

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



Bioaktivní látky v mléce přežvýkavců a metody jejich stanovení

Bakalářská práce

Autor práce: Marie Pettíková

Vedoucí práce: Ing. Veronika Legarová, Ph.D.

© 2013 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Bioaktivní látky v mléce přežvýkavců a metody jejich stanovení jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Veronice Legarové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, trpělivost a věcné připomínky, které mi poskytla při zpracování této bakalářské práce. Rovněž bych ráda poděkovala mé babičce Marii Sivákové za gramatickou korekci textu a rodině za podporu během mého studia.

Bioaktivní látky v mléce přežvýkavců a metody jejich stanovení

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá porovnáním základních bioaktivních látek v mléce různých druhů přežvýkavců, významem mléka v lidské výživě a účinkem bioaktivních látek na lidský organismus. Mezi významné bioaktivní látky mléka patří laktóza, mléčný tuk a bílkoviny. Mléko je také dobrým zdrojem vitamínů skupiny B₁₂ a B₂. Mléčný tuk se vyznačuje vysokým obsahem esenciálních mastných kyselin. Mléko obsahuje méně vhodný poměr mezi nasycenými a nenasycenými kyselinami (13:1), který může zvyšovat riziko aterosklerózy. Obsah hlavních živin v mléce lze technologicky upravit, proto se celosvětově doporučuje konzumace mléčných potravin se sníženým obsahem tuku. Vysoký obsah tuku má např. sobí mléko. Mléka přežvýkavců obsahují dvě skupiny bílkovin, kterými jsou kaseinové a syrovátkové bílkoviny. Surovátkové bílkoviny jsou pro lidský organismus nutričně významnější díky své vyšší stravitelnosti v porovnání s kaseinovými bílkovinami. Toto je dáno obsahem esenciálních aminokyselin s rozvětveným řetězcem, jako jsou valin, leucin a izoleucin. Buvolí mléko se vyznačuje vysokým obsahem bílkovin. Specifickou slabě nasládlou chuť dodává mléku laktóza, štěpí se na glukózu a galaktózu, která je specifickou složkou mléka. Vysoké procento laktózy obsahuje velbloudí mléko. Laktózová intolerance je metabolické onemocnění, kdy je snížena nebo zcela chybí produkce enzymu laktázy, který štěpí laktózu na glukózu a galaktózu v tenkém střevě.

Druhá část práce je zaměřena na vybrané metody stanovení hlavních bioaktivních látek v mléce. Výrobky se mohou obohacovat o vyextrahované bioaktivní látky z mléka a tak zvýšit jejich biologickou hodnotu. Mezi moderní instrumentální metody stanovení bílkovin mléka patří často využívaná automatizovaná metoda podle Kjeldahla s využitím přístrojů Kjeltec, Büchi nebo KjehlFoss. Pomocí vysokokapalinové chromatografie (HPLC) můžeme provést stanovení téměř všech složek mléka. Tato práce se zabývá využitím HPLC u stanovení sacharidů a nukleotidů. V práci jsou uvedeny i další možné metody stanovení vybraných bioaktivních látek.

Klíčová slova: bioaktivní látky, metody stanovení, mléko, přežvýkavci

Bioactive compounds of ruminant milk and methods of their determination

Summary

This bachelor's thesis study a comparison of basic bioactive substances in milk of different ruminant species, the importance of milk in human nutrition and the effect of bioactive substances on the human organism. Among the major bioactive substances include lactose, milk fat and protein. Milk is also a good source of vitamins B₁₂ a B₂. Milk fat has a high content of essential fatty acid. Milk contains less suitable proportion between saturated and unsaturated acids (13:1), which may increase the risk of atherosclerosis. The content of nutrients in milk can be technologically edit, therefore recommended worldwide consumption of dairy foods with reduced fat. The high fat content of the reindeer milk. Milk of ruminants contains two groups of proteins which are casein and whey protein. Whey proteins are for the human nutritionally importance, because of it higher digestibility compared to casein protein. This is a balanced content of essential amino acids with branched chain, such as valine, leucine and isoleucine. Buffalo milk is high in protein. Specific slightly sweet flavor aids milk lactose is broken down into glucose and galaktose, which is a specific component of milk. A high percentage of lactose has camel milk. Lactose intolerance is a metabolic disease, which is reduced or absent production of the enzyme lactase, which breaks down the lactose into glucose and galaktose in a small intestine, practically in colon.

The second part focuses on the selected determination of major bioactive substances in milk. Products can be obtained by extraction with the addition of bioactive substances from the milk and increase their biological value. Among modern instrumental methods for the determination of milk protein are often used automated Kjeldahl methods using a standing position Kjeltex, Büchi or KjehlFoss. Using high-performance liquid chromatography (HPLC) can make the determination of almost all milk constituents. This work deals with the use of HPLC for determination of sugars and nucleotides. This work also describes other possible methods for the determination of selected bioactive substances.

Keywords: milk, ruminants, bioactive compounds, methods of determining

Obsah

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Úvod..... | 7 |
| 2 | Cíl práce..... | 8 |
| 3 | Literární rešerše | 9 |
| 3.1 | Mléko | 9 |
| 3.1.1 | Význam mléka v lidské výživě..... | 9 |
| 3.1.2 | Druhy mléka | 9 |
| 3.1.3 | Složení mléka..... | 10 |
| 3.1.4 | Produkce mléka v České republice..... | 10 |
| 3.1.5 | Hlavní bioaktivní látky v mléce..... | 11 |
| 3.1.5.1 | Bílkoviny mléka..... | 13 |
| 3.1.5.2 | Mléčný tuk | 18 |
| 3.1.5.3 | Sacharidy | 19 |
| 3.1.5.4 | Biokatalyzátory | 20 |
| 3.1.5.5 | Antioxidační faktory | 27 |
| 3.1.5.6 | Hormony | 28 |
| 3.1.5.7 | Nukleotidy | 28 |
| 3.1.6 | Charakteristika mlék vybraných druhů přežvýkavců | 28 |
| 3.1.6.1 | Kravske mléko | 28 |
| 3.1.6.2 | Kozí mléko..... | 29 |
| 3.1.6.3 | Ovčí mléko..... | 30 |
| 3.1.6.4 | Buvolí mléko..... | 31 |
| 3.1.6.5 | Velbloudí mléko | 32 |
| 3.1.6.6 | Zebuové mléko | 33 |
| 3.1.6.7 | Sobí mléko | 33 |
| 3.1.7 | Zdravotní problémy spojené s konzumací mléka | 34 |
| 3.2 | Hlavní metody vybraných bioaktivních látek v mléce | 35 |
| 3.2.1 | Stanovení obsahu bílkovin..... | 35 |
| 3.2.2 | Stanovení obsahu sacharidů..... | 38 |
| 3.2.3 | Izolace a analýza vybraných antioxidačních faktorů mléka | 39 |
| 3.2.4 | Stanovení vápníku v mléce | 40 |
| 3.2.5 | Izolace a analýza nukleotidů v mléce | 42 |
| 4 | Závěr | 43 |
| 5 | Seznam literatury | 44 |
| 6 | Seznam použitých zkratk a symbolů..... | 49 |

1 Úvod

V České republice má chov dojnic velkou tradici, v menší míře se na produkci mléka chovají kozy a ovce. V posledních letech se u nás zvýšila spotřeba kozího mléka a to především díky jeho pozitivním vlastnostem jako je velmi dobrá stravitelnost, která je dána rozměry a rozložením tukových kuliček v mléce. Tuk kozího mléka je rozptýlen v malých kuličkách a velice se podobá tuku v mateřském mléce. Dalším druhem mléka, které je u nás produkováno a s kterým se můžeme běžně setkat, je ovčí mléko, které se vyznačuje vysokým obsahem vitamínů a minerálních látek. Celosvětově největší spotřebu zaujímá mléko kravské, které je pro většinu obyvatelstva významným zdrojem laktózy, mléčného tuku a bílkovin. Mléko je dobrým zdrojem vápníku, který je nezbytný pro správný růst lidského organismu. Bioaktivní látky obsažené v mléce jsou pro člověka přínosem i v malých koncentracích a hrají roli v mnoha metabolických přeměnách. Pro určení základních složek v mléce se využívá různých metod stanovení. Část práce je zaměřena na hlavní metody vybraných bioaktivních látek v mléce.

2 **Cíl práce**

Cílem bakalářské práce je vypracování přehledné literární rešerše zaměřené na problematiku bioaktivních látek vyskytujících se v mléce různých druhů přežvýkavců a porovnání složení z hlediska majoritních i minoritních složek mléka a jejich vliv na zdraví konzumentů. Jsou zde uvedeny i zdravotní komplikace, které může mléko u některých osob po požití způsobit. Na konci práce je stručný přehled metod stanovení vybraných bioaktivních látek.

3 Literární řešerše

3.1 Mléko

Mléko je produkt sekrece mléčné žlázy samic savců. Je základním zdrojem výživy pro mláďata, která v prvotních dnech života přijímají mlezivo a získávají tak potřebné protilátky a vitaminy k upevnění imunity (Park, 2009). Mléko a mléčné výrobky jsou součástí potravy člověka již několik tisíc let. Na jakost mléka má veliký vliv celá řada faktorů, zejména ustájení na pastvě, ve stáji, krmení, dojení i ošetřování mléka a následné technologické zpracování (Gajdůšek, 2003).

3.1.1 Význam mléka v lidské výživě

Mléko je nejdokonalejší a nejpřirozenější potravina s kterou se novorozenec setká bezprostředně po narození. Je důležitou součástí jídelníčku všech obyvatel. Denní spotřeba vápníku pro kosti je cca 900 mg, pro těhotné ženy až 1500 mg. Průměrný obsah ve 100 g mléka je 120 mg Ca. Tuto denní potřebu lze pokrýt 0,5 - 0,8 l mléka nebo 50 g sýra (Kopáček, 2009). Mléko obsahuje mnoho sloučenin potřebných pro správnou funkci našeho organismu, které chrání novorozence a dospělé proti patogenům a nemocem. Mezi tyto biologicky aktivní látky patří imunoglobuliny, antibakteriální peptidy, antimikrobiální proteiny, oligosacharidy, lipidy, a mnoho dalších komponent (Park, 2009). Během posledních desetiletí se spotřeba mléka snížila zejména v západní společnosti. Snížená spotřeba mléka a mléčných výrobků může být částečně vysvětlena spekulacemi o jejich negativních vlivech na lidské zdraví. Tato kritika vznikla především proto, že mléčný tuk obsahuje nasycené mastné kyseliny, které přispívají k srdečním onemocněním a obezitě (Haug et.al, 2007). Na druhou stranu mléko obsahuje nenasycenou kyselinu linolovou, která se vyznačuje příznivými účinky pro lidský organismus a hraje nezastupitelnou roli v lidské stravě (Park, 2009).

3.1.2 Druhy mléka

Podle zastoupení hlavních druhů bílkovin se rozeznávají mléka kaseinová a mléka albuminová. Mléka kaseinová jsou typická pro přežvýkavce, kdy obsah kaseinu zaujímá více jak 75 % obsahu celkových bílkovin mléka. Do této skupiny patří např. mléko kravské, ovčí, kozí a další. Mléka albuminová produkují masožravci, všežravci a býložravci s jednoduchým

žaludkem. Jedná se o mléka např. kobyli, oslí, prasečí a mateřské. Dle průběhu laktace se dělí mléka na zralá a nezralá. Mezi mléka nezralá se řadí mlezivo (kolostrum), mléko starodojné a mléko aberantní. Mléka zralá se využívají pro lidskou výživu a jsou produkována šest dní po otelení dojnice (Gajdůšek, 2003).

3.1.3 Složení mléka

Mléko je složitý biologický systém, ve kterém se jednotlivé složky nacházejí v různém poměru (Gajdůšek, 2003). Hlavní složkou mléka je voda, která tvoří největší část mléka a následně sušina, která zahrnuje laktózu, bílkoviny mléka, mléčný tuk, minerální látky a nebílkovinné dusíkaté látky (Zadrazil, 2002). Hlavní složky mléka jsou uvedeny v Tabulce č. 1. Bílkoviny, sacharidy a tuky se podílejí na úhradě energetických potřeb lidského organismu a jsou tzv. stavebními látkami. Minerální látky a vitaminy se nepodílejí na úhradě energetických potřeb organismu a jsou tzv. esenciálními složkami potravy (Drbohlav a Vodičková, 2001).

