

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Charakterizace bílkovinných frakcí v mléce malých
přežvýkavců**

Bakalářská práce

Autor práce: Jana Hrubá

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Klára Podhorecká

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Charakterizace bílkovinných frakcí v mléce malých přežvýkavců" 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 2.5.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svojí vedoucí Ing. Kláře Podhorecké za cenné rady, připomínky, ochotu, vstřícnost a čas, který věnovala konzultacím. Dále bych ráda poděkovala paní doc. Ing. Aleně Hejtmánkové, CSc. za vstřícnost. Své rodině děkuji za trpělivost a podporu.

Charakterizace bílkovinných frakcí v mléce malých přežvýkavců

Souhrn

Mléko je klíčové pro výživu mláďat všech savců včetně člověka. Obsahuje veškeré hlavní živiny: sacharidy, lipidy i bílkoviny. Uvádí se, že kozí mléko může být, v porovnání s mlékem kravským, méně alergenní, především díky nižšímu obsahu bílkoviny α s1-kaseinu, který je u kravského mléka považován za jeden z hlavních alergenů. Výživově vhodné je i z hlediska menších tukových kuliček, což může usnadňovat jeho trávení. Rovněž profil mastných kyselin v mléčném tuku je pro lidské zdraví příznivý. Obliba kozího mléka roste a výrobky z něj, například sýry, patří mezi oblíbené speciality.

Kozí mléko obsahuje všechny esenciální aminokyseliny a je plnohodnotným zdrojem proteinů, které lze rozdělit na hlavní (kaseinové a syrovátkové) a minoritní (například imunoglobuliny). Mezi kaseinové bílkoviny jsou zařazovány: α s1-kasein, α s2-kasein, β -kasein a κ -kasein, případně γ -kasein, produkt vzniklý štěpením β -kaseinu. V mléce se nacházejí v podobě kaseinových micel, převážně globulárních útvarů, které se mohou spolupodílet na vlastnostech mléka. Mezi hlavní syrovátkové bílkoviny jsou zařazovány: α -laktalbumin a β -laktoglobulin.

Bílkoviny by měly být součástí vyváženého jídelníčku. Proteiny lze jen těžko nahrazovat ostatními živinami. Zajišťují v lidském organismu řadu klíčových funkcí, například stavební, transportní, řídicí a regulační a mnohé další.

Při technologickém zpracování mléka je důležitý obsah i samotná kvalita bílkovin. Bílkoviny ovlivňují jak technologické vlastnosti, tak i kvalitu mléčných výrobků.

Složení mléka, ale i zastoupení bílkovin je determinováno mnoha vlivy, například genetickými faktory (heritabilitou) nebo vnějšími faktory (výživou zvířat, technikou dojení). Kvalita a zdravotní nezávadnost mléka může být negativně ovlivněna zdravotním stavem (například mastitidou), stresem, nesprávným dodržováním hygieny při dojení, nevhodným uchováváním a přepravou mléka.

Je obecně známo, že bílkoviny kozího mléka vykazují rozsáhlý polymorfismus, jev, ke kterému může docházet, pokud v genetické výbavě organismu existují dvě nebo více forem téhož genu. Genetická variabilita může velmi ovlivňovat složení mléka, ale například i technologické vlastnosti mléka – tvorbu sýreniny apod.

Ke zjištění obsahu bílkovin v mléce lze využít mnoha metod, destruktivních či nedestruktivních. Jejich aplikace se liší podle nároků na analýzu a podle charakteru analyzované frakce. Mezi často využívané patří například stanovení podle Kjeldahla, stanovení kapalinovou chromatografií nebo stanovení hmotnostní spektrometrií.

Klíčová slova: kozí mléko, výživa, kasein, syrovátkové bílkoviny, polymorfismus

Characterization of Protein Fractions in Milk of Small Ruminants

Summary

Milk is key for the nutrition of young mammals, including humans. It contains all of the main nutrients: carbohydrates, lipids and proteins. It is reported that goat 's milk may be less allergenic compared to cow 's milk, mainly due to the lower content of protein named α s1-casein, which is considered to be one of the main allergens in cow 's milk. It is also nutritionally suitable due to smaller fat globules, which can facilitate its digestion. The fatty acid profile of milk fat is also beneficial for human health. The popularity of goat 's milk is growing and its products, such as cheese, are favourite delicacies.

