyvolávající interferogramy, které jsou použity k výpočtu absorbance vzorků (Ozaki, 2008).

4.3.3 Techniky měření v NIR spektroskopii

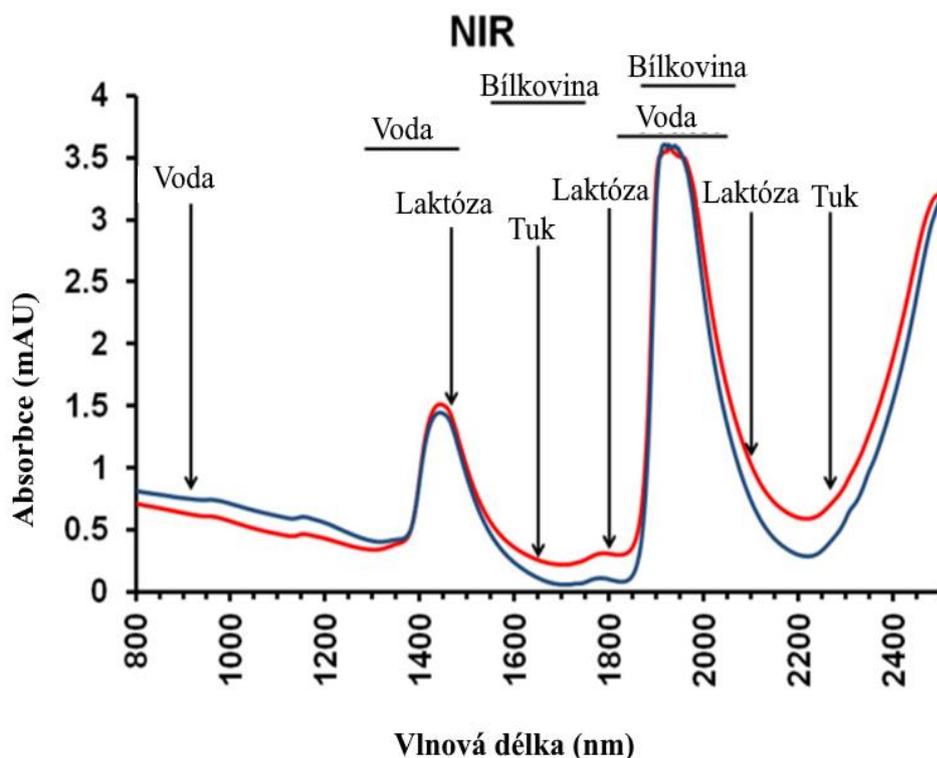
Techniky měření se dají rozdělit na dvě skupiny podle toho, jaké fyzikální jevy se při měření využívají (viz. obrázek 4.2)



Obrázek 4.2 – Transmitta a reflektance (Dvořáková, 2016)

Podle toho, zda je absorpce záření měřena až po průchodu vzorkem nebo po odrazu a podle toho se také dále určují další metody měření jako jsou: spektakulární či difuzní reflektance, rozptyl, transflektance nebo interaktance. (Dvořáková, 2016)

Každá složka mléka se nechá pozorovat při jiné vlnové délce. Na obrázku uvedeném níže jsou vyznačeny jednotlivé složky a při jaké vlnové délce je můžeme detekovat (viz. Obrázek 4.3) (Huda, et al, 2021).

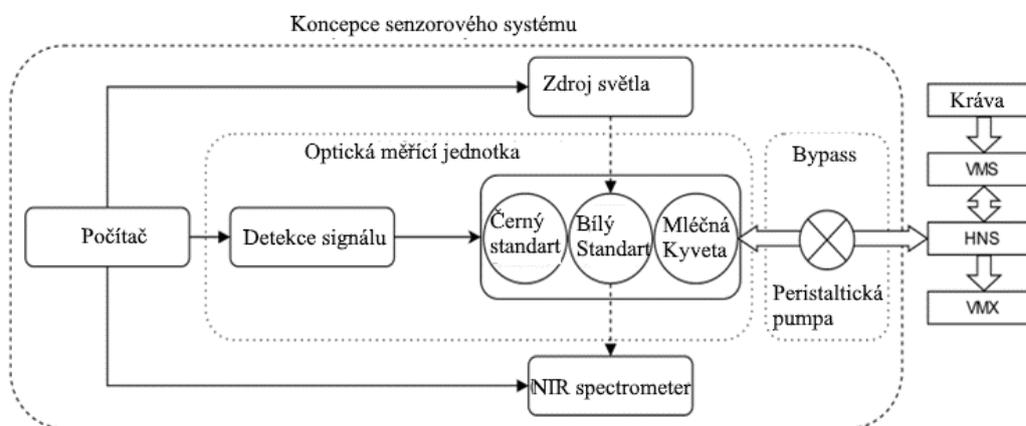


Obrázek 4.3 – Pozorovatelnost jednotlivých složek mléka při různých vlnových délkách (Huda, et al, 2021)

4.4 Využití NIR technologie pro online detekci

Přínos a přesnost NIR technologie byl prokázán v laboratorním prostředí. V poslední době je snaha implementovat NIR technologii přímo do dojící linky, aby mohl farmář například při dojení třikrát denně dostávat výsledky přímo do svého počítače a mohl tak mít zdravotní stav dojnic pod kontrolou bez přílišné námahy, rychle, a ještě ušetřit finanční prostředky díky včasnému odhalení problému. Dalším cílem tohoto zařízení je vytvořit kalibrační sadu dat, díky které bude možné v budoucnu předpovídat složení mléka (Diaz-Olivares, et al, 2020).