Tabulka č. 1: Složení mléka

| | | |
|---------------------|--------------------------------|----------------|
| obsah vody | | cca 87,25 % |
| obsah sušiny | | cca 12,75 % |
| z toho: | obsah laktózy | 4,60 - 4,90 % |
| | obsah bílkovin mléka | 2,80 - 3,60 % |
| | obsah mléčného tuku | 3,20 - 6,00 % |
| | obsah minerálních látek | 0,80 - 1,10 % |
| | obsah nebílk. dusíku | 0,015 - 0,029% |

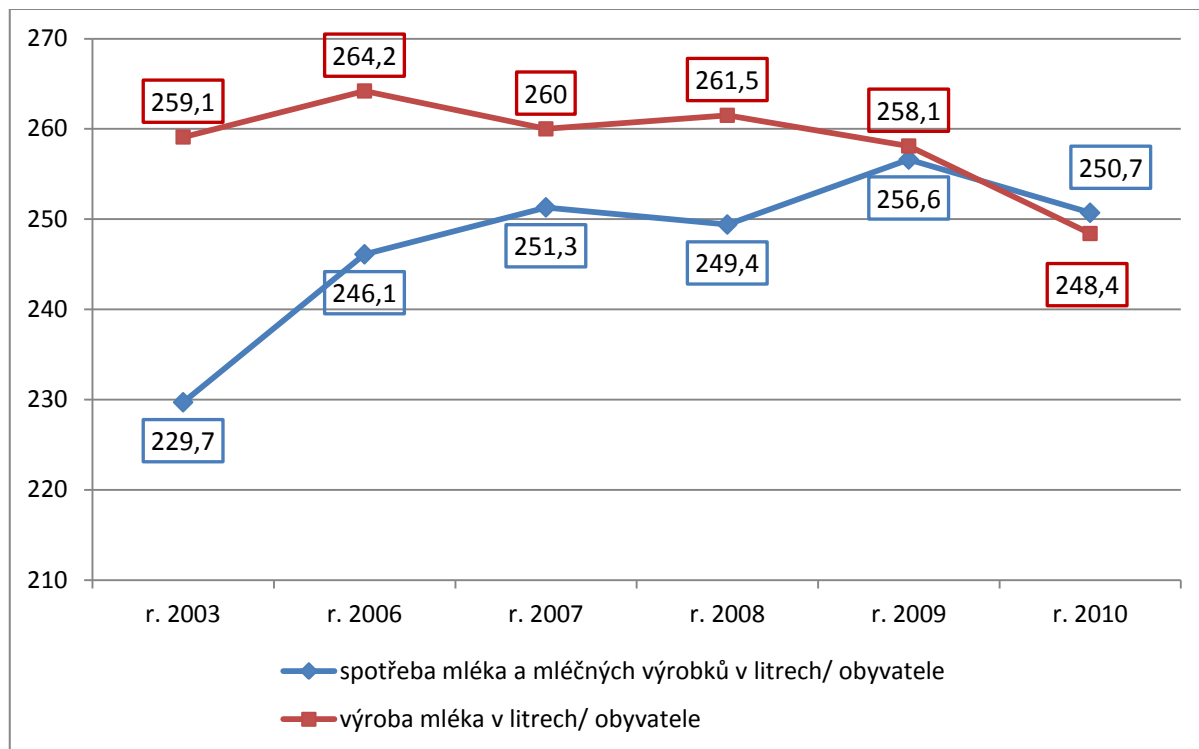
(Zadrazil, 2002)

3.1.4 Produkce mléka v České republice

Následující Obrázek č. 1 vyjadřuje vývoj vyprodukovaného a spotřebovaného mléka v České republice v letech 2003 až 2010. V roce 2010 ČR nebyla schopna vyprodukovat dostatečné množství mléka v porovnání s jeho spotřebou na osobu. Výroba mléka roku 2010 dosáhla přibližně 248,4 l na osobu, ale průměrná spotřeba mléka činí 250,7 l na osobu, což je o 2,3 l

více. Domácí výroba nedokáže naplnit poptávku. Česká republika ztratila v posledních letech soběstačnost u řady komodit živočišného původu (Zemědělský svaz ČR, 2009).

Obrázek č. 1: Produkce a spotřeba mléka v České republice v letech 2003 až 2010



(Zemědělský svaz ČR, 2009)

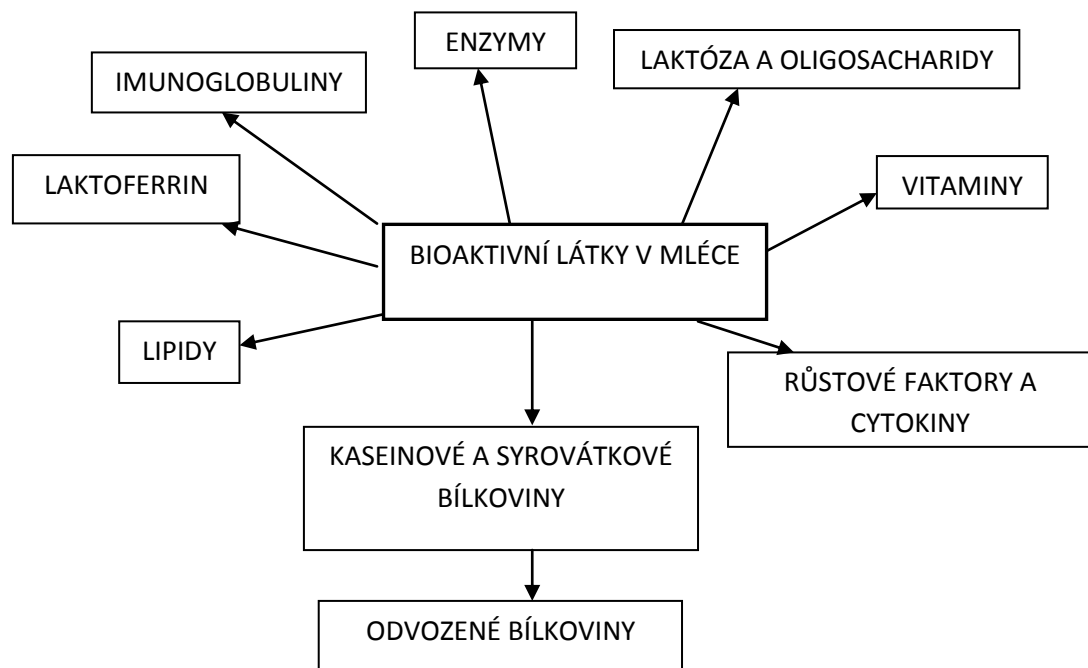
3.1.5 Hlavní bioaktivní látky v mléce

Bioaktivní látky se většinou vyskytují v potravinách v malém množství. Bioaktivní látky jsou intenzivně studovány a na základě nových objevů jsou vyhodnocovány jejich účinky na lidské zdraví. Bioaktivní látky jsou studovány také v obilovinách, luštěninách, ořeších, olivovém oleji, zelenině, ovoci a čaji. (Kris-Etherton et al., 2002). Přehled bioaktivních látek v mléce je uveden na Obrázku č. 2.

Civilizační onemocnění se v posledních letech staly pro lidskou populaci velkou hrozbou. Aby jim lidé mohli předcházet, byl odhalen nový postoj, jak zkvalitnit lidskou výživu a zdraví. Na základě těchto poznatků byly vyvinuty tzv. funkční potraviny. Potraviny, které nám kromě základní nutriční hodnoty poskytují i konkrétní účinky na lidské zdraví (Park, 2009). Bioaktivní látky zvyšují imunitní systém, snižují zvýšený krevní tlak, působí proti gastrointestinálním infekcím, pomáhají proti obezitě a působí preventivně proti osteoporóze

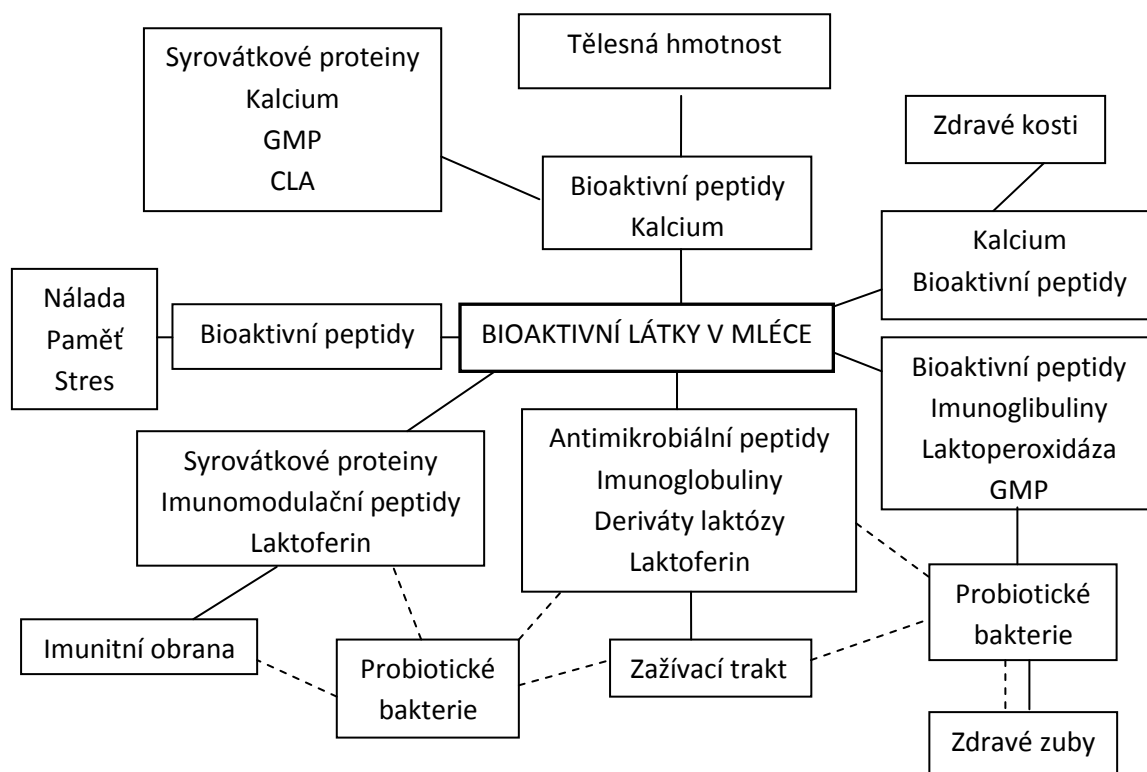
(FitzGerald et al., 2004). Také byly potvrzeny důkazy, že mléko snižuje metabolické syndromy, které mohou vést k různým chronickým chorobám např. kardiovaskulární onemocnění a diabetes (Mensink, 2006). Mezi bioaktivní složky mléka řadíme specifické proteiny, peptidy, lipidy a sacharidy. Kravské mléko a mlezivo je považováno za nejdůležitější zdroj přírodních bioaktivních látek pro lidský organismus. V současné době je mnoho těchto bioaktivních látek aplikováno do potravin bez mléka a dokonce i farmaceutického průmyslu (Park, 2009). V Obrázku č. 3 jsou uvedeny aplikace bioaktivních látek pro zdraví člověka.

Obrázek č. 2: Přehled bioaktivních látek v mléce



(Park, 2009)

Obr. č. 3: Aplikace bioaktivních látek pro zdraví



(Park, 2009)

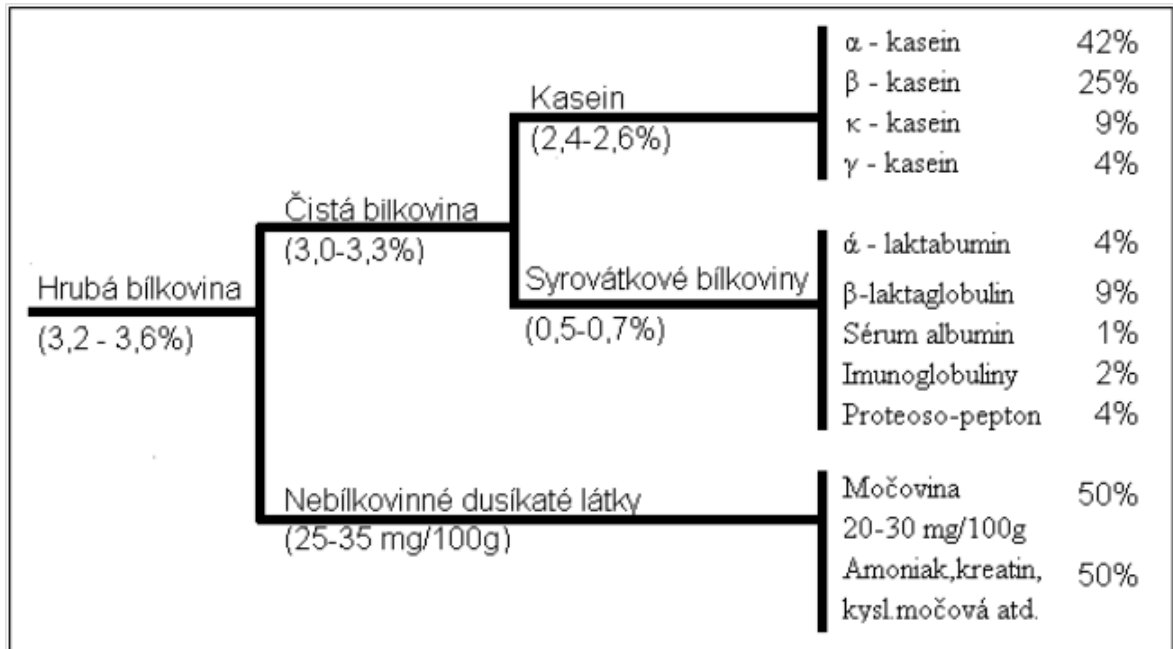
3.1.5.1 Bílkoviny mléka

Bílkoviny patří mezi dusíkaté látky, které tvoří komplexní složky mléka. Vzhledem k nutričním a technologickým vlastnostem je jejich studiu věnována největší pozornost. Mezi dusíkaté látky patří bílkoviny a nebílkovinné dusíkaté látky (Ingr, 2003). Rozdělení hlavních bílkovin mléka je uvedeno v Obrázku č. 4.