Goat 's milk contains all the essential amino acids and is full-fledged source of proteins, which can be divided into major (casein and whey proteins) and minor (immunoglobulins). Casein proteins include: α s1-casein, α s2-casein, β -casein and κ -casein, optionally γ -casein, a product formed by the fragmentation of β -casein. In milk, they are found in the form of casein micelles, mostly globular formations that may contribute to the properties of milk. The main whey proteins are: α -lactalbumin and β -lactoglobulin.

Proteins should be a part of a balanced diet. Proteins are difficult to replace by other nutrients. In the human body, they provide a number of key functions, such as construction, transport, control and regulation and many others.

The content and quality of milk proteins are important in the technological processing of milk. Proteins affect both the technological properties and the quality of dairy products.

The composition of milk, but also the proportion of proteins is determined by many influences, such as genetic factors (heritability) or external factors (animal nutrition, milking technique). The quality and safety of milk can be negatively affected by health (mastitis), stress, poor hygiene during milking process, improper storage and transport of milk.

It is generally known that goat 's milk proteins exhibit extensive polymorphism, a phenomenon that may occur when two or more forms of the same gene exist in the genetic set of an organism. Genetic variability can greatly affect the composition of milk, but also, for example, the technological properties of milk – the formation of the curd, etc.

Many methods, destructive or non-destructive, can be used to determine the protein content of milk. Their application differs according to the requirements for the analysis and according to the character of the analyzed fraction. Often used methods include, for example Kjeldahl method, liquid chromatography methods or mass spectrometry determinations.

Keywords: goat 's milk, nutrition, casein, whey proteins, polymorphism

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Stručná charakteristika mléka	10
3.1.1 Význam v lidské výživě	11
3.1.2 Rozdělení mlék	11
3.2 Kozí mléko a jeho složení	12
3.3 Účinky na lidské zdraví	13
3.3.1 Laktózová intolerace	13
3.3.2 Galaktosémie	13
3.3.3 Alergie na bílkoviny mléka	13
3.3.4 Hypoalergenicita kozího mléka	14
3.3.5 Antibakteriální vlastnosti kozího mléka	14
3.4 Složení kozího mléka	15
3.4.1 Obsah vody	15
3.4.2 Obsah lipidů	15
3.4.3 Obsah sacharidů	17
3.4.4 Obsah bílkovin	18
3.4.5 Další významné látky	18
3.4.6 Faktory ovlivňující produkci a složení kozího mléka	19
3.5 Dusíkaté látky v kozím mléce	20
3.5.1 Hlavní bílkoviny	20
3.5.2 Minoritní bílkoviny	20
3.5.3 Látky nebílkovinné povahy	20
3.5.4 Struktura bílkovin	21
3.5.5 Biosyntéza látek v mléčné žláze	21
3.5.6 Vlastní biosyntéza bílkovin	21
3.5.7 Polymorfismus bílkovin	21
3.5.8 Fyzikálně-chemické vlastnosti bílkovin	23
3.6 Hlavní bílkovinné frakce	25
3.6.1 Kaseinové bílkoviny	25
3.6.2 Syrovátkové bílkoviny	27
3.6.3 Využití mléčných bílkovin v potravinářském průmyslu	28
3.7 Vybrané metody stanovení bílkovin	29
3.8 Porovnání mléka a kozího, ovčího, kravského	32

4 Závěr	33
5 Literatura.....	34
6 Seznamy	38
6.1 Seznam tabulek.....	38
6.2 Seznam obrázků	38

1 Úvod

Chov drobných přežvýkavců se v současné době, s rozvojem biofarm, ekologického zemědělství a udržitelného hospodaření, stává aktuálním tématem. Cílem nemusí být pouze produkce mléka pro výživu mláďat a lidí, ale i udržení zaměstnanosti v regionu, krajinaotvorba nebo agroturistika.