Senzorový systém zařízení určeného k měření se skládá z NIR spektrometru, chlazením InGaAs (Indium – Gallium – Arsenid), diodovým polem z 256 pixelů, 20W halogenový světelný zdroj světla, optická měřicí jednotka, vyhrazený počítač, který provozuje software pro kontrolu a spektrální akvizici v LabView 2012, ocelové ochranné pouzdro, optická měřicí jednotka, která obsahuje kulatý borosilikát, kyveta o vnitřní tloušťce a průměru 2 respektive 26 mm a obsahují 1,2 mililitru vzorku během spektrálního testu, spektrální referenční pár s tloušťkou 2 mm, translační stupeň sestávající z filtračního sklíčka. Procházející světlo je shromažďováno pomocí čočky konvergovaného typu s ohniskovou vzdáleností 31,6 mm a naváděná do spektrometru pomocí optického vlákna (průměr jádra je nízký okolo 600 um). Objektiv je zarovnán se středem halogenového světelného zdroje a translační stupeň se pohybuje kolmo k ose čočka-halogen (viz. obrázek 4.4). Pro každý vzorek mléka zaznamenal spektrometr v NIR spektru propustnost v rozmezí od 960 až do 1 690 nm. Tato spektra se získávají s integračním časem 10 ms a sběrem 100 opakovaných měření na vzorek mléka, agregovaných do průměru spektra pro každý vzorek (Abd El – Fattah, A.M, et al., 2012).



Obrázek 4.4 – Zobrazení konceptu senzorevého systému (Diaz-Olivares, et al, 2020)

Tento senzoreký systém byl při vývoji testován společně se strojem VMSTM Classic. Pomocí vzorkovače NavigatorTM (HNS Supra +, DeLaval) byly odebírány vzorky o

objemu 300 ml. Po dobu osmi týdnů senzorický systém analyzoval mléko od čtyřiceti jedna holštýnských krav. Krávy byly dojeny v průměru 2,6 denně. Časový rozestup mezi odebíráním vzorků byl od dvaceti jedna hodin do osmdesáti pěti hodin. V průměru bylo odebíráno sto padesát osm vzorků mléka týdně, které byly dále určeny k analýze. Společnost odebrané vzorky konzervovala pomocí bronopolu (0,3ml/l) a k analýze vzorku docházelo do tří dnů po odběru. V tomto experimentu byly referenční hodnoty získány podle ISO 9622 (ISO,2013), kde musí být přesnost pro odchylku pro tuk <1 % a pro protein a laktózu je to <0,9 %. Celkem bylo během experimentálního období odebráno přes 1 270 vzorků. Několik vzorků muselo být vyřazeno kvůli chybám během procesu, několik bylo vyřazeno kvůli neúspěšnosti referenční analýzy. Celkový počet odebraných vzorků byl nakonec 1 165 od 36 krav. Po dokončení analýzy vzorků se vytvořila sada dat, které jsou používány ke kalibraci, ve které jsou data od 9 krav, a ještě vznikla druhá sada dat jako ověřovací, která je z dat od dvaceti sedmi krav. Dále byly odstraněny spektra, ve kterých dochází k absorpci vodou, tj. od 1 360 až po 1 500 nm, aby nedocházelo k zavádění. Celkově vyšlo 420 možných kombinací, které se využívají pro predikce (Aernauts, B. et al, 2015).

Předpovědní přesnost systému byla nakonec velmi vysoká pro všechny tři mléčné složky, pro tuk to bylo 0,078 %, pro bílkovinu 0,080 % a pro laktózu 0,077 %. Zhruba po týdnu měření a vyhodnocování v online režimu se přesnost přístroje začala zhoršovat, u tuku klesla přesnost na 0,083 %, u bílkoviny na 0,110 % a u laktózy na 0,092 %. I tyto odchylky měření stále splňují normu ICAR pro systém analýzy mléka na farmě, pro všechny části mléka. A dokonce i po zhoršení přesnosti stále splňují podmínky ICAR pro laboratorní analytické systémy pro tuk, laktózu a bílkovinu. Dále také byla zlepšena výkonnost modelu pro určování laktózy v reálném čase za pomoci speciální korekce zkreslení specifické pro krávy. Vzhledem k tomu, že byl během měření v čase zjištěn posun, bude v průběhu nutná kalibrace, tak aby systém fungoval tak jak má a splňoval nutné předpisy. Výzkum by se měl zaměřit dále na implementování systému, který bude inteligentní, sám pozná posun v měření a nezávisle na vnějším zásahu systém zkalibruje, tak aby nemuselo docházet k vnějšímu zásahu (Diaz-Olivares, et al, 2020).