Mléko obsahuje dvě skupiny bílkovin. Bílkoviny kaseinové a bílkoviny syrovátkové, které se liší svými biologickými účinky. Kasein je hlavní a specifickou složkou bílkovin mléka, s kterou se jinde neseznamujeme. Syrovátkové bílkoviny jsou bílkoviny, které zůstávají v roztoku po vysrážení kaseinu kyselinou či syřidlem (Gajdušek, 2003). Nebílkovinné dusíkaté látky

zůstávají v roztocích po vysrážení bílkovin mléka. Mají rozdílnou strukturu i význam oproti kaseinovým a syrovátkovým bílkovinám (Zadražil, 2002).

Obrázek č. 4: Přehled hrubých (celkových) bílkovin mléka



(Ingr, 2003)

Kaseinové bílkoviny

Kaseiny jsou hlavní komplexy fosfoproteinů mléka syntetizované mléčnou žlázou dojnice a tvořící v mléce přežvýkavců převážnou část bílkovin. Mezi základní frakce kaseinů patří α-kasein, β-kasein a κ-kasein. Kaseiny jsou v mléce vázány na vápník. Vápenaté soli se z mléka vysráží např. pomocí etanolu. Volný kasein se uvolní okyselením při pH=4,6 a teplotě okolo 20 °C. Kaseinové frakce jsou velice citlivé na přítomnost vápníku mimo κ-kasein. Většina kaseinových frakcí je v mléce vázána do velkých koloidních útvarů, které se označují jako kaseinová micela (Gajdušek, 2003). Kaseinové bílkoviny řadíme mezi antimikrobiální peptidy mléka. Poprvé antimikrobiální vlastnosti peptidů objevili Jones a Simms roku 1930, kteří identifikovali látku, která může inhibovat růst streptokoků. Nazvali tuto látku laktenin (Exposito a Recio, 2006).

Syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové bílkoviny jsou globulární struktury a v mléce se vyskytují ve formě koloidního roztoku. Bílkoviny syrovátky zůstávají v roztoku po vysrážení kaseinu při pH=4,6. Jejich nutriční hodnota je vyšší v porovnání s kaseinem. Jsou termolabilní a při teplotách 60 - 70 °C denaturují. Mezi základní bílkoviny mléčné syrovátky patří α -laktalbumin, β -laktoglobulin, imunoglobuliny, bovinní sérový albumin a proteosopeptonové frakce. Hlavní sérovou bílkovinou dle obsahu syrovátkových bílkovin v mléce je β -laktoglobulin, který tvoří cca 50 % a α -laktalbumin přibližně 25 %. Jeho obsah je však vyšší u albuminových mlék produkovaných monogastry (Zadrazil, 2002).

Imunoglobuliny

Imunoglobuliny nesou biologickou funkci a protilátky, které jsou přítomny v kolostru všech druhů s probíhající laktací a poskytují pasivní imunitu proti patogenům. Jsou rozděleny do různých tříd na základě jejich fyzikálně-chemických struktur a biologické aktivity. Hlavními imunoglobuliny jsou IgG, IgM, IgA a IgE (Park, 2009). Vzhledem k extrémní heterogenitě se průkazně liší od ostatních bílkovin mléčného séra (Zadrazil, 2002). Imunoglobuliny jsou schopné zabránit přilnavosti mikrobů, inhibují bakteriální metabolismus, aglutinují bakterie a neutralizují toxiny a viry. Koncentrace specifických protilátek proti patogenním mikroorganismům mohou být zvýšeny v kolostru a v mléce očkované dojnice s vakcínami z jejich patogenů nebo antigenů. Kolostrum obsahuje až 20krát více IgG1 oproti IgG2. Při přechodu kolostra na zralé mléko je hladina IgG1 až 4-7krát vyšší, než IgG2. Pokud je množství IgG2 zvýšeno, jedná se o počátek zánětu mléčné žlázy. Díky pokroku bioseparačních technik je možné oddělit a obohatit tyto protilátky a vyvinout tak tzv. imunní mléčné přípravky. Pojem „imunní mléko“ se datuje již v roce 1950, kdy Petersen a Campbell jako první navrhli, aby bylo kolostrum podáváno ústně. Zjistili, že může pro člověka poskytovat pasivní imunitní ochranu. Od roku 1980 velký počet studií prokázal, že imunní mléčné přípravky mohou být účinné v prevenci lidských a živočišných chorob způsobených různými patogenními mikroby jako rotaviry, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Clostridium difficile*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus mutant*, *Cryptosporidium parvum* a *Helicobacter pylori*. Léčebná účinnost těchto přípravků se však ukázala být velmi omezená. Kolostrum neboli mlezivo je stále výzvou pro budoucí výzkum (Park, 2009).

α -laktalbumin

α -laktalbumin (α -La) tvoří přibližně 20 % syrovátkových proteinů v kravském mléce a je po β -laktoglobulinu druhou nejvíce zastoupenou syrovátkovou bílkovinou mléka (Park, 2009). α -La je plně syntetizován v mléčné žláze, kde působí jako koenzym pro biosyntézu laktózy. Mléka všežravců, masožravců a býložravců s jednoduchým žaludkem obsahují mnohem více α -La, proto jsou označována jako mléka albuminová (Zadrazil, 2002). Přínosy pro zdraví nebyly dlouho známé, ale nedávný výzkum naznačuje, že tento protein může poskytnout příznivé účinky přes:

- celé neporušené molekuly,
- peptidy z částečně hydrolyzovatelných bílkovin,
- aminokyseliny z plně stravitelných proteinů (Park, 2009).

α -La je výborným zdrojem esenciálních aminokyselin tryptofanu a cysteinu, které jsou prekurzory serotoninu a glutathionu. Uvažuje se, že perorální podávání by mohlo pomoci lépe zvládat stresové situace. Klinické studie ukázaly, že u skupiny lidí náchylných k stresu, kteří přijímali stravu obohacenou o α -La se snížily depresivní stavy. Rovněž bylo studiem na ženách prokázáno, že podávání 40 g α -La denně zvyšuje u zdravých žen plasmatické hladiny tryptofanu a jeho poměr k neutrálním aminokyselinám bez jakýchkoli emocionálních změn. Byly také provedeny pokusy na zvířatech a prokázalo se, že α -La poskytuje ochranu žaludeční sliznici. Tato ochrana byla srovnatelná s léky proti vředům. Kravské α -La hydrolyzáty a specifické peptidy odvozené od těchto hydrolyzátů jsou spojeny s mnohými aktivitami např. antihypertenzní, antimikrobiální, antikarcinogenní, imunomodulační a nebiotickou aktivitou. Na základě vysoké homologie mezi lidským a kravským α -La a jeho hydrolyzátů se α -La hodí do kojenecké výživy. Několik obohacených kojeneckých výživ α -La již bylo uvedeno na trh (Park, 2009).

β -laktoglobulin

β -laktoglobulin (β -Lg) je hlavní syrovátkový protein v kravském mléce a tvoří přibližně 50 % bílkovin v syrovátce. β -laktoglobulin má řadu funkčních a nutričních vlastností, díky kterým je tento protein multifunkční přísadou pro mnohé potraviny a biochemické aplikace. Mimo jiné je β -Lg vynikajícím zdrojem peptidů s širokou škálou bioaktivity např. má antihypertenzní, antimikrobiální, antioxidantivní, protirakovinné, imunomodulační,

hypocholesterolemické a další metabolické účinky (Park, 2009). Vysoký obsah β -Lg je v nezralém mléce (kolostru), dosahuje až 8 % z celkových bílkovin, zatímco ve zralém mléce jeho podíl z celkových bílkovin klesá na 0,1 - 0,3 % (Zadrazil, 2002). Je vynikající alternativou k vaječnému albuminu (bítku), který se dá aplikovat do potravin (Foegeding, et al., 2006).

Laktoferin

Laktoferin (LF) je glykoprotein, který se nalézá v kolostru, mléku, a dalších tělesných sekretech a buňkách většiny druhů savců. Je považován za důležitou obranyschopnou molekulu a je známo, že má mnoho biologických aktivit jako jsou antimikrobiální, protizánětlivé, protinádorové, antioxidantní a imunitní regulační vlastnosti. Antimikrobiální aktivita je přičítána mnoha mechanismům. Jeden z nich je, že LF odebírá bakteriím železo, které následně odevzdává červeným krvinkám a tím zabraňuje množení bakterií. Aktivita LF a jeho derivátů byla prokázána proti široké škále patogenních mikroorganismů, včetně enteropatogenní *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Candida albicans*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus enteritis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae*, virů hepatitidy C, G a B, HIV-1, rotavirů nebo herpes simplex virů (Park, 2009).

Organizace EFSA vyhodnotila laktoferin z kravského mléka jako bezpečnou složku potravin. Podle stanoviska EFSA zveřejněného dne 24. 5. 2012 může být laktoferin uznán jako složka nového typu do potravin. Může být přidávána v izolované a purifikované formě do počáteční i pokračovací kojenecké výživy, potravin pro zvláštní výživové účely, potravin pro sportovce a dále do nealkoholických nápojů, pečiva, sýrových výrobků, mléka a sladkostí.

Glykomakropeptid

Glykomakropeptid (GMP) stimuluje uvolňování cholecystokininu (hormon slinivky břišní, podílející se na příjmu potravy a trávení zvířat a lidí) do duodena. Potlačuje žaludeční sekreci a zpomaluje mobilitu žaludku. Dalším zajímavým zjištěním je, že GMP může být neporušeně absorbován a natráven do krevního oběhu dospělých lidí po požití mléka nebo jogurtu. Bylo prokázáno, že podporuje růst bifidobakterií a tím podporuje střevní mikroflóru. GMP je

přítomen ve sladké syrovátce po štěpení κ -kaseinu. GMP nemá ve svém složení přítomnu aminokyselinu fenylalanin, proto je vhodný ve výživě v případě onemocnění fenylketonurií. Modelové studie na zvířatech dokazují, že glykomakropeptid může mít příznivé účinky pro vývoj mozku a podporovat paměť (Park, 2009).

3.1.5.2 Mléčný tuk

Mléčný tuk se skládá z více než 400 mastných kyselin s různým chemickým složením. Většina těchto mastných kyselin je esterifikována na glycerol a v mléčném tuku se objevují převážně v podobě triacylglycerolů. Mléčný tuk je nejbohatším přírodním zdrojem konjugované kyseliny linolové (CLA), která tvoří 2 - 53,7 mg mléčného tuku. Široká škála hodnot CLA lze přičíst různým faktorům jako je například režim krmení, uchování píce, geografickým regionům, tak i plemenu krav. Mnoho studií potvrdilo, že krmení na pastvě může významně zvýšit koncentraci CLA v mléce, ve srovnání s halovým krmením. Další studie prokázaly, že krmení pro dojnice obsahující rostlinné nebo mořské oleje může účinně zvýšit obsah CLA v mléce. Bohatým zdrojem kyseliny linolové je olej řepkový, sojový a slunečnicový. Tyto rostlinné oleje jsou bohatším zdrojem kyseliny linolové, než další polynenasycené rostlinné oleje, jako jsou např. olej arašídový nebo lněný. Nejúčinnějším zdrojem kyseliny linolové se zdá být kombinace dietního rybího oleje s olejem rostlinným. Mezi pozitivní účinky CLA patří: účinky proti onemocnění cév vlivem cholesterolu, antidiabetický účinek, účinek proti obezitě a posílení imunitního systému. Optimální příjem kyseliny linolové v potravě člověka je třeba určit, ale byl navržen denní příjem 3 – 3,5 g CLA, který by měl vést k antikarcinogenním účinkům. Studie na zvířatech ukázala, že CLA podporuje snižování tělesné hmotnosti a tukové hmoty, a také zvyšuje tělesnou aktivitu. Jiné kohortní studie navrhy, že vyšší příjem CLA v mléčných výrobcích může snížit riziko rakoviny tlustého střeva (Park, 2009). Obsah tuku v mléce jednotlivých druhů přežvýkavců je uveden v Tabulce č. 9.