Mléko slouží jako první potrava všech savců. Jeho tvorba probíhá v mléčné žláze samice, následně je sáno mláďaty nebo dojeno člověkem. Zahájení tvorby mléka i jeho sekrece jsou řízeny hormonálně. Po celou dobu laktace poskytuje mláďatům živiny potřebné pro jeho růst a další vývoj.

Nejen mléko samotné, ale i výrobky z něj – sýr, jogurt, tvaroh, smetana, máslo nebo zmrzlina, se již v minulosti staly nedílnou a důležitou součástí jídelníčku člověka. Klíčovou roli hraje nejen v dětském věku, ale i v dospělosti.

Zastoupení jednotlivých složek mléka se liší podle živočišného druhu a plemene, stadia laktace, zdravotního stavu zvířete, výživy zvířete i vlivem dalších faktorů. Obecně je ceněno pro vysoký obsah kvalitních bílkovin, esenciálních aminokyselin, vitaminů, minerálních látek a dalších zdraví prospěšných látek. Vápník, prvek potřebný pro výstavbu kostí, zubů a správnou činnost svalů, je z mléka dobře vstřebatelný pro lidský organismus. V kombinaci s pestrou vyváženou stravou a pohybem může působit jako prevence proti osteoporóze.

V neposlední řadě mléko obsahuje i řadu vysoce specifických enzymů, např. laktoperoxidázu a lysozym, které se podílí na ochranném systému mléka působící proti jeho kažení.

Z hlediska obsahu bílkovin lze mléka rozdělit na: kaseinová – převažují kaseinové bílkoviny a je typické pro přežvýkavce, a albuminová – převažují albuminové bílkoviny a je typické pro masožravce a patří sem i mléko mateřské.

V České republice je nejčastěji konzumováno mléko kravské – samostatně nebo jako součást nápojů, mléčných výrobků a řady dalších pokrmů.

Pro část populace může být ale kravské mléko z výživového hlediska nevhodné. Důvodem může být alergie nebo intolerance. Alergie je nepřiměřenou reakcí imunitního systému na bílkoviny mléka. V takovém případě je nutné ze stravy zcela vyřadit mléčné výrobky. Bílkoviny pak musí být doplňovány z jiného zdroje. Intolerance je zapříčiněna nedostatečným působením nebo absencí enzymu laktázy pro štěpení mléčného cukru laktózy. Alternativou je konzumace mléčných výrobků se sníženým obsahem laktózy, jako jsou sýry nebo jogurty.

Mezi další konzumovaná mléka patří kozí mléko a ovčí mléko. Kozí mléko se vyznačuje specifickou chutí a vůní a vyšším obsahem volných mastných kyselin. Tuk je zde rozptýlen jemněji než u mléka kravského a mléko je tedy lépe stravitelné. Pro ovčí mléko je charakteristická natrpklá chuť, vyšší obsah minerálních látek a sušiny.

Práce je věnována především charakteristice bílkovin kozího mléka.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo na základě odborné literatury vytvořit ucelený literární přehled o složení a kvalitě látek bílkovinné povahy, tj. obecná charakteristika, struktura a biosyntéza těchto látek v mléce malých přežvýkavců. Rovněž byla rozebrána problematika genetického polymorfismu či analytické metody pro stanovení těchto látek.

3 Literární rešerše

3.1 Stručná charakteristika mléka

Mléko je tekutina živočišného původu sloužící k výživě mláďat savců, včetně člověka. Pochází z mléčné žlázy, kde dochází k jeho syntéze, shromažďování a odkud je následně sáno. Tvorba a vylučování mléka jsou označovány souhrnným pojmem laktace a jsou řízeny hormonálně. Délka laktace se liší podle živočišného druhu.

Složení mléka je determinováno věkem zvířete, výživou, živočišným druhem, plemenem, zdravotním stavem a řadou dalších činitelů (Ceballos et al. 2009; Pereira 2014). K lidské výživě může být využito pouze mléko, které splňuje legislativní požadavky, především zdravotní nezávadnost.