4.5 MIR – infračervené spektrum

Jedná se o techniku chemické identifikace látek v mikroměřítku. MIR absorpční spektrometrie je jednou z nejdůležitějších a relativně levných metod strukturní analýzy organických a anorganických látek ve všech skupenstvích. V infračervených spektrech sledujeme závislost T nebo A na vlnočtu absorbovaného záření. Spektrum je pásové a pásy odpovídají různým typům vibračních přechodů. Toto spektrum dále dělíme na dvě části. Na oblast charakteristických neboli skupinových vibrací, které jsou od 4 000 do 1 000 cm^{-1} , tato oblast se využívá pro identifikaci funkčních skupin v molekule. Oblast otisku palce je od 1 000 do 400 cm^{-1} . Zde se nachází deformační vibrace ovlivněné strukturou molekuly a umožňují tak identifikovat konkrétní organickou látku (Ach.upol.cz, 2020).

Tento druh analýzy se využívá při dvou druzích analýzy, a to je kvantitativní a kvalitativní. Kvalitativní analýza se využívá k identifikaci charakteristických funkčních skupin a jednotlivých látek a následně se výsledky porovnávají s knihovnamí spekter. Při strukturní analýze se zjišťují informace o symetrii, konformaci, konfiguraci, vodíkových vazbách apod. Naopak kvantitativní metoda má menší uplatnění, před měřením je nutné precizně změřit tloušťku absorpční vrstvy. Zde se využívá Lambertova-Beerova zákona a vícerozměrných statistických metod pro kalibraci (Ach.upol.cz, 2020).

4.6 Širokopásmová laserová střední infračervená spektroskopie využívající kvantový kaskádový detektor pro analýzu mléčné bílkoviny

Infračervená spektra proteinů se vyznačují dvěma charakteristickými absorpční pásy, které se převážně využívají pro strukturální analýzu. Pás amidu I (1 600–1 700 cm^{-1}) a pás amidu II (1 500–1 600 cm^{-1}). Charakteristické vibrace těchto skupin poskytují podrobné informace o vzorech vodíkových vazeb stabilizující sekundární struktury proteinů. Využití NIR spektroskopie s Furierovou transformací, se považuje za zlatý střed, avšak díky silnému pásu se dá reálně využívat pouze v pásmu amidu II, protože voda má silné absorpční pásmo, kolem 1 645 cm^{-1} . Což omezuje informace o sekundární struktuře proteinů (Fabian, H. et al. 2006).

V poslední době se začíná využívat spíše než detektorů s Furierovou metodou, detektor, který nese označení QCL: Tento detektor poskytuje širší spektrum ladění, a to až do 500 cm^{-1} . Řada studií využívajících QCL pro širokopásmovou spektroskopii kapalin uvádí zlepšenou detekci ve srovnání s FTIR spektroskopii pro různé analýzy,

včetně proteinů. Vysoké výstupní výkony QCL přímo přispěly k pětinasobnému zvýšení délky přenosové cesty, jak je požadováno pro robustní manipulaci se vzorky a přístup k amidovému I pásmu, což umožňuje individuální kvantifikaci bílkovin hovězího mléka v komplexních maticích (Dabrowska, et al., 2022).

V principu se jedná o zařízení, které měří zeslabení světla procházející kapalným vzorkem na různých frekvencích, vyvolané absorpcí pro identifikaci a kvantifikaci proteinů přítomných ve vzorku. Za tímto účelem byl termoelektricky chlazený kvantový kaskádový laser s vnější dutinou (Hedgehog, Daylight Solutions Inc., San Diego, CA), laditelný od 1 830 do 1 470 cm^{-1} provozován, v pulzním režimu při modulační frekvenci 1 MHz, pracovní cyklus 20 % a proud laseru 700 mA, což odpovídá pulznímu průměru výkonu cca 240 mW při 1 590 cm^{-1} . Operační parametry laseru byly zvoleny tak, aby maximalizovaly výstup optického výkonu a množství světla dostupné pro interakci světlo-vzorek, a tedy použitelnou délku dráhy pro měření přenosu. Délka přenosové cesty je optimalizovaná tak, aby bylo dosaženo co možná nejlepšího poměru signálu k šumu pro měření proteinů v předloženém systému (Harrer, 2017).

Vyslaný paprsek je zaostřený parabolickým zlatým zrcadlem na plochu QCD a natupo připojen k jeho aktivní oblasti. Čip detektoru s integrovaným plošným spojem byl připojen přes koaxiální kabel přímo k nízko šumovému napěťovému vstupu MFLI lock-in zesilovače pro měření odezvy detektoru na referenční frekvenci odpovídající frekvenci laserové modulace dodávané laserovým ovladačem prostřednictvím signálu TTL a tím zlepšit SNR celého detekčního zařízení. Zesilovač byl vybaven rozšířeným mezním rozsahem 5 MHz. Optická soustava byla uložena a propláchnuta suchým vzduchem před a během měření, aby se minimalizovaly nepříznivé účinky páry vodní páry ve zkoumané spektrální oblasti. Tento detektor má výhodu oproti detektorům využívajícím Fourierovu metodu, dokáže analyzovat bílkoviny nejen v pásmu amidů II, ale i v pásmu amidů I. Dále je tento senzor stejně výkonný pro analýzu bílkovin jako špičkové FTIR senzory, při zachování mnohem větší kompaktnosti a jednoduchosti. Ale i po 20 letech vývoje je tato technologie stále na začátku, zejména pro detekci v kapalně fázi. Tato technologie nabízí výhodu při provozu v pokojové teplotě tím, že jí není nutné chladit, nízkou spotřebu energie, vynikající linearitu, nízký šum, velkou šířku pásma, vysokou rychlost a vysoké prahové hodnoty saturace. Na závěr lze říci, že tuto technologii lze považovat za stavební kámen pro vývoj další generace chemických senzorů MIR v kapalně fázi, které poskytují vysoce kvalitní informace v širším spektrálním rozsahu (Dabrowska, et al., 2022).