Další biologicky zajímavou skupinou lipidů mléčného tuku jsou polární lipidy. Polární lipidy jsou umístěny především v membráně tukové globule mléčného tuku a jsou velmi složité biologické struktury. Membrána polárních lipidů se skládá přibližně z 60 % bílkovin a 40 % tuků, které jsou převážně složené z triacylglycerolů, cholesterolu, fosfolipidů a sfingolipidů. Zájem o polární lipidy v mléce se zvyšuje vzhledem k jejich nutričním a technologickým vlastnostem. Mléčný tuk hraje velkou roli v přenosu neuronových signálů a je prospěšný při

krevní srážlivosti, imunitě a zánětlivých reakcích organismu. Za vysoce bioaktivní složky mléka jsou považovány zejména sfingosiny a jejich deriváty mající protinádorové účinky, mikrobiální účinky a účinky v podobě snížení cholesterolu (Park, 2009).

3.1.5.3 Sacharidy

Laktóza

Laktóza je nejdůležitějším zástupcem sacharidů v mléce a je přítomna v mléce všech druhů savců v rozdílném množství. Disacharid laktóza je tvořen z glukózy a galaktózy, která je specifickou složkou mléka. Laktóza je tvořena v mléčné žláze z glukózy. Mléčný cukr dodává mléku nasládlou chuť a působí s ostatními složkami mléka osmotický tlak (Gajdůšek, 2003). Laktózu lze snadno oddělit od mléka nebo syrovátky ve více či méně čisté podobě a následně se používá jako přísada do krmiv, potravin a farmaceutických přípravků (Schaafsma, 2002). Koncentrace laktózy různých druhů zvířat je uvedena v Tabulce č. 2. Mateřské mléko má nejvyšší obsah laktózy (přibližně 7 g/100 ml) a koncentrace kravského mléka je poměrně nižší (přibližně 4,6 g/100 ml). V kysaném mléce např. jogurtu či podmáslí je obsah laktózy nižší díky přeměně laktózy bakteriemi mléčného kvašení (Schaafsma, 2008).

Ostatní sacharidy

V mléce jsou v nižších koncentracích obsaženy i další cukry např. aminocukry, které jsou nepostradatelným růstovým faktorem pro růst mikroorganismů *Bifidobacterium bifidum*. Účinně inhibují přilnutí patogenních bakterií na stěnu buněk, a proto hrají značnou roli v neimunologické ochraně kojenců (Gajdůšek, 2003). Přispívají k růstu prospěšné střevní flóry v tračníku, a poskytují obranu proti bakteriálním a virovým infekcím tím, že ve střevě vytvářejí podmínky pro správné osídlení a funkci střevní sliznice (Mehra a Kelly, 2006). Aminocukry obsahují kromě D-glukózy a D-galaktózy také N-acetyl-D-glukosamin, N-acetyl-D-galaktosamin, L-fukosu a N-acetylneuraminovou kyselinu (Gajdůšek, 2003).

Laktulóza je disacharid složený z fruktózy a galaktózy, který získáme po záhřevu mléka, díky záhřevu je laktóza částečně konvertována na laktulózu. Laktulóza má až 62% sladivost sacharózy a také vyšší sladivost, než laktóza (Gajdůšek, 2003).

Oligosacharidy jsou substrátem pro laktobacily a bifidobakterie. Řadíme je mezi tzv. prebiotika, která mají příznivý vliv na mikroflóru tlustého střeva, gastrointestinální činnost a zánětlivé procesy. Většina druhů zvířat má nízký obsah oligosacharidů v porovnání s mateřským mlékem. (Kunz a Rudloff, 2006).

Tabulka č. 2: Obsah laktózy vybraných druhů zvířat

| Druh mléka | Obsah laktózy v % |
|------------|-------------------|
| mateřské | 7 |
| kobyli | 6,9 |
| oslí | 6,1 |
| lamí | 5,6 |
| zebří | 5,3 |
| prasečí | 5 |
| kozí | 4,7 |
| kravské | 4,6 |
| psí | 3,8 |
| myší | 3 |
| delfíní | 1,1 |
| tulení | 0,1 |

(Schaafsma, 2002)

3.1.5.4 Biokatalyzátory

Biokatalyzátory jsou látky, které řídí a regulují funkce v živém organismu. Endogenní biokatalyzátory vznikají přímo v živém organismu, řadí se mezi ně enzymy a hormony (Zadrazil, 2002).

Exogenní biokatalyzátory jsou látky, které si lidský organismus nedovede syntetizovat a musí přijímat potravou např. vitaminy (Zadrazil, 2002).

3.1.5.4.1 Enzymy

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly specializované pro katalázu určitého typu reakcí (Zadražil, 2002). V mléce jsou enzymy zastoupeny ve vysokém množství. Jsou syntetizovány mléčnou žlázou, nebo se dostávají do mléka z krve. Čerstvé kravské mléko obsahuje málo enzymů, zvýšená aktivita enzymů se nachází v kolostru (Zadražil, 2002).

Stanovení enzymů se využívá zejména k:

- rozlišení mlék jednotlivých druhů savců,
- odlišení zralého mléka a mleziva,
- diagnostice zdravotního stavu dojnice,
- zjišťování hygieny,
- ošetřování mléka,
- hodnocení rozkladu jednotlivých složek mléka působením enzymů,
- kontrole tepelného ošetření mléka (Gajdůšek, 2003).

Laktoperoxidáza

Laktoperoxidáza (LP) je glykoprotein, který se přirozeně vyskytuje v kolostru, mléce a mnoha dalších sekretech zvířat a lidí. Představuje nejhojnější enzym v mléce a ve značném množství může být obnoven ze syrovátky pomocí chromatografických technik. Laktoperoxidáza je první enzym mléka, který byl objeven a izolován v čistém stavu (Zadražil, 2002). LP je syntetizována v mléčné žláze a je jedním z nejvíce zastoupených enzymů mléka. Za přítomnosti sulfokyanidu v mléce rozkládá peroxid vodíku na vodu a atomární kyslík, který působí baktericidně (Gajdůšek, 2003). Laktoperoxidáza je přítomna v mléce zahřátém pod 80° C. Peroxidázové zkoušky jsou spolehlivé pouze do titrační kyselosti 9,0 SH (Kouřimská, 2007).

Laktoperoxidázový systém (LSP) obsahující laktoperoxidázu, thiokyanatan a peroxid vodíku je účinný proti široké škále mikroorganismů, včetně bakterií, virů, hub, plísní a prvoků. Je baktericidní proti Gram negativním patogenním bakteriím např. *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.* a *Campylobakter spp.* LSP má mnoho dalších využití např. v dentální hygieně a krmivech pro zvířata. Díky tomu, že patří mezi přírodní potenciální antimikrobiální

látku, se uvažovalo o aplikaci do dalších výrobků pro konzervaci např. masa, ryb, zeleniny, ovoce nebo květin (Park, 2009).

Xantinoxidáza

Xanthinoxidáza katalyzuje oxidaci xantinu na hypoxantin a následně na kyselinu močovou (Zadrazil, 2002). Aktivita tohoto enzymu stoupá v průběhu laktace a vyšší výskyt xantinoxidázy je v mléce obsahujícím vyšší počet somatických buněk. Aktivita xantinoxidázy je malá v mléce zdravých dojnic, starodojném mléce nebo mlezivu. Váže se na obaly tukových kuliček. Její aktivita se využívá ke stanovení odlišení mléka od mastitidních dojnic (Gajdůšek, 2003).

Kataláza

Kataláza se nachází ve všech živých tkáních a tekutinách živých organismů. Aktivita katalázy v mléce je velmi malá, rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. Kataláza je přítomna v leukocytech a používá se ke stanovení onemocnění mléčné žlázy, její aktivita je tedy vyšší v kolostru nebo mléce se zvýšeným počtem somatických buněk (Gajdůšek, 2003).

Proteázy

Proteázy jsou přirozenou součástí mléka. Skoro všechna proteolytická aktivita v mléce je vázána na kasein (Zadrazil, 2002). V mléce rozlišujeme proteázy endogenní, alkalické i kyselé a značný podíl na proteolytické aktivitě mléka tvoří mikrobiální proteázy z kontaminující mikroflóry (Gajdůšek, 2003).

Amylázy

Aktivita amylázy je zvýšena v mlezivu, po prvních čtyřech dnech laktace klesá na minimum, a ke konci laktační periody se znovu zvyšuje. Pasterací mléka je inaktivována (Zadrazil, 2002).

3.1.5.4.2 Vitaminy

Nejdůležitější funkcí vitaminů v lidském organismu je jejich katalytický účinek při látkových přeměnách. Nedostatek vitaminů se může projevit různými poruchami, jako jsou hypovitaminózy nebo avitaminózy. Mléko a mléčné výrobky jsou dobrým zdrojem vitaminů B a B₁₂, dále vitaminu A a jeho provitaminů, vitaminu B₆, kyseliny pantotenové a kyseliny listové. V nízké koncentraci se v mléce vyskytují vitaminy D, E, C a některé vitaminy skupiny B. Koncentraci vitaminů v mléce ovlivňuje mnoho faktorů např. plemeno dojnic, zdravotní stav dojnic, způsob ustájení, roční období a krmivo. Dále má na obsah vitaminů vliv především technologický postup při zpracování mléka a způsob skladování (Drbohlav a Vodičková, 2001).

Vitaminy dělíme do dvou skupin:

- a) Vitaminy rozpustné v tucích neboli lipofilní (A, D, E, K, F) - jsou obsaženy v mléčném tuku. Jejich obsah v mléce je variabilní a je ovlivněn řadou intravitálních činitelů jako je výživa, způsob chovu apod.
- b) Vitaminy rozpustné ve vodě neboli hydrofilní (B₁, B₂, kyselina listová, vitamín B₆, vitamin H a vitamin C) - jejich obsah je poměrně stabilní a vliv intravitálních činitelů je malý. Ve velkém množství jsou vitaminy skupiny B syntetizovány mikroflórou bacheru (Zadrazil, 2002).

Vitamin A (Retinol)

Retinol se vstřebává v tenkém střevě. Doporučená denní dávka vitamínu A činí 859 µg/den (Štiková, Chmelíková, 1990). Nedostatek se projevuje vysycháním rohovky, spojivky, drsnou šupinatou kůží až šeroslepostí (Rondo a Abbot, 2001).

Vitaminy skupiny B

Rozsáhlé výzkumy posledních let zjistily jemné nedostatky ve vitamínech skupiny B, které mohou být rizikové pro cévní a neurologická onemocnění. Nedostatek vitamínu skupiny B může mezi seniory způsobit např. vývoj demence a Alzheimerovy choroby. Mezi faktory

ovlivňující metabolismus homocysteinu v krvi patří foláty, vitamin B₆ a B₁₂. Zvýšená hladina homocysteinu v krvi je považována za rizikový faktor pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění a je nejčastější příčinou úmrtnosti v západních zemích. Snížený příjem folátů je spojen s vyšším rizikem rakoviny tlustého střeva. Pro zvýšenou produkci vitaminů B aplikujeme do mléčných výrobků bakterie mléčného kvašení, které produkují metabolity a mají zdravý přínos pro spotřebitele (Park, 2009).

Vitamin B₂ (Riboflavin)

Volný riboflavin se vyskytuje pouze v sítnici, syrovátce a moči (Wolf, 1985). Pro zajištění hlavních metabolických funkcí by příjem riboflavinu neměl klesnout pod 1,2 mg/den. Riboflavin vytváří koenzymy, které hrají důležitou roli v metabolismu bílkovin, tuků a sacharidů. U osob, které konzumují nedostatečné množství riboflavinu cca 0,5 mg/den po dobu 100 dní může vést až ke vzniku hypovitaminózy (Capo-Chichi a kol., 1999). Koncentrace vitaminu B₂ je vyšší v kravském mléce oproti mateřskému mléku díky tvorbě bachorovou mikroflórou (Zadrazil, 2002). Jeho nedostatek se projevuje záněty ústních koutků, poškozením sliznic, kůže a zastavením růstu (Fořt, 2005).