Hygienické požadavky na produkci syrového mléka a mleziva jsou dány Nařízením Evropského parlamentu a Rady ES č. 853/2004 a Nařízením komise (ES) č. 1662/2006 a uvádí následující:

Syrové mléko a mlezivo musí pocházet od zvířat:

- a) která nevykazují žádný příznak nakažlivé choroby přenosné mlékem a mlezivem na člověka;
- b) která jsou v celkově dobrém zdravotním stavu, nevykazují známky nákazy, která by mohla mít za následek kontaminaci mléka a mleziva, a zejména netrpí žádnou infekcí pohlavního ústrojí doprovázenou výtokem, ani enteritidou s průjmem, doprovázenou horečkou, nebo viditelným zánětem vemene;
- c) která nevykazují žádné zranění vemene, jež by mohlo mít vliv na mléko a mlezivo;
- d) kterým nebyly podány nepovolené látky či přípravky a která nebyla protiprávně ošetřena ve smyslu směrnice 96/23/ES;
- e) u nichž byla v případě podání povolených přípravků či látek dodržena ochranná lhůta stanovená pro tyto přípravky a látky.

Pozornost je věnována především potenciálnímu výskytu brucelózy a tuberkulózy, nebezpečných alimentárních onemocnění přenosných na člověka, jejichž původcem mohou být bakterie *Brucella* spp. a *Mycobacterium* spp. Pokud jsou kozy chovány společně s kravami, je třeba je prohlížet a vyšetřovat na tuberkulózu.

Výše uvedená legislativa stanovuje i další požadavky – například celkový obsah mikroorganismů (CPM) při 30 °C na 1 ml mléka, v syrovém kravském mléce má být obsah $\leq 100\,000$. Dle nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 853/2004 může být mléko s hodnotou TMC nepřesahující 500 000 CPM a pro *Staphylococcus aureus* 500 CPM použito k výrobě potravin vyrobených ze syrového kozího mléka. Pasterované kozí mléko určené pro potravinářské výrobky nesmí však překročit 1 500 000 CPM (EU 2004). Obsah nebezpečných látek, jako jsou rezidua veterinárních léčiv nebo těžké kovy musí být pravidelně kontrolován. Na celkové jakosti mléka se podílí nejen správná technika dojení, ale i dodržování hygieny a sanitace při další manipulaci a zpracování.

Po porodu je produkováno mlezivo, nezralé mléko, nazývané též kolostrum, které se liší svým složením od mléka zralého a je určeno pro prvotní výživu mláďete. Obsahuje významné množství imunoglobulinů, látek bílkovinné povahy, které se podílejí na obranyschopnosti organismu. Přežvýkavci mají omezenou schopnost přenášet imunoglobuliny do plodu v děloze, a proto se mláďata rodí s relativně nízkou imunitou, v porovnání s jinými živočišnými druhy. (Stelwagen 2011).

Zralé mléko, také nazývané pravé, je vylučováno několik dní po narození mláděte a obsahuje všechny látky potřebné pro jeho správný růst a vývoj.

Mezi přežvýkavce produkující mléko patří samozřejmě i další živočišné druhy, například: krávy, ovce, buvoli nebo lamy, avšak tato práce je zaměřena převážně na kozí mléko.

3.1.1 Význam v lidské výživě

První potrava, se kterou se člověk již na počátku svého života setkává je mateřské mléko. V některých případech je možné nahradit jej mlékem od jiných živočišných druhů, například kravským v podobě hydrolyzovaných bílkovin syrovátkových či kaseinových. Na ty může nicméně vznikat alergie, především v prvních letech života. Jako alternativní zdroj pro kojeneckou výživu lze využít i mléko kozí nebo oslí (Selvaggi et al. 2014). Kozí mléko by v tomto případě však mělo být obohaceno o listovou kyselinu, laktózu a některé vitaminy, zejména pokud je zamýšleno jako výživa pro kojence mladší šesti měsíců (Park et al. 2017).