5 Přístroje pro online detekci kvality mléka

Dnes je na trhu několik výrobců přístrojů, které v online režimu měří kvalitu nadojeného mléka. V této kapitole bude popsáno, jak tyto přístroje fungují, případně jejich výhody, nevýhody a cena za přístroj.

5.1 TDM Afilab – Analýza mléka v reálném čase

Afilab je přístroj na měření složek mléka v reálném čase. Zařízení je instalováno v dojrně mezi měřič mléka a sběrnou linku mléka. Výjimečným přínosem technologie Afilab je, že zařízení je online, v přímé komunikaci s počítačem mlékárny. Měření probíhá po celou dobu dojení a data se shromažďují pro každou krávu zvlášť a ukládají na disk počítače pro další použití (Clal.it, 2009).

Přístroj měří v reálném čase obsah klíčových složek v mléce. Měří obsah tuku, bílkoviny, laktózy, somatických buněk a přítomnost krve. Přístroj je velice citlivý, a tak je jeho odchylka nepatrná. V zařízení také nejsou žádné pohyblivé části, které by se mohli rozbít, a tak je přístroj velice odolný a má dlouhou životnost (Afimilk.com, 2019).

Cena přístroje Afilab je uváděna kolem dvaceti tisíc korun českých (Forstagro.cz, 2016).

Náklady na jednu nemocnou krávu jsou podle společnosti Afimilk zhruba 330 USD ročně. Díky využívání tohoto systému je možné ušetřit zhruba 60 % těchto nákladů, což je zhruba 200 USD za krávu (Afimilk, 2019).

V případě, že má farmář dojnic například padesát je tato částka zhruba 10 000 USD, což je značná úspora finančních prostředků.

5.2 Dojící robot Merlin

Merlin je přístroj na dojení, vyvinutý firmou Fullwood Packo, která sídlí v Anglii. Tento přístroj stejně jako předešlý měří stejné složky mléka, avšak jeho podstata je jiná. Merlin je totiž přístroj na dojení mléka a měření složek mléka je pouze doprovodná funkce. Navíc obsahuje více senzorů na měření a každý má za úkol měřit něco jiného. FullQuest senzor měří elektrickou vodivost, FullLab tuk, bílkovinu a laktózu, FullCount počet somatických buněk. Přístroj přenáší live data do počítače, ale je k němu i speciálně vyvinutá aplikace, díky které uvidíte live data i ve svém telefonu (Fullwoodpacko.com, 2022).

6 Novinky v detekci složek mléka

V této kapitole budou popsány dvě novinky z oboru měření kvality mléka, které mohou v následujících letech ovlivňovat trendy ve vývoji přístrojů k měření kvality mléka.

6.1 Testování mléka pomocí mikroRNA

Tento objev poskytuje způsob měření kvality pomocí metody mikroRNA v mléce. Využívá detekční činidla, biočipy a různé speciální soupravy. Poskytuje markery používané pro detekci kvality mléka. Uvedené markery jsou 109 detekovaných zralých mikroRNA, které stabilně existují v kravském mléce (Patentimages.storage.googleapis.com, 2016).

Cílem tohoto vynálezu je detekovat všechnu mikroRNA v mléce obsaženou a následně výsledky porovnat s tabulkou jaká mikroRNA by měla být v mléce obsažena a není, je mixovaná mezi sebou nebo převládá nějaká jiná. Na základě těchto výsledků je pak možné stanovit zdravotní stav dojnice (Patentimages.storage.googleapis.com, 2016).

Abychom ale výsledky získali, musíme využít další metodu například PCR testování v reálném čase, která zahrnuje následující kroky. Prvním krokem je celková extrakce RNA z testovaného vzorku kravského mléka a získání vzorků cDNA prostřednictvím reverzního trans RNA reakce skriptu. Druhým krokem je zpracování PCR reakce v přítomnosti mikroRNA specifické primery a specifické fluorescenční sondy. Třetím krokem je zpracování detekce v reálném čase během PCR a porovnání výsledků detekce s výsledky detekce kravského mléka zdravé dojnice, aby bylo možné určit existenci nebo množství mikroRNA v testovaných vzorcích. Používání této metody při testování dojnic na nemoci je velmi přesné, ale tato technologie je stále na začátku vývoje a před uvedením do běžné praxe ji bude potřeba zjednodušit. (Patentimages.storage.googleapis.com, 2016).