Vitamin B₅ (Kyselina pantotenová)

Kyselina pantotenová je základem koenzymu A, který se podílí na syntéze bílkovin a dalších metabolických reakcí aminokyselin, tuků a sacharidů. Doporučená denní dávka vitaminu B₅ činí 8 mg/den (Dlouhý a kol., 1996). Nedostatek kyseliny pantotenové se projevuje nervovými poruchami, poškozením vlasů, nehtů a kůže, zástavou růstu a větší náchylností k infekcím (Moiseenok a kol., 2000). Dalšími projevy nedostatku kyseliny pantotenové mohou být chudokrevnost a porucha syntézy bílkovin. (Hlúbik a Opltová, 2004).

Vitamin B₆ (Pyridoxin)

Pyridoxin hraje klíčovou roli v metabolismu aminokyselin. Jestliže přijímáme stravu bohatou na bílkoviny, jeho příjem se zvyšuje. Doporučená denní dávka vitaminu B₆ je 1,7 mg (Štiková, Chmelíková, 1990). Nedostatek pyridoxinu se projevuje vyrážkami, anemií nereagující na podání železa, nespavostí a celkovou přecitlivělostí (Hlúbik a Opltová, 2004).

Vitamin B₁₂ (Kobalamin)

Člověk není schopen využít vitamin B₁₂, který produkují mikroorganismy tlustého střeva, proto je nezbytné ho dodávat ve stravě. Doporučené denní dávky kobalaminu se značně liší, ale pohybují se přibližně kolem 2,5 µg za den. Nedostatek vitaminu B₁₂ se může projevit degradací míšních nervů, chudokrevností, ztrátou paměťových schopností nebo zvýšenou únavou. Nedostatečný příjem vitaminu B₁₂ se může objevit u striktních vegetariánů (Hlúbik a Opltová, 2004).

Kyselina listová (Folacin)

Kyselina listová (folacin) je v mléce vázaná na syrovátkové bílkoviny. Tato vazba se uvolní působením tepla nebo enzymatického štěpení (Hlúbik a Opltová, 2004). Doporučená denní dávka kyseliny listové je přibližně 182 µg /den (Štiková, Chmelíková, 1990).

3.1.5.4.3 Minerální látky

Minerální látky včetně stopových prvků jsou nedílnou součástí všech živých organismů. Do mléka jsou minerální látky přenášeny z krve (Zadrazil, 2002). Lidský organismus získává minerální látky a stopové prvky výživou. Minerální látky se v mléce nacházejí ve formě pravých roztoků, které tvoří anorganické ionty jako např. Na, K a Cl. Koloidně dispergovány jsou vápník, hořčík, citran a fosforečnan. Mezi důležité minerální látky pro lidský organismus patří: Na, K, Ca, Mg, P, S a Cl (Drbohlav a Vodičková, 2001). Přehled množství hlavních minerálních látek v mléce je uveden v Tabulce č. 3.

V mléce je obsaženo 14 esenciálních minerálních látek.

Rozdělují se na:

- Makroprvky – Ca, P, Na, K, Cl, Mg, S
- Mikroprvky – Fe, Cu, Zn, Mn, I, F, Co (Zadrazil, 2002).

Vápník

V 1 litru mléka je obsaženo 1,2 g vápníku. V lidské výživě je příjem vápníku zásadní pro zdravé kosti a zuby, předcházení hypertenze, zlepšení regulace hmotnosti a snížení rizika rozvoje ledvinových kamenů (Insel et al., 2004). Soli vápníku poskytují tuhost skeletu a vápenaté ionty hrají roli v mnoha metabolických procesech. Nejnižší příjem vápníku je v rozvojových zemích, zejména v Asii. V Severní Americe a v Evropě je naopak příjem vápníku nejvyšší. Na pokusných zvířatech bylo prokázáno, že nedostatek vápníku způsobuje osteoporózu, u lidí je výskyt osteoporózy z velké části sporný, co se týče příjmu vápníku. Dostatečný příjem vápníku je důležitý zejména pro růst a vývin během prvních 2 let života, puberty, dospívání, těhotných žen (zejména v posledním trimestru), kojících žen, žen po menopauze a popřípadě starších mužů (WHO a FAO, 2004).

Jód

Jód je nezbytnou součástí hormonů štítné žlázy. Tyto hormony štítné žlázy řídí regulaci těla, rychlost metabolismu, regulují teplotu těla, rozmnožování a růst (Insel et.al, 2004). Nedostatek jódu působí negativně na všechny věkové kategorie. Nej náchylnější skupinou na nedostatek jódu jsou těhotné a kojící ženy, ženy v reprodukčním věku a děti do 3 let věku. Nedostatek jódu v průběhu fetálního vývoje by mohl vést k poškození mozku, nervového systému a tudíž k nevratnému duševnímu opoždění (WHO a FAO, 2004).

Zinek

Zinek je nezbytnou součástí enzymů. Má v těle několik funkcí, mezi které patří růst buněk a jejich replikace, opravy DNA, exprese genů, proteinů a metabolismus lipidů, řídí imunitní funkce a hormonální činnost. Biologická dostupnost zinku z mléka je lepší, než dostupnost zinku z potravin rostlinného původu (Hansen et.al, 1996).

Hořčík

Hořčík funguje v měkkých tkáních jako katalyzátor mnoha enzymů zapojených do energetického metabolismu, syntézy proteinů, syntézy RNA a DNA, udržuje energetický potenciál nervových tkání a buněčných membrán. 50 – 60 % tělesného hořčíku se nachází

v kostech. Hořčík přijímaný z potravinových zdrojů je pro člověka relativně neškodný. Kontaminované potraviny hořečnatými solemi však mohou způsobit nevolnosti a průjem. Hořčík přijímaný z mateřského mléka je absorbován s podstatně vyšší účinností (cca 80 - 90 %), než je tomu u mléka (cca 55 – 75 %) nebo 50 % z pevných potravin (WHO a FAO, 2004).

Tabulka č. 3: Přehled množství hlavních minerálních látek v mléce

| Název nutrientu | kravské v mg/100g | buvolí v mg/100g | kozí v mg/100g | ovčí v mg/100g |
|-----------------|----------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Ca | 124 | 189,45 | 158,907 | 199,463 |
| P | 96 | 109,37 | 128,842 | 154,43 |
| K | 137 | 100,8 | 177 | 159,468 |
| Na | 41 | 42,375 | 38,217 | 50,353 |
| Mg | 10 | 19,02 | 13,314 | 19,325 |
| Cu | 0,008 | 0,055 | 0,048 | neuveđen |
| Fe | 0,044 | 0,175 | 0,075 | 0,139 |
| Zn | 0,318 | 0,594 | 0,33 | neuveđen |
| I | 0,013 | neuveđen | 0,004 | neuveđen |

(Drbohlav a Vodičková, 2001)

3.1.5.5 Antioxidační faktory

Metabolismus kyslíku u aerobních organismů vede k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). Tyto reaktivní formy kyslíku jsou schopny oxidovat bílkoviny, lipidy i nukleové kyseliny. Fyziologická hladina ROS je obvykle upravena antioxidačními obrannými mechanismy. Existují tři skupiny antioxidačních enzymů, které neutralizují ROS. Jsou jimi superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza. (Zachara et.al, 2006). Glutathion peroxidáza (GSHPx) je závislá na aktivitě stopového prvku selenu. GSHPx mění v lidském organismu jedovatý peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík. Superoxid dismutáza (SOD) je přítomna přirozeně v organismu. V aktivním centru SOD je navázán hořčík nebo zinek s měďí. Oba tyto enzymy převádí superoxidový radikál na vodu a molekulární kyslík. Kataláza chrání organismus před peroxidem vodíku, který vzniká při látkové přeměně organismu (Fridowich, 2012).

3.1.5.6 Hormony

Mléko a kolostrum obsahuje velké množství hormonů steroidní povahy či bílkovinného charakteru. Rozdělujeme je na pohlavní hormony, hormony nadledvin, hypofýzy, růstové hormony a hormony hypotalamu. Středem zájmu se staly další molekuly např. bílkoviny v souvislosti s parathormonem, inzulínem, somatostaninem, kalcitoninem, erytropoetinem a melatoninem. Ve vývoji novorozenců stále není známá přesná role hormonů, ale předpokládá se, že mohou přispět k růstu a k rozvoji gastrointestinálního a imunitního systému (Jouan et al., 2006).

3.1.5.7 Nukleotidy

Nukleotidy jsou všudypřítomné intracelulární sloučeniny mající klíčový význam pro buněčnou funkci a metabolismus. U nukleotidů byla zaznamenána a prokázána celá řada účinků jako jsou např. účinky na imunitní systém. Nukleotidy mohou zvýšit vstřebávání železa, ovlivnit lipoproteiny a metabolismus polynenasycených mastných kyselin. Bylo prokázáno, že mají trofické účinky na střevní sliznici a játra. Klinické studie prokázaly, že nukleotidy doplněné do kojenecké výživy snižují výskyt průjemových onemocnění a zvyšují růst u narozených dětí (Cosgrove, 1998). Mateřské mléko je na nukleotidy bohatší, než mléko přežvýkavců (Gil a Sanchez-Medina, 1982). Bylo prokázáno, že při tepelném zpracování kravského mléka dochází k degradaci nukleotidů (Cosgrove, 1998).

3.1.6 Charakteristika mlék vybraných druhů přežvýkavců

3.1.6.1 Kravské mléko

Kravské mléko a mléčné výrobky mají dlouholetou tradici v lidské výživě. Význam mléka se odráží již v severské mytologii, kde bylo mléko významnou potravinou pro Ymery (Haug et al., 2007). Produkce a zpracování kravského mléka je celosvětově nejvyšší, proto je kravské mléko a sušené mlezivo nejvíce přijímáno jako zdroj bioaktivních látek pro lidský organismus (Park, 2009). Obsah laktózy, vápníku a fosforu se udržuje po dobu sekrece mléka na stejné úrovni. Vliv na složení mléčných bílkovin má laktační stádium, roční období (zejména kvalita krmné dávky), zdravotní stav dojnice a v neposlední řadě i plemeno. Obsah bílkovin v kravském mléce kolísá okolo 2,8 – 3,6 % (Gajdůšek, 2002). Přibližně 10 % dětí

v některých státech je alergických na bílkoviny kravského mléka. Náhražkou ve stravě může být v tomto případě mléko kozí, které obsahuje o něco menší množství kaseinu v porovnání s mlékem kravským (Zadrazil, 2002). Složení kravského mléka je uvedeno v Tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Složení kravského mléka

| | |
|--------------|-------------|
| Obsah vody | 87,25% |
| Obsah sušiny | 12,75% |
| Laktóza | 4,6 - 4,9 % |
| Tuk | 3,2 -6 % |
| Bílkoviny | 2,8 - 3,6% |
| Popeloviny | 0,70% |

(Zadrazil, 2002)

3.1.6.2 Kozí mléko

Kozí mléko se od kravského mléka liší čistě bílou barvou, která je způsobena absencí β -karotenu v mléce, který koza do mléka nevyklučuje. Obsah β -karotenu dává např. kravskému mléku smetanové zbarvení (Gajdůšek, 2002). Kozí mléko má specifickou vůni a chuť, která je způsobena vyšším počtem volných mastných kyselin jako jsou kyselina kapronová, kaprinová a kaprylová (Zadrazil, 2002). Kyselinu kaprylovou a kaprinovou, obsaženou v kozím mléce, řadíme mezi antimikrobiální nasycené mastné kyseliny, které chrání lidský organismus před koronárním onemocněním díky homogenně rozptýlenému mléčnému tuku, proto nedochází k tak rychlé ateroskleróze krevních stěn a vlásečnic. Kozí mléko je stále více doporučováno jako ideální náhražka kravského mléka u lidí, kteří trpí alergií na kravské mléko (Park, 2009). Ve srovnání s kravským nebo mateřským mlékem má kozí mléko jedinečné biologicky aktivní vlastnosti jako je vysoká stravitelnost, která je dána menší velikostí a složením tukových kuliček a následným přirozeným homogenním rozptýlením mléčného tuku (Juárez a Ramos, 1986). Dále má kozí mléko oproti kravskému odlišnou alkalitu, vysokou pufovací kapacitu a určité "léčebné" hodnoty, které jsou využívány v medicíně a lidské výživě (Gamble et al., 1939). Kozí mléko má velice nepatrně více minerálních látek oproti kravskému mléku. Kozí mléko vykazuje vyšší obsah vitaminů skupiny B a vitaminů skupiny A. Oproti kravskému mléku má kozí mléko vyšší obsah vápníku, fosforu, draslíku a hořčíku. Naopak obsah železa, zinku, manganu a mědi je v kozím mléce podobný jako obsah v mléce kravském (Zadrazil, 2002). Kozí mléko obsahuje více

glycinu, kyseliny glutamové, threoninu, ale méně argininu a sirných aminokyselin. Složení koziho mléka je uvedeno v Tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Složení koziho mléka

| | |
|--------------|-----------------|
| Obsah vody | 84,80 - 88,80 % |
| Obsah sušiny | 11,20 - 15,20 % |
| Laktóza | 4,20 - 4,60 % |
| Tuk | 3,80 - 4,20 % |
| Bílkoviny | 3,60 - 3,80 % |
| Popeloviny | 0,75 - 0,95 % |