Pro tu část konzumentů, kterým ze zdravotních důvodů, například alergie nebo intolerance není doporučováno mléko samotné, nabízí dnešní trh mléčné výrobky se sníženým obsahem laktózy, bezlaktózové nebo jinak upravené, podle potřeb a přání zákazníka.

Hodgkinson et al. (2018) uvádí, že z živočišné říše pouze člověk využívá mléko od jiných druhů pro svoji výživu. Podle Pereira (2014) je člověk jediným savcem, který využívá mléko k výživě po celý svůj život, což může vyvolávat sporné otázky, zda je tento zvyk nezbytný.

Charakteristika vybraných výrobků z kozího mléka

Kozí mléko lze konzumovat v podobě různých mléčných výrobků – sýrů, fermentovaných nápojů, jogurtů či sladkostí. Ribeiro & Ribeiro (2010) uvádějí, že kozí sýr byl pravděpodobně poprvé vyroben již v Mezopotámii. Sýry se dnes u konzumentů těší stále větší oblibě a patří, díky svým organoleptickým vlastnostem (chuti, vůni, textuře), mezi vyhledávané speciality. Lze je vyrábět ze syrového nebo pasterovaného mléka, nicméně z hlediska zdravotní nezávadnosti (výskyt patogenních organismů) je doporučováno využít mléko pasterované. Mezi další výrobky patří kefir – osvěžující nápoj s obsahem ethanolu, oxidu uhličitého a charakteristickou viskozitou. Vyrábí se procesem fermentace a patří mezi tradiční nápoje, především v Asii (Ribeiro & Ribeiro 2010). Využití kozího mléka pro výrobu másla, je, díky vlastnostem mléčného tuku, omezené.

3.1.2 Rozdělení mlék

3.1.2.1 Podle druhu savce

Do této kategorie patří mléka od domestikovaných druhů zvířat – například kravské, kozí, ovčí, lamí nebo buvolí. Nejvíce konzumovaným mlékem v České republice je mléko kravské. Spotřeba kravského mléka a výrobků z něj činila za rok 2019 241,7 l na obyvatele. Spotřeba kozího mléka za rok 2019 činila 0,1 l na obyvatele (ČSÚ, 2020).

3.1.2.2 Podle obsahu bílkovin

Podle obsahu bílkovin jsou rozlišována mléka kaseinová a albuminová. Kaseinová mléka obsahují více než 75 % bílkoviny kaseinu a jsou typická například pro přežvýkavce – krávy, ovce a kozy. Albuminová mléka obsahují méně než 75 % bílkoviny kaseinu, především albumin a jsou produkována živočichy s jednoduchou stavbou žaludku, jako jsou masožravci, ale i někteří další živočichové, například koně, oslí, prasata a patří sem i lidské mléko (Gajdůšek 2003).

3.2 Kozí mléko a jeho složení

Kozy patřily mezi první zvířata domestikovaná člověkem (Lad et al. 2017; Park et al. 2017). Jejich domestikace proběhla přibližně před 10 000 lety v horských oblastech dnešního Íránu (Selvaggi et al. 2014).

V minulosti byl chov koz považován za nevýhodný, byl doménou chudších vrstev obyvatel, jeho ekonomický význam byl podceňován a potenciál přehlížen (Lad et al. 2017). V současné době jsou kozy chovány nejen za účelem živočišné produkce, ale i pro zvýšení biodiverzity nebo v rámci agroturistiky. Výhodná je jejich schopnost pohybovat se i v těžko přístupném terénu (například po strmých horských svazích) a spásat zde vegetaci. Tato vlastnost může přispívat k diverzitě rostlinných druhů (Yangilar 2013).

Své místo mají i v ekologickém hospodářství a kozí sýry patří mezi vyhledávané speciality (Selvaggi et al. 2014; Park et al. 2017).

Mléko je rovněž zdrojem vitaminů, lipofilních: A, D, E, i hydrofilních: C a skupiny B a minerálních prvků jako jsou vápník, fosfor, hořčík, zinek, měď, selen a draslík (Pereira 2014), viz Tabulka č. 1. Lad et al. (2017) uvádí, že mléko je rovněž zdrojem chloru.