6.2 Přenosný detektor pro detekci složení mléka syrového a homogenního

Při zjišťování kvality mléka se využívají fyzikální a chemické metody, jako jsou Röse-Gottliebova pro zjišťování tuku, Kjeldahlova metoda pro zjišťování bílkoviny, které jsou sice velice přesné, ale během detekce lze detekovat pouze jednu složku ze vzorku, trvají dlouho a dají se využívat pouze v laboratořích. Proto byl sestrojen tento detektor.

Optický systém detektoru se skládá z mikrospektrometru, modul světelného zdroje, sonda z optického vlákna ve tvaru „Y“, křemenná vzorková cela, polohovací táč, stínící světlo a chladicí ventilátor. Lampa zde je mikrohalogenová, která dokáže vyzařovat světlo s dostatečnou intenzitou a dobrou stabilitou. Lampa má napájecí napětí 5 V a výkon 7 W. Průměr vyvinuté sondy z optického vlákna byl 10 mm. Pro snížení vlivu emitovaného tepla na stabilitu intenzity světla, byl použit hliníkový chladič a chladicí ventilátor. Kryt stínění světla byl černý, aby se eliminoval vliv okolního světla na výsledky měření. Křemenná vzorková cela měla hloubku 40 mm, vnitřní průměr 30 mm a ploché dno. Pro elektrickou soustavu detektoru je využito modulu Raspberry Pi, lithiová baterie, dva napájecí moduly, klávesnice a displej. Dále je také využit Wi-Fi modul transceiveru pro vzdálené připojení. Detektor má dva napájecí moduly. Detektor má celkově sedm tlačítek, pět na ovládání (nahoru, dolů, menu, návrat a měření) a dvě pro ovládání napájecího modulu. Pro zlepšení přesnosti a snížení nákladů byl instalován OLED displej s velikostí 1,3 palce. Byl použit k zobrazení výsledků detekce a některých uživatelských informací o interakci. Displej je však příliš malý na to, aby zobrazoval spektra, proto byl k zobrazení spekter využit počítač. Detektor má čtyři funkce. První z nich je kalibrace, aby byla měření pořád stejně přesná. Ke kalibraci se využívá teflonová deska se světelnou odrazivostí vyšší než 98 %. Druhá funkce je výběr typu mléka. Třetí funkce je přímo samotné měření a zobrazování výsledků na displej a spekter v připojeném počítači a poslední funkcí je rozdělení elektrické energie, tak aby nedošlo k poškození detektoru nebo k jeho vypnutí pro nedostatek energie (Yang, et al., 2020).

K získání dat z měření bylo využito opakovaně sto dvacet vzorků ze čtyř různých mléčných farem v Číně a těchto sto dvacet vzorků bylo dále rozděleno na šarže po 40 vzorcích. Následně došlo k vyhodnocení vzorků pomocí tohoto detektoru. (Yang, et al., 2020).

Tento detektor využívající technologii NiR pracuje s přesností detekce 0,172 % pro tuk, 0,201 % pro bílkovinu a 0,247 % pro laktózu u surového mléka. Tento detektor je oproti nabízeným sice o trochu méně přesný, ale tyto odchylky jsou pouze nepatrné a je také výrazně levnější oproti ostatním detektorům na trhu nabízeným. Tento detektor vyjde zhruba na dva tisíce amerických dolarů oproti FOSS MilkoScan FT1, který stojí sto tisíc amerických dolarů nebo Bruker FT-NIR MPAII-D, který stojí padesát

tisíc dolarů. Další velkou výhodou je velikost tohoto detektoru, který je snadno přenosný. Výsledek měření můžeme mít do tří sekund od počátku měření (Yang, et al., 2020).

7 Cíle práce

Cílem bakalářské práce je zjistit, které složky mléka v něm obsažené ovlivňují jeho kvalitu a s tím spojený i zdravotní stav dojnic.

Dalším cílem bude zjistit jaká konkrétní onemocnění se projevují na kvalitě mléka a jakou složku mléka jaká nemoc ovlivňuje.

V poslední části bude uvedena technologie, které je možné využít k detekci a monitorování těchto složek v reálném čase. Zároveň budou popsány patenty z poslední doby, které se v současné době využívají.

Diskuse

V mléce je obsaženo mnoho látek a je potřeba vědět, které nemoci nebo jiné zdravotní problémy ovlivňují určité složky mléka. Mezi nejdůležitější složky v něm obsažené patří bílkovina, laktóza, tuk a počet somatických buněk. Než dojde k tomu, že chceme detekovat nějaký zdravotní problém, je také důležité znát kolik které složky má být v mléce obsaženo v případě, že je dojnice zdravá. Tyto složky mohou být ovlivněny také vnějším způsobem, ne pouze nemocemi. Například je důležité, v jaké fázi laktace se dojnice nachází, dále záleží na krmné dávce, stáří dojnice, genetických predispozicích, na plemeni dojnice, frekvenci dojení, ročním období a ustájení.

Mezi nejčastější nemoci, které ovlivňují hlavní složky patří bachorová acidóza, která snižuje obsah tuku v mléce, sušiny a bílkoviny. Další častou nemocí je alkalóza, která ovlivňuje obsah močoviny, zvyšuje se počet somatických buněk a klesá tučnost mléka zhruba o dvě procenta. Při ketóze dochází ke snížení obsahu laktózy. Dalším zdravotním problémem, který se u dojnic často vyskytuje jsou mastitidy. Subklinická mastitida se projevuje sníženou dojivostí, zvýšením počtu somatických buněk a snižuje se obsah laktózy. Klinická se projevuje zarudnutím, otokem, vyšší citlivostí daného místa a mění se konzistence mléka. Při odhalování mastitid nás zajímá především obsah močoviny, tuku a počet somatických buněk.