(Zadrazil, 2002)

3.1.6.3 Ovčí mléko

Ovčí mléko má bílou barvu, která přechází do žluta a má charakteristickou natrpklou chuť, která je dána mastnými kyselinami kaprylovou a kaprinovou (Zadrazil, 2002). Ačkoliv produkce ovčího mléka má zcela okrajový význam v porovnání s kravským mlékem, je o něj velký zájem zejména ve Středomoří a na Blízkém východě. Počet ovcí často neodráží množství vyprodukovaného mléka, protože jsou ovce často chovány k jiným účelům, zejména na maso a vlnu. Ačkoliv je ovčí mléko bohatší na nutriční látky, než mléko kravské, k pití se využívá velmi málo. Jeho zpracování se soustředí především na výrobu sýrů nebo jako součást jogurtů (Park, 2009). Ovčí mléko obsahuje vysoký podíl vitamínu A, vitamínu B₁₂ a vitamínu C (Zadrazil, 2002). Je také výborným zdrojem vysoce kvalitních bílkovin, vápníku a tuku. Obsah tuku a bílkovin je vyšší, než v kravském mléce. Má velice dobrou rovnováhu mezi jednotlivými komponenty, každý z nich je přítomen v podobném množství. Přísun živin z ovčího mléka je vysoký ve vztahu k celkovému obsahu kalorií potraviny (Park, 2009). Složení ovčího mléka je uvedeno v Tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Složení ovčího mléka

| | |
|--------------|-----------------|
| Obsah vody | 77,80 – 81,80 % |
| Obsah sušiny | 18,20 – 22,20 % |
| Laktóza | 3,50 – 4,50 % |
| Tuk | 7,20 – 10,60 % |
| Bílkoviny | 5,40 – 7,10 % |
| Popeloviny | 0,75 – 0,95 % |

(Zadrazil, 2002)

3.1.6.4 Buvolí mléko

Buvolí mléko má bílou barvu s lehce nažloutlým odstínem a má mnohem vyšší viskozitu oproti mléku kravskému (Zadrazil, 2002). Produkce buvolího mléka v některých částech světa dominuje a přispívá významným podílem k zásobování mléka ve světě. Indie je největším producentem buvolího mléka ve světě a domovem pro některé z nejlepších mléčných plemen buvola. Buvolí mléko má mírně vyšší koncentraci β -laktoglobulinu ve srovnání s kravským mlékem (Pellegrini et al., 2001). Dále obsahuje přibližně dvakrát více tuku, než mléko kravské (Park, 2009). Informace o bioaktivních látkách v buvolím mléce jsou velmi neprobádané, protože v západních zemích dominuje mlékárenský průmysl, který je zaměřen především na zpracování kravského mléka (Berger et al., 2005). Složení buvolího mléka je uvedeno v Tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Složení buvolího mléka

| | |
|--------------|-----------------|
| Obsah vody | 70,10 - 77,10 % |
| Obsah sušiny | 22,90 - 29,90 % |
| Laktóza | 4,50 - 4,90 % |
| Tuk | 7,70 - 8,10 % |
| Bílkoviny | 14,60 - 16,30 % |
| Popeloviny | 0,75 - 0,95 % |

(Zadrazil, 2002)

3.1.6.5 Velbloudí mléko

Velbloudí mléko se vyznačuje velice bílou barvou a pěnivostí. Chuť je obvykle sladká, ale vlivem krmení keři a bylinami v suchých oblastech může být až slaná, což je způsobeno vyšším obsahem chloridů. Velbloudí mléko je svým složením podobné kravskému, nikoliv však mateřskému. Obsah kaseinu u mléka mateřského a velbloudího je velice podobný, ale syrovátkové frakce bílkovin jsou vyšší u velbloudího mléka. Poměr syrovátkových bílkovin s kaseinem je ve velbloudím mléce vyšší, než u kravského mléka (Park, 2009). Velbloudí mléko se vyznačuje vysokým obsahem imunoglobulinů, lysozymu a laktoferinu (Reiter, 1985). Obsah laktózy je mírně vyšší ve velbloudím mléku, než v kravském a obsah popelovin je velice podobný. Velbloudí mléko má vysoký obsah chloridů ve srovnání s ostatními druhy mléka. Velbloudí mléko je bohaté na zinek, železo, měď, mangan a bohatší na měď a železo, než kravské mléko. Koncentrace citrátů ve velbloudím mléce je 128 mg/ml, což je nižší koncentrace, než u kravského mléka, které obsahuje 160 mg/ml citrátů. Nízká hodnota citrátů může mít velikou výhodu v léčivých vlastnostech mléka díky aktivitě laktoferinu, která je zvýšena s nízkou úrovní citrátů. Kalorická hodnota velbloudího mléka se pohybuje okolo 665 kcal/l oproti kravskému, které má kalorickou hodnotu 701 kcal/l (Park, 2009). Velbloudí mléko je základem pro výrobu zakysaných mléčných výrobků, jedním z nejznámějších je „Chambat“, což je kysaný mléčný nápoj s trvanlivostí až šest dní (Zadrazil, 2002). Složení velbloudího mléka je uvedeno v Tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Složení velbloudího mléka

| | |
|--------------|-----------------|
| Obsah vody | 85,40 - 88,40 % |
| Obsah sušiny | 11,60 - 14,60 % |
| Laktóza | 4,90 - 5,10 % |
| Tuk | 4,30 - 4,50 % |
| Bílkoviny | 3,30 - 3,60 % |
| Popeloviny | 0,70 - 0,90 % |

(Zadrazil, 2002)

3.1.6.6 Zebuové mléko

Zebuové mléko je velice podobné mléku kravskému. Je bílé barvy, mléčné vůně a stejnorodé konzistence. Je určeno především pro přímou spotřebu obyvatel jižní a východní Afriky, Indý a Pákistánců jako základní zdroj živočišných bílkovin (Zadrazil, 2002). Složení zebuového mléka je uvedeno v Tabulce č. 9.

Tabulka č. 9: Složení zebuového mléka

| | |
|--------------|-----------------|
| Obsah vody | 84,80 - 86,60 % |
| Obsah sušiny | 13,40 - 15,20 % |
| Laktóza | 4,70 - 4,90 % |
| Tuk | 4,60 - 5,60 % |
| Bílkoviny | 3,40 - 3,80 % |
| Popeloviny | 0,70 - 0,90 % |

(Zadrazil, 2002)

3.1.6.7 Sobí mléko

Sobí mléko se liší od ostatních druhů mléka příjemně kořeněnou vůní a chutí. Nezpracovává se na mléčné výrobky, ale je spotřebováváno domorodci jako nápoj (Zadrazil, 2002). Složení sobího mléka je uvedeno v Tabulce č. 10.

Tabulka č. 10: Složení sobího mléka

| | |
|--------------|-----------------|
| Obsah vody | 62,90 - 66,90 % |
| Obsah sušiny | 34,10 - 36,10 % |
| Laktóza | 3,50 - 3,70 % |
| Tuk | 17,80 - 18,80 % |
| Bílkoviny | 10,80 - 13,80 % |
| Popeloviny | 1,60 - 1,80 % |

(Zadrazil, 2002)

3.1.7 Zdravotní problémy spojené s konzumací mléka

Problémy, které vyvolává konzumace a trávení mléka se obecně dělí do dvou skupin:

- alergie na kravskou bílkovinu,
- laktózová intolerance (Ettlerová, 2009).

Alergie sužují lidstvo již tisíceletí, ale dodnes jejich příčiny nejsou zcela prozkoumány. Mléko patří mezi nejčastější potraviny vyvolávající alergie (Sharon, 1994). Mezi hlavní alergeny mléka patří kaseiny, které tvoří 80 % z celkového obsahu bílkovin kravského mléka. Studie na myších ukázaly, že kozí mléko vykazuje menší alergenicitu oproti mléku kravskému, díky nižšímu obsahu α -kaseinu (Restani et.al., 1997). Alergie se projevují pestrými klinickými příznaky, na jejich vzniku se uplatňují imunitní reakce zprostředkované IgE protilátkami. Reakce zprostředkovaná IgE protilátkami se projeví časně a to většinou do 2 hodin po požití mléka. Pozdní reakce se projevují např. atopickým ekzémem, dýchacím onemocněním, což vede k většímu zahlenění organismu. Dalším nejčastějším projevem jsou záněty trávicího traktu, nadýmání, zvracení či průjmy. Největším alergenem je mléko především pro kojence a malé děti, u kterých tvoří mléko hlavní složku jídelníčku (Ettlerová, 2009).

Nealergickou reakcí je laktózová intolerance. Jedná se o metabolickou poruchu štěpení laktózy. Podstatou laktózové intolerance je neschopnost trávit disacharid laktózu na galaktózu a glukózu. Enzym laktáza chybí, nebo je přítomen v nedostatečném množství. Nestrávená laktóza se dostane do tlustého střeva, kde ji bakterie přemění na CO_2 , H_2 a H_2O . Laktózová intolerance se následně projeví bolestí břicha, průjmem nebo plynatostí. Nedostatkem enzymu laktázy trpí cca 6 - 12 % populace. U některých etnických skupin např. černochů se intolerance laktózy vyskytuje až kolem 80 % (Ettlerová, 2009). Intolerance se týká všech druhů mlék. Řešením může být obohacení mléka β -galaktosidázou, bezlaktózové mléko nebo konzumace fermentovaných mléčných výrobků (Černá, 1981).

3.2 Hlavní metody vybraných bioaktivních látek v mléce

Mléko je velice variabilní surovinou pro výrobu sýrů, másla, sušeného mléka jako zdroj nejrůznějších bioaktivních látek, které představují prospěšné atributy pro lidské zdraví (Bauman et al., 2006). Extrahování prospěšných bioaktivních látek z mléka nabízí přidanou hodnotu výrobkům, které jsou o tyto vyextrahované látky obohaceny. Izolace a analýzy bioaktivních látek z mléka představují neustálou výzvu pro výzkumné pracovníky z celého světa. Nové technologie jsou vyvíjeny na základě objevu nových bioaktivních látek. Vzhledem k tomu, že jednotlivé mléčné bílkoviny v čisté formě vykazují lepší funkčnost, než ve směsi bílkovin, je velký zájem o rozvoj jednodušších metod pro přípravu čistého kaseinu a syrovátkových bílkovin v širším měřítku (Imafidon et al., 1997).

3.2.1 Stanovení obsahu bílkovin

Podle principu stanovení můžeme instrumentální metody rozdělit do několika skupin:

- automatizované metody dle Kjeldahla,
- metoda na principu reakce bílkovin s barvivou,
- metoda infračervené spektroskopie,
- metoda amoniové iontově selektivní elektrody,
- metoda nukleární rezonance,
- metoda kolorimetrická,
- metoda coulometrická,
- metoda volumetrická,
- metoda fluorescenční (Peterková a kol., 1989).

Automatizované metody dle Kjeldahla

Pro stanovení obsahu bílkovin v mléce stále převažuje základní mineralizace dle Kjeldahla s různým stupněm mineralizace a automatizace. Tyto metody jsou založeny na třístupňovém analytickém postupu, který se skládá z mineralizace, destilace a titrace. Tato metoda využívá ke stanovení bílkovin např. přístroje Kjeltec firmy Tecator (Švédsko), Büchi (Švýcarsko), KjehlFoss (Dánsko) (Cvak a kol., 1992).

Metoda na principu reakce bílkovin s barvivy

Podstatou této metody je tvorba nerozpustného komplexu bílkovina-barvivo. Při reakci bílkovin s barvivem se vytváří nerozpustný komplex, který se odstraní filtrací nebo odstředěním. Vhodná barviva pro stanovení obsahu bílkovin v mléce jsou Orange G, Amidočern 10B a Brilliant Orange. Obsah bílkovin se odvodí z měření absorbance roztoku barviva před a po reakci podle kalibrace. Metoda se často využívá pro sériové stanovení bílkovin (Cvak a kol., 1992).

Metoda infračervené spektroskopie

Metoda je založena na interakci IR záření s molekulami měřené látky v oblasti vlnových délek $6,45 \cdot 10^{-6}$ nm, která je charakteristická pro bílkovinné molekuly (Cvak a kol., 1992).

Metoda amoniové iontově selektivní elektrody

Metoda amoniové iontově selektivní elektrody se uplatňuje v zjišťování amoniaku v mineralizátu metodou přímé potenciometrie. Pro svojí časovou nenáročnost nachází stále větší uplatnění (Peterková, 1989). Vzhledem k citlivosti elektrody je možno provést z jednoho mineralizátu více stanovení, čímž se zvýší spolehlivost výsledku (Cvak a kol., 1992).

Metoda nukleární magnetické rezonance

Praktické aplikace této metody bylo dosaženo ve spojení s relaxačním činidlem, tj. roztokem, který obsahuje paramagnetický materiál jako je např. Cu^{2+} . Toto relaxační činidlo kontroluje rychlost magnetických relaxací vodíkových jader, které jsou přítomny ve vodě. Relaxační rychlosti jsou měřeny pulsní technikou nukleární magnetické rezonance. Oproti jiným metodám je tato metoda rychlá a je vhodná pro sériová stanovení (Peterková a kol., 1989).

Metoda kolorimetrická

Kolorimetrická metoda využívá principu Berthelotovy metody. Tato metoda je založena na stanovení amoniaku v roztoku po reakci s chlornanem a nitroprussidem sodným v prostředí salicylanu sodného s kolorimetrickými měřeními za vzniku zelenomodrého zbarvení (Cvak

a kol., 1992). Pro stanovení bílkovin pomocí kolorimetrické metody byl vyvinut přístroj Technicon Analyzer (Pererková a kol., 1989).

Metoda coulometrická

Coulometrická metoda spočívá v odměření mineralizátu do coulometrické cely, kde za vhodných podmínek probíhá oxidace amonných iontů bromem na dusík. Při mineralizaci vzorku nelze použít selenový katalyzátor. Tato metoda je závislá na pečlivém odměřování vzorku (Peterková a kol., 1989).

Metoda volumetrická

Volumetrické stanovení obsahu dusíku využívá principu Dumasovy metody. Vzorek mléka se spaluje za velmi vysoké teploty až 1050 °C v proudu kyslíku. Produkty spalování se redukuje nad mědí, vyplachují oxidem uhličitým a jímají se v hydroxidu draselném. Dusík se stanovuje volumetricky a výši obsahu dusíku snímají elektrody. Tato metoda pracuje s navázkou, proto vyžaduje dobrou homogenitu vzorku (Cvak a kol., 1992).

Metoda fluorescenční

Podstatou fluorescenční metody je měření fluorescence bílkovinných molekul vyvolaných ultrafialovým zářením, kdy spektrum budícího záření leží v rozmezí 240 až 280 nm a spektrum fluorescenčního záření v rozmezí 340 až 360 nm. Ultrafialové záření přechází přes světelné filtry do kyvety. Filtry propouštějí pouze vlnové délky fluorescenčního záření, které působí na buňku, která je zapojena do měřícího systému (Cvak a kol., 1992).

Izolace a kvantifikace hlavních syrovátkových bílkovin mléka

V roce 1970 poskytl rychlý rozvoj techniky membránové a gelové filtrace nové možnosti pro získání velkého rozsahu koncentrací syrovátkových bílkovin a výroby syrovátkových koncentrátů (WPC) a izolátů (WPI). Výrobu demineralizovaných syrovátkových prášků bylo možno použít ve velkém rozsahu přes metodu diafiltrace nebo iontoměničovou chromatografii. Techniky pro izolaci jednotlivých syrovátkových proteinů v laboratorním

měřítka jako je solení, iontová výměna, chromatografie a krystalizace jsou k dispozici již mnoho let (Park, 2009).

Gesan-Guiziou et al. (1999) vyvinuli proces pro přípravu čisté frakce α -La a β -La ze syrovátkových bílkovinných koncentrátů, který se skládá z následujících po sobě jdoucích kroků: úprava syrovátkových bílkovinných koncentrátů, odmaštění, srážení α -laktalbuminu, oddělení β -laktoglobulinu, vymytí sraženiny, rozpouštění sraženiny, koncentrace a čištění α -La. Tento proces byl proveden, jak na laboratorní stupnici s kyselou syrovátkou, tak na poloprovozním měřítku se syrovátkou sýru Gouda. V obou případech byly rozpustné β -La odděleny pomocí diafiltrace nebo mikrofiltrace. Čistota α -La a β -La byla v rozmezí 52 – 83 % a 85 – 94 %, ve výsledku čistota β -La byla vyšší díky použití kyselé syrovátky, která neobsahovala kaseinmakropeptid ve srovnání s použitím syrovátky.

3.2.2 Stanovení obsahu sacharidů

Stanovení obsahu laktózy můžeme rozdělit do několika skupin:

- metoda infračervené spektroskopie MIR,
- metoda infračervené spektroskopie NIR,
- metoda plynové chromatografie (GLC)
- metoda kapalinové chromatografie (HPLC) (Cvak a kol., 1992).

Metoda infračervené spektroskopie MIR

Metoda je založena na interakci infračerveného záření a molekul měřené látky v oblasti vlnových délek $9,55 \cdot 10^{-1}$ m. Infračervené záření se absorbuje hydroxylovými skupinami glycidů v místě vazby na uhlík. Tento princip využívají např. přístroje typu Milko-Scan (Cvak a kol., 1992).

Metoda infračervené spektroskopie NIR

Principem metody infračervené spektroskopie NIR je absorpce blízkého infračerveného záření odrazu, nebo absorpce blízkého infračerveného záření při průchodu vzorkem. Zobrazí se spektrum, ve kterém jsou pásy širší než u MIR spekter (Holler et al., 2007).

Metoda plynové chromatografie (GLC)

U metody plynové chromatografie je nutností předběžná dialýza vzorku, kdy se sacharidy převedou na těkavé trimethylacyletery a ty se následně rozdělí plynovou chromatografií za použití plamenově ionizačního nebo tepelně vodivostního detektoru (Cvak a kol., 1992).

Metoda kapalinové chromatografie (HPLC)

U metody kapalinové chromatografie se nevyužívá předběžné dialýzy vzorku, čímž se zvyšuje přesnost stanovení a také doba analýzy. Pro stanovení sacharidů se používají jako náplně mikrokapilární silikagely s chemicky vázanými $-NH_2$ skupinami a mobilní fáze acetonitril-voda s detekcí obvykle refraktometrickou (Cvak a kol., 1992).

Izolace a analýza oligosacharidů z mléka

Pro výrobu disacharidů z mléka jsou vyvíjeny různé metody např.:

- pomocí technologie koncentrace nebo frakcionace jako jsou membránová filtrace,
- vyjádřením oligosacharidů z mateřského mléka pomocí transgenních zvířat (Mehra a Kelly, 2006).

Tanaka a Matsumoto vyrobili v roce 1998 galaktooligosacharidy z laktózy s využitím trans galaktosylace pomocí β -galaktosidázy, kde enzymatická syntéza vedla k produkci heterogenních směsí galaktooligosacharidů se strukturami různých délek a řetězců (Martinez-Ferez et al., 2006).

V posledních letech byla použita technologie membránové filtrace pro izolaci oligosacharidů z kozího mléka (Martinez-Ferez et al., 2006).

3.2.3 Izolace a analýza vybraných antioxidačních faktorů mléka

Superoxid dismutáza

Částečně čistý enzym superoxid dismutáza byl získán roku 1975 z odstředěného mléka po vysrážení kaseinu syřidlem. Syrovátka byla koncentrovaná a roztok byl ošetřen ethanolem

a chloroformem. Vysrážené proteiny byly odděleny centrifugací. Superoxid dismutáza byla čištěna supernatanem přes gelovou chromatografii a iontovou chromatografii (Hill, 1975).

Nejčastěji využívaná metoda stanovení obsahu superoxid dismutázy v mléce je založena na inhibici a redukci cytochromu C do superoxidového aniontu produkovaného enzymaticky xanthinoxidázou (Korycka-Dahl et al., 1979). Endogenní xanthinoxidáza, která je přítomna v mléce může narušovat stanovení superoxid dismutázy. Metoda byla vylepšena na základě snížení xanthinoxidázy ultrafiltrací vzorku před analýzou (Granelli et al., 1994).

Kataláza

Kataláza je získána z kravského mléka pomocí několika kroků čištění, včetně extrakce n-butanolu, ošetření síranem amonným, frakcionací ethanol-chloroformu, DEAE – Sephacel sloupce chromatografie a Sephacryl S – 300 gelové filtrace. Optimální pH pro enzymovou aktivitu je pH=8,0 a teplota 20 °C (Ito a Akuzawa, 1983). Kataláza může být analyzována podle polarografické metody, při které se kyslík kvantitativně uvolní z peroxidu vodíku na kyslíkové elektrodě (Hirvi et al., 1996).

Glutathion peroxidáza

Bhattacharya et al. (1988) získal čistou glutathion peroxidázu z mateřského mléka pomocí rozkladu acetonu a opakovaným čištěním, srážením a výměnami iontů gelovou filtrační chromatografií.

Aktivita glutathion peroxidázy v mateřském mléce může být z 90 % urychlena anti-plasma-GSHPx imunoglobulinů G (Zachara, 2006).

3.2.4 Stanovení vápníku v mléce

Vápník v mléce můžeme stanovit:

- manganometricky - referenční metoda,
- komplexometrickou titrací - rutinní metoda,
- plamennou emisní spektrometrií,
- použití iontově selektivních metod (Cvak a kol., 1992).

Metoda manganometrická

Vápník získaný spalováním vzorku se rozpustí ve zředěné HCl, vysráží roztokem šťavelanu amonného a stanoví manganometrickou titrací (Černá a Cvak, 1986).

Metoda komplexometrické titrace

Popel ze vzorku se rozpustí ve zředění HCl a v odpovídajícím podílu se stanoví vápník komplexometrickou titrací při pH=12 na indikátor fluorexon (Peterková a kol., 1989).

Podstatou titrační metody, kdy stanovujeme obsah vápníku v mléce podle normy ČSN ISO 12081 je „ Ve zkušebním dílu se pomocí kyseliny chlorovodíkové vysráží bílkovinné látky a vzorek se zfiltruje. Vápník ve filtrátu se vysráží jako šťavelan vápenatý a oddělí se odstředěním. Promytá a rozpuštěná sraženina se filtruje manganistanem draselným.“

Metoda plamenné emisní spektrometrie

Vzorek mléka se zmineralizuje spálením dle postupu stanovení celkového popela. Je-li získaný vzorek naředěné barvy, rozpustí se v 25% roztoku HNO₃, odpaří se ve vodní lázni a znovu spaluje v muflové peci do té doby, než popel zbělá. Znovu se popel rozpustí v 25% roztoku HNO₃ a doplní se vodou. Přidáme odpipetovaný roztok LaCl₃ * 7 H₂O a opět se zředí vodou. Spektrometrické měření se provádí s kalibračními roztoky vápníku na plamenném spektrofotometru při 422, 7 nm (Cvak a kol., 1992).

Metoda využívající iontově selektivních elektrod

Stanovení koncentrace iontů pomocí iontově selektivních metod využívá selektivity příslušné elektrody na stanovený ion. V závislosti na koncentraci iontu, který se měří, mění elektroda svůj potenciál proti referentní elektrodě a tato změna je indikována jako změna napětí na měřicím přístroji např. pH-metru. V mléce jakožto koloidním roztoku dochází v důsledku vysokého obsahu bílkovin a tuku k pomalejšímu ustalování potenciálu. Oblast praktické využitelnosti ISE se pohybuje v rozmezí koncentrací 10⁻¹ až 10⁻⁶ mol/l. Pro měření je zapotřebí mV – metr s vysokým vstupním odporem např. Orion Research, Philips nebo Radiometr (Cvak a kol., 1992).

3.2.5 Izolace a analýza nukleotidů v mléce

Úroveň nukleotidů v mléce je analyzována různými autory především pomocí analytické metody HPLC. Janas a Picciano (1982) využili metodu HPLC pro analýzu nukleotidů v mateřském mléce. Kapilární elektroforéza se stala jednoduchou, spolehlivou, efektivní a rychlou metodou rutinního elektroforetického stanovení nukleotidů v mateřském mléce (Perrin et al., 2001). Byly shromažďovány vzorky mléka po dobu 1 měsíce od zdravých matek ve věku 25 – 35 let. Duplikované vzorky byly odděleny kyselou hydrolyzou za použití alkalicko-elektroforetického separačního systému (Cubero et al., 2007).