K detekci somatických buněk se používá NK test. Tento test se využívá u neklinické mastitidy, protože u ní nedochází ke zjevným změnám mléka. Při reakci s NK testem se ze somatických buněk vytvoří gel a čím je gel hustější tím je v mléce obsaženo více somatických buněk.

V současné době je na trhu několik přístrojů pro online detekci parametrů mléka přímo v dojárně. Tyto přístroje mají za úkol co nejpřesněji monitorovat parametry nadojeného mléka. Všechny popsané přístroje a metody mají určité výhody a nevýhody, které jsou popsány v tabulce č.1. TDM Afilab je malý kompaktní přístroj na měření parametrů nadojeného mléka, které je umístěn mezi zařízení pro měření hmotnosti nádoje a sběrnou linku mléka, má vysokou přesnost měření a další jeho nespornou výhodou je velmi nízká finanční náročnost na pořízení a následnou údržbu. Naopak jeho nevýhodou je, že neměří elektrickou vodivost a nemá žádné jiné přidání vedlejší funkce. Další technologickou možností je dojící robot Merlin od společnosti Fullwood Packo, který není primárně určen k měření parametrů mléka, ale jeho primární úkol je dojení a měření parametrů je pouze jeho přidání funkce, která je ale pro

farmáře velmi užitečná. Výhoda je také detekce mléka z každé čtvrtě, zánět může být jen v jedné čtvrti. Ke stroji je dostupná i mobilní aplikace, díky které nemusí mít farmář pořád k dispozici počítač, ale je možnost naměřené hodnoty sledovat přímo v jeho telefonu. Mezi výrazné nevýhody přístroje patří složitost zařízení, složitost přepravy a velikost.

Zcela novou metodou je měření za pomoci mikroRNA, Kravské mléko obsahuje 109 zralých mikroRNA. V nadojeném mléce se provede analýza, která ukáže, jaké mikroRNA nadojené mléko obsahuje, a to se následně porovná s mikroRNA zdravé dojnice, a poté se provede porovnání, pak se případně určí zdravotní problém, kterým dojnice trpí. Mezi hlavní výhody přenosného detektoru pro detekci složení mléka patří jeho vysoká přesnost, snadná obsluha, nízké pořizovací náklady a nízké náklady na údržbu a vyhodnocení dat, které proběhne do tří sekund od začátku měření. Tento přístroj, ale není součástí dojící linky, a tak musí farmář poskytovat detektor vzorky manuálně. Přístroj také neměří přítomnost krve a elektrickou vodivost a nemá žádné přidané funkce.

	Výhody	Nevýhody
TDM Afilab	Měří v reálném čase	Neměří elektrickou vodivost
	Kompaktní	Nemá žádné přidané funkce
	Vysoká přesnost	
	Jednoduchá obsluha	
	Nízké pořizovací náklady	
	Nízké náklady na údržbu	
Dojící robot Merlin	Vysoká přesnost	Velikost
	Více funkcí (dojení a měření)	Složitost zařízení
	Mobilní online aplikace	Složitost přepravy
	Měří elektrickou vodivost	
	Měří v reálném čase	
Testování mikroRNA	Velmi přesná metoda	Složitost procesu
		Proces je potřeba dělat manuálně
		Nutnost znalosti mikroRNA
		Nutnost přidávat činidla
Přenosný detektor	Vysoká přesnost	Není součástí dojící linky
	Nízké pořizovací náklady	Neměří přítomnost krve
	Snadná obsluha	Neměří elektrickou vodivost
	Nízké náklady na údržbu	Nemá přidané funkce
	Rychlé vyhodnocení dat (3s)	

Tabulka č. 1 – Výhody a nevýhody popsaných technologií

Závěr

Aktuálně má chovatel krav zpětnou vazbu o zdravotním stavu dojnic jedenkrát do měsíce, kdy se provádí kontrola užitkovosti. Což není praktické, protože se během této doby může u dojnice rozvinout nemoc, která nebude včas odhalena a chovatel poté přichází o zisky z mléka, a navíc musí platit dojnici léčbu.

Z důvodu zefektivnění kontroly zdravotního stavu dojnic potřebují chovatelé včasnou detekci jejich zdravotních problémů. K tomu se v dnešní době využívá NK testů, které ukazují, jestli je dojnice zdravá či nikoliv, ale už nedetekují, co má dojnice případně za problém. Navíc v případě, že má chovatel vícero dojnic, tak je značně finančně náročný, na jednu dojnici vychází zhruba na dvě stě Korun českých a chovatel potřebuje více lidí k jeho provedení.