4 Závěr

Mléko a mléčné výrobky jsou téměř dokonalou potravinou obsahující laktózu, mléčný tuk, bílkoviny, vitamíny, minerální látky a další složky. Tato práce popisuje jednotlivé bioaktivní látky a jejich vliv na zdraví konzumenta. Mléko obsahuje výživově prospěšné látky pro lidský organismus, avšak menší část z nich může představovat i možná rizika. Jedním z rizik může být i mléčný tuk, který obsahuje nevhodný poměr mezi nasycenými a nenasycenými kyselinami (13:1), kdy může zvyšovat riziko vzniku aterosklerózy. Mléko je zároveň zdrojem laktózy, která podporuje rozvoj žádoucích bakterií střevní mikroflóry. Bílkoviny mléka se dělí do dvou skupin, jednou skupinou jsou kaseiny a druhou skupinou jsou syrovátkové bílkoviny. Surovátkové bílkoviny mají vyšší nutriční hodnotu v porovnání s kaseiny díky obsahu esenciálních mastných kyselin s rozvětveným řetězcem, jako jsou valin, leucin a izoleucin. U menší skupiny populace může mít mléko negativní vliv ve smyslu laktózové intolerance nebo alergie na bílkoviny mléka, kdy alergie na bílkoviny kravského mléka se u části populace dá řešit náhražkou kozího mléka za mléko kravské.

Druhá část práce je zaměřena na porovnání metod stanovení jednotlivých bioaktivních látek mléka. Jsou zde uvedeny metody ke stanovení obsahu bílkovin, z čehož se stále v praxi využívá automatizované metody podle Kjeldahla. Při stanovení obsahu sacharidů v mléce je účinná metoda kapalinové chromatografie (HPLC), která se využívá i u izolace nukleotidů.

5 Seznam literatury

- Bauman, DE., Mather, IH., Wall, RJ., Lock, AL. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk, *Journal of Dairy Science* 89:1235-1243.
- Berger, A., Turini, M. E., Colarow, L. 2005. Bufallo milk gangliosides. U. S. Patent 20.
- Brattacharya, ID., Picciano, MF., Milner, JA. 1988. Characteristics of Human Milk Glutathione Peroxidase. *Biological Trace Element Research* 18: 59 – 70.
- Capo-Chichi, CD., Gueant, JI., Lefebvre, E., Bennani, N., Lorentz, E., Vidailhet, C., Vidailhet, M. 1999. Riboflavin and riboflavin-derived cofactors in adolescent girl with anorexia nervosa. *American Journal of Clinical Nutrition* 69: 672-678.
- Cosgrove, M. 1998. Nucleotides. *Nutrition* 14: 748 – 751.
- Cubero, J., Sanchezm J., Sanchez, C., Narciso, D., Barriga, C., Rodriguez, AB. 2007. A new analytical technique in capillary electrophoresis: studying the levels od nucleotides in human breast milk. *Journal od Applied Biomedicine* 5: 85-90.
- Cvak, Z., Peterková, L., Černá, E., 1992. Chemické a fyzikálně – chemické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků. Výzkumný ústav potravinářský. 221 s. ISBN 80 – 85120 – 36 – 4.
- Černá, E., Cvak, Z., 1986, Analytické metody pro mléko a mlékárenské výrobky, Výzkumný ústav v Praze, 469 s.
- Černá, M. 1981. Výroba mléka a mléčných výrobků se sníženým obsahem laktózy nebo bez laktózy. Výzkumný ústav mlékárenský v Praze. Praha. 43 s.
- ČSN ISO 12081. Mléko – Stanovení obsahu vápníku – Titrační metoda. 2012. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. Praha. 12s.
- Dlouhý, P., Anděl, M., Hromadová, M. 1996. Srovnání doporučených výživových dávek v různých zemích. *Hygiena* roč. 41, 167-185 s.
- Drbohlav a Vodičková. 2001. Tabulky látkového složení mléka a mléčných výrobků. ÚZPI Slezská 7. Praha 2. Praha. 85 s. ISBN 80-7271-005-2.
- EFSA. Scientific Opinion on bovine lactoferrin. [online] *EFSA Journal*. 24.5.2012. [cit. 2013-01-02] Dostupné z <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2701.htm>>.
- Ettlerová, K. 2009. Alergie na kravské mléko. *Alergologie a klinická imunologie* 3 (4): 178-183.
- Expósito, IL., Recio, I. 2006. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal* 16: 1294 – 1305.

- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., Walsh, D.J. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition* 134: 980-988
- Fořt, P. 2005. *Zdraví a potravní doplňky*. Euromedia Group a.s. 400 s. ISBN 978-80-86938-96-7.
- Fridowich, I. 2012. Oxygen: How Do We Stand It?. *Medical Principles and Practice* 22: 131 – 137.
- Gajdůšek, S. 2002. *Mlékařství II*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 135 s. ISBN: 80-7157-342-6.
- Gajdůšek, S. 2003. *Laktologie*. Brno. MZLU. 78 s. ISBN 8071576573.
- Gamble, J. A., Ellis, N. R., Besley, A. K. 1939. Composition and properties of goat's milk as compared with cow's milk. *USDA Tech Bull* 671: 1 – 72.
- Gil A, Sanchez-Medina F. 1982. Effects of thermal industrial processing on acid-soluble nucleotides of milk. *Journal of Dairy Research* 49 : 295.
- Granelli, K., BjoErck, L., Appelqvist, LAE.1994. The variation of superoxide dismutase (SOD) and xanthine oxidase (XO) activities in milk using an improved method to quantite SOD activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67: 65 -91.
- Hansen, M., Sandstrom, B.,Lonnerdal, B. 1996. The effect of casein phosphopeptides on zinc and kalcium absorpction from high phytate infant diets assessed in rat pups and Caco-2 cells. *Pediatr Res* 40(4): 547-552.
- Haugh, A., Hostmark, AT., Harstad, OM. 2007. Bovine milk in human nutrition- a review. *BioMed Central. Lipids in Health and Disease* 6: 25.
- Hill, RD. 1975. Superoxide dismutase aktivty in bovine milk. *Australian Journal of Dairy Technology* 30: 26-28.
- Hirvi, Y., Griffiths, MW., McKellar, RC., Modler, HW. 1996. Linear-transform and non-linear modelling of bovine milk katalase inactivation in a high-temperature short-time pasteurizer, *Food Research International* 29: 89-93.
- Hlúbik, P., Opltová, L. 2004. *Vitaminy*. Grada Publishing a.s. Praha. 232s. ISBN 80-247-0373-4.
- Holler F. J., Skoog D. A., Crouch S. R. 2007. *Principles of Instrumental Analysis*, 6. edice, Books/Cole, Cengage Learning. USA. ISBN-13: 978-0495012016.
- Imafidon, GI., Farkye, NY., Sparier, AM. 1997. Isolation, purification and alteration of some functional groups of major milk proteins. *Critical Rewiews in Food Science and Nutrition* 37 (7): 663-689.

- Ingr, I. 2003. Zpracování zemědělských produktů. Brno: MZL, 249 s. ISBN 80-7157-520-8.
- Insel, P., Turner, RE., Ross, D. 2004. Nutrition Second edition. American dietetic association. Jones and Bartlett. USA
- Ito, O., Akuzawa, R. 1983. Purification, crystalization and properties of bovine milk katalase. Journal of Dairy Science 66 (5): 967 – 973.
- Janas, LM., Picciano, M. 1982. The nukleotide profile of human milk. Pediatric Research 16: 659-662.
- Jouan, P. N., Pouliot, Y., Gauthier, S. F., Laforst, J. P. 2006. Hormones in bovine milk and milk products: A survey. International Dairy Journal 16: 1408 – 1414.
- Juárez, M., Ramos, M. 1986. Physico-chemical characteristics of goat milk as distinct
- Kopáček, J. Oslava mléka. [online]. 2009. [cit. 2013-01-12] Dostupné z <http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Kvasnickova/Kopacek_vyziva.pdf>.
- Korycka – Dahl, M., Richardson, T., Hicks, CL. 1979. Superoxid dismutase activity in bovine milk serum, Journal of Food Protection 42: 867 – 871.
- Kouřimská, L. 2007. Úvod do mlékařství. Laboratorní cvičení. ČZU. 99 s. ISBN 978 – 80 - 213-1665 - 2.
- Kris-Etherton, P. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. The American Journal of Medicine 113 (9): 71-88.
- Kunz, C., Rudloff, S. 2006. Health promotng aspect of milk oligosacharides. str. 1341-1346
- Martinez-Ferez, A., Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, CA., Pohlenz, G., Boza, JJ., Guadix, EM., Kunz, C. 2006. Goat's milk as a natural source of lactose derived oligosacharides: Isolation by membráně technology. International Dairy Journal 16: 173-181.
- Mehra, R., Kelly, P. 2006. Milk oligosacharides: Structural and technological aspects. International Dairy Journal 16 (11): 1334-1340.
- Mensink, R. P. 2006. Dairy products and the risk to develop type 2 diabetes or cardiovascular disease. International Dairy Journal 16: 1001-1004.
- Moiseenok, Ag., Komar, Vi., Khomich, Ti., Kanunnikova, Np., Slyshenkov, Vs. 2000. Pantotenic acid in maintaining thiol and imine homeostasis. Biofactors 11: 53-55.
- Park, Young W. 2009. Bioactive components in Milk and Dairy Product. Wiley-Blackwell. USA. p. 427. ISBN 978-0-8138-1982-2.

- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., Hunziker, P. 2001. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -laktoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1526: 131-140.
- Perrin, C., Meyer, L., Mujahid, C., Blake, C. 2001. The analysis of 5'-mononucleotides in infant formulae by HPLC. *Food Chemistry* 74: 245-253.
- Peterková, L., Cvak, Z., Bazala, L. 1989. Moderní přístrojová technika pro stanovení základních složek mléka. Výzkumný ústav potravinářského průmyslu. Praha. 128 s. ISBN 80 – 85120 – 07 – 0.
- Reiter, B. 1985. The biological significance and exploitation of the non-immunoglobulins protective proteins in milk: Lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase, xanthine oxidase. *Bulletin of the International Dairy Federation* 191/ 1985.
- Restani P, Gaiaschi A, Plebani A, Beretta B, Cavagni G, Fiocchi, A, Poisei C, Velona T, Ugazio AG, Galii CL. 1997. Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clinical & Experimental Allergy*. p. 997–1004.
- Rondo, Ph., Abbott, R. 2001. Vitamin A and neonatal antropometry. *Journal of Tropical Pediatrics* 47: 307-310.
- Sharon, M. 1994. Komplexní výživa- Správná cesta ke zdraví. Pragma. s. 193. ISBN 80-85213-54-0.
- Schaafsma, G. 2002 Nutritional significance of lactose and lactosederivatives. In H. Roginsky, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.). *Encyclopedia of dairy sciences* London, UK: Academic Press. p.1529–1533.
- Schaafsma, G. 2008. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition, *International Dairy Journal* 18: 458-465.
- Štiková, O., Chlelíková, D. 1990. Výživové doporučené dávky pro průměrného obyvatele. *Výživa lidu* roč. 45. 7-8 s.
- Tanaka, R., Matsumoto, K. 1998. Recent progress on prebiotics in Japan, including galactooligosacharides. *Bulletin of the International Dairy Federation* 336: 21 – 27.
- Gesan-Guiziu, G., Daufin, G., Timmer, M., Allersma, D., Horst, CVD. 1999. Progress steps for the preparation of purified fractions of α -lactalbumin and β -laktoglobulin from whey protein concentrates. *Journal of Dairy Research* 66: 225 – 236.
- Wolf, A. 1985. *Hygienu výživy*. Praha: Avicem 384 s.
- World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nation. 2004. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition, Second Edition*. p. 341

Zadražil, K. 2002. Mlékařství. Česká zemědělská univerzita v Praze a ISV Praha. Praha. 127 s. ISBN 80-86642-15-1.

Zachara, B. A., Gromadzińska, J., Wąsowicz, W., Zbróg, Z. 2006. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: A review. *Acta Biochimica Polonica* 53: 663 – 677.

Zemědělský svaz ČR. V roce 2010 jsme v ČR přestali být soběstační v produkci mléka. [online]. 2009. [cit. 2013-01-01]. Dostupné z <<http://www.zscr.cz/o-nas/analyzy-statistiky/v-roce-2010-jsme-v-cr-prestali-byt-sobestacni-v-pr-a2111042>>.

6 Seznam použitých zkratk a symbolů

| | |
|------------------|---|
| CLA | kyselina linolová |
| FAO | Světová organizace pro výživu a zemědělství |
| GLC | plynová chromatografie |
| GMP | glykomakropeptid |
| GSHPx | glutathion peroxidáza |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| IgA | imunoglobulin A |
| IgE | imunoglobulin E |
| IgG | imunoglobulin G |
| IgG ₁ | imunoglobulin G ₁ |
| IgG ₂ | imunoglobulin G ₂ |
| IgM | imunoglobulin M |
| LF | laktoferin |
| LP | laktoperoxidáza |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| SOD | superoxid dismutáza |
| WHO | Světová zdravotnická organizace |
| WPC | syrovátkový proteinový koncentrát |
| WPI | syrovátkový proteinový izolát |
| α -La | α -laktalbumin |
| β -La | β -laktoglobulin |