Nejlepší online detektory, co se v současné době využívají nejsou sice přesné jako laboratorní zařízení, ale pro chovatelovi potřeby jsou dostatečně přesné a stojí zlomek ceny. Zařízení měří obsah tuku, laktózy a bílkoviny, které jsou v mléce přítomné, a to je pro vyhodnocení zdravotního stavu dojnice klíčové. Navíc toto měření probíhá v online prostředí, takže chovatel má výsledky hned a toto měření se opakuje při každém dojení. Do budoucna by bylo dobré, aby tyto přístroje uměli detekovat i krev, která by může být případně v mléce obsažena.

Záněty mléčné žlázy jsou jedním z největších problémů, kterým musí chovatel dojnic čelit. Záněty se z počátku rozvíjejí v jedné čvrti vemene, vhodné tedy je, aby přístroje měřili obsah látek v mléce obsažených pro jednotlivé čvrti, aby mohlo dojít k rychlému odhalení, která čtvrť je zánětem postižena. Touto funkcí v dnešní době disponují dojící roboti, a proto jsou tou nejlepší volbou pro chovatele dojnic k monitorování jejich zdravotního stavu.

Seznam použité literatury

- Boutinad, M. a Jammes, H. (2002). Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reproduction Nutrition Development, EDP Sciences*, 42 (2), 133-147 s.
- Gajdůšek, S. (2003). *Laktologie*. 84 s.
- Haták, J., (2008). *Nemoci zvířat.*, 59 s.
- Hrabě et al. (2006). *Technologie výroby potravin živočišného původu*, 2006, 180 s.
- Irudayaraj, J. (2008). *Nondestructive Testing of Food Quality*.
- Ježková, A. (2014). Produkce mléka a zdraví vemene dojnic. *Náš chov*, č. 2, s. 56-58. ISSN 0027-8068.
- Kadlec et al. (1988). *Výroba, nákup a zvyšování jakosti mléka*. 232 s.
- Michel, G. (1994). Anatomie der Milchdrüse. *Euter und Gesäugekrankheiten*. 17-63 s.
- Navrátilová, P. et al. (2012). *Hygiena produkce mléka*. 129 s. ISBN 978-80-7305-624-7.
- Ozaki, Y. (2007). *Near Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. 121–132 s.
- Pavelka, A. (1996). *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*, 105 s.
- Samková et al. (2012). *Mléko: produkce a kvalita*, 240 s.
- Vlková, J. et al. (2009). *Potravinářská technologie*. 168 s.

Citace webových zdrojů

Abd El – Fattah, A.M, et al. (2012). Changes in composition of colostrum of Egyptian buffaloes and Holstein cows. *BMC Vet. Res.* 8,19.

Aernouts, B. et al., (2015). Visible and near-infrared bulk optical properties of raw milk. *J. Dairy Sci.* 98, 6727–6738

Afimilk.com, (2019). *Parlor automation*. [online] [30.03.2022]. Dostupné z: <https://www.afimilk.com/parlor-automation/>

Agris.fao.org, (1998). *Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator*. [online] [5. 9. 2021]. Dostupné z: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BE1999000906>

Agropress.cz, (2017). *Mastitidy obecně*. [online] [7. 8. 2021]. Dostupné z: <https://www.agropress.cz/mastitidy/>

Agropress.cz, (2018), *Somatické buňky v mléce*. [online] [15. 7. 2021]. Dostupné z: <https://www.agropress.cz/somaticke-bunky-v-mlece/>

Ach.upol.cz, (2020), *Instrumentální metody (ACH/IM)*. [online] [5.03.2022]. Dostupné z: <https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwi-toJbt7o72AhUDO-wKHUvsAbQQFnoEC-CIQAQ&url=https%3A%2F%2Fach.upol.cz%2Fdownload%2F199&usg=AOvVaw1rMwkT4Flmo-E8gP1C5DzM>

Bezpecnostpotravin.cz, (2021), *Kasein* [online] [7. 7. 2021]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92329.aspx>

Clal.it, (2009), *TDM Afilab – Analýza mléka v reálném čase*. [online] [30.03.2022]. Dostupné z: <https://www.clal.it/en/?section=tech&on=afilab-tdm>

Dabrowska, A. et al. (2022), Broadband laser-based mid-infrared spectroscopy employing a quantum cascade detector for milk protein analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 350: 1-8.

Diaz-Olivares, J. et al. (2020), Online milk composition analysis with an on-farm near-infrared sensor. *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 178: 1-11.

Dvořák, L. et al. (2016), Blízká červená spektroskopie jako pomocník při kontrole kvality potravin. *Chemické listy*, 110: 868-873.

Fabian, H. et al. (2006), Infrared spectroscopy of proteins. [online] [4.4.2022] Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0470027320.s8201>

Forstagro.cz, (2016), *Testování mléka, Mastitida, NK test*. [online] [24. 8. 2021] Dostupné z: <https://www.forstagro.cz/dojici-zarizeni/testovani-mleka/>

Forstagro.cz, (2016). *Jednotka řídicí Afimilk*. [online] [30.03.2022]. Dostupné z: <https://www.forstagro.cz/dojici-zarizeni/afimilk/jednotka-ridici-afimilk-mpc/jednotka-ridici-afimilk-mpc.html>

Fullwoodpacko.com, (2022). *M²erlin nový přístup k robotickému dojení*. [online] [30.03.2022]. Dostupné z: <https://fullwoodpacko.com/cz/kontakt/-anchor-contact>

Harrer, A. (2017). *Quantum cascade intersubband devices for mid-infrared sensing*. [online] [5.4.2022] Dostupné z: <http://www.ub.tu.wien.ac.at> <http://www.ub.tu.wien.ac.at/eng>

Heraltová, V. (2010). *Vliv výživy dojnic na kvalitu mléka*. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická

Huda, M. et al. (2021). Use of near and mid infra-red spectroscopy for analysis of protein, fat, lactose and total solids in raw cow and camel milk. *Food chemistry*, vol. 334:1-7.

Ing. Dohnal, J. (2011). *Vztah mezi měrnou vodivostí mléka a počtem somatických buněk u dojnic při použití robotizovaného dojení*. Disertační práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

Kawasaki, M. et al. (2004). Milk-quality monitoring by near-infrared spectroscopy for artificial intelligence in dairy farming. [online] Science direct [4. 6. 2021] Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474667017386846>

Lovasová, R. (2017). *Somatické buňky v mléce a jejich vliv na technologické vlastnosti mléka*. Bakalářská práce, Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta.

Mendelu.cz, (2021). *Zpracování mléka*. [online] [10. 7. 2021]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1685&typ=html

Metrohm, (2020). *Rychlejší kontrola kvality při nižších provozních nákladech pomocí spektroskopie blízké infračervené oblasti*. [online] [3.03.2022]. Dostupné z: <https://www.metrohm.com/cs-cz/produkty/spektroskopie/1-nirs-near-infrared-spectroscopy/>

Mikrobiologie.lf3.cuni.cz, (2005). *Půdy*. [online] [20. 10. 2021]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/pudy/pudy.htm>

Mlieko.sk, (2021). Zloženie mlieka. [online] [17. 6. 2021]. Dostupné z: <https://mlieko.sk/zlozenie-mlieka/>

Nováková, Š. (2017). *Stanovení počtu somatických buněk v mléce pomocí FT-NIR spektrometrie*. Bakalářská práce, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie.

Op.europa.eu. (1992). *Směrnice Rady 92/46/EHS ze dne 16. června 1992 o hygienických předpisech pro produkci syrového mléka, tepelně ošetřeného mléka a mléčných výrobků a jejich uvedení na trh*. [online] [30. 7. 2021]. Dostupné z: <https://op.europa.eu/cs/publication-detail/-/publication/8cec900b-5284-4d1e-a83d-9fe4bd13bcba/language-cs>

Otrubová, M. (2020). Jersey. [online] Agropress.cz [22.03.2022]. Dostupné z: <https://www.agropress.cz/jersey/>

Patentimages.storage.googleapis.com (2016). *Markers, biochips and kits for milk quality detection*. [online] [6.03.2022]. Dostupné z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/37/1d/99/036b404046be82/US9428808.pdf>

Pláničková, J. (2012). *Mikrobiologie syrového mléka a po ošetření*. Bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

Slavíková, B. (2015). *Vliv intravitálních vlivů na kvalitu mléka*. Bakalářská práce, Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta.

Šopíková, M. (2017). *Elektrické vlastnosti mléka a mléčných výrobků a možnosti jejich využití*. Bakalářská práce, Univerzita Tomáš Bati ve Zlíně, Fakulta Technologická

Vfu.cz, (2019). *Onemocnění mléčné žlázy – skot*. [online] [15. 8. 2021]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/nz/NHZ/on.ml.zl.skot.html>

Vovcr.cz, (2020). *Somatické buňky v mléce*. [online] [8. 8. 2021]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/tech/299/page03.html>

Yang, B. et al. (2020). A portable detector on main compositions of raw and homogenized milk. *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 177: 1-9.

Zakonyprolidi.cz, (2020). Vyhláška o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. [online] [20. 6. 2021]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2019-274?text=397%2F2016>

Seznam obrázků

Obrázek 1.1: Obsah látek v jednom litru kravského mléka (Mlieko.sk)	11
Obrázek 1.2: Druhy somatických buněk pocházejících z krve (Nováková, Š.).....	13
Obrázek 1.3: Maximální počet somatických buněk obsažených v mléce, přípustných ve vybraných zemích (Nováková, Š.).....	14
Obrázek 2.1: Frekvence bakterií způsobujících mastitidu (Ing. Dohnal, J.).....	20
Obrázek 3.1: Krevní agar s několika koloniemi (Mikrobiologie.lf3.cuni.cz).....	24
Obrázek 4.1: NK test (Agropress.cz).....	27
Obrázek 4.2: Transmitance a reflektance (Chemické listy, 2016).....	32
Obrázek 4.3: Pozorovatelnost jednotlivých složek mléka při různých vlnových (Food chemistry, 2021).....	32
Obrázek 4.4: Zobrazení konceptu senzorového systému (Computers and Electronics in Agriculture, 2020).....	33

Seznam vzorců

Vzorec č. 1: Počet mikroorganismů v daném vzorku (Pláničková, 2012).....	25
Vzorec č. 2: Metoda rozdílová (Agris.Fao.org, 1998).....	30
Vzorec č. 3: Metoda podílová (Agris.Fao.org, 1998).....	30

Seznam tabulek

Tabulka č. 1 – Výhody a nevýhody popsaných technologií.....	43
---	----