Ve studii Park et al. (2017) je uvedeno, že kozí mléko obsahuje průměrně 3,8 % tuku, 3,5 % bílkovin, 4,1 % laktózy a 0,8 % popelovin.

Tabulka č. 1: Zastoupení minerálních prvků a vitaminů v různých druzích mlék (upraveno podle Park et al. 2017).

	Kozí mléko	Kravské mléko
	Množství ve 100 g mléka	
Minerální prvek		
Ca [mg]	134,00	122,00
P [mg]	121,00	119,00
K [mg]	181,00	152,00
Cl [mg]	150,00	100,00
Mg [mg]	16,00	12,00
Na [mg]	41,00	58,00
Fe [mg]	0,07	0,08
Vitamin		
Vitamin A [IU]	185,00	126,00
Vitamin D [IU]	2,30	2,00
Vitamin C [mg]	1,29	0,94
Vitamin B12 [μ g]	0,07	0,36

3.3 Účinky na lidské zdraví

Bylo zjištěno, že konzumace kozího mléka může mít pozitivní vliv na lidské zdraví (Yangilar 2013; Petrotos et al. 2014). Pozornost je v současné době věnována bioaktivním peptidům, jejichž prekurzory jsou mléčné bílkoviny. Tyto peptidy vykazují zajímavé vlastnosti, například antimikrobiální, ovlivňující imunitní nebo nervový systém, což je mimochodem důvod, proč je před spaním doporučována sklenice mléka (Petrotos et al. 2014).

Peptidy odvozené od kaseinových bílkovin, jež jsou zastoupeny v mléce i mléčných výrobcích, mohou ovlivňovat kardiovaskulární systém a mohou působit jako prevence proti vzniku trombózy i vysokému krevnímu tlaku (Marletta et al. 2007; Petrotos et al. 2014).

V porovnání s mlékem kravským, kozí mléko obsahuje tukové částice rozptýlené v menších kuličkách s vyšším podílem mastných kyselin o střední délce řetězce, což vede k lepší stravitelnosti mléka (Attaie & Richter 2000; Lad et al. 2017; Park et al. 2017; Hodgkinson et al. 2018).

Mimo jiné již zmíněné vitaminy, obsahuje mléko i vitaminy skupiny B, které jsou nezbytnou součástí některých enzymů, jako jejich kofaktory a rovněž mají nezastupitelné místo v řadě metabolických procesů, jako je proces přenosu energie, syntéza hormonů nebo přenos nervových vzruchů (Pereira 2014).

3.3.1 Laktózová intolerance

Laktóza, nazývaná také mléčný cukr, patří mezi oligosacharidy a skládá se ze dvou monosacharidových jednotek – glukózy a galaktózy, které jsou spojeny glykosidickou vazbou. Má volný poloacetalový hydroxyl, což znamená, že patří mezi redukující cukry. Laktózová intolerance se může vyskytovat nejen u mléka kravského, ale i u kozího. Nastává v případě, pokud organismus trpí nedostatkem enzymu laktázy nebo omezenou funkčností tohoto enzymu (Lad et al. 2017).

U zdravých jedinců je laktóza hydrolyzována v tenkém střevě, kde je mléčný cukr rozkládán na glukózu a galaktózu, jednoduché cukry, které jsou transportovány do jater za účelem dalšího zpracování. V důsledku intolerance dochází k rozkladu laktózy až v tlustém střevě za vzniku plynů, například oxidu uhličitého a methanu, a dalších nežádoucích látek, jako jsou volné mastné kyseliny s krátkým řetězcem (Pereira 2014). Tyto metabolity mohou způsobovat zažívací potíže – plynatost, průjem, zvracení, nevolnost a bolesti břicha (Lad et al. 2017), projevy laktózové intolerance jsou nicméně individuální. Zmíněná metabolická porucha je způsobena chybou genetické výbavy organismu a je rozšířena u několika etnických skupin (Park et al. 2017), například mezi obyvateli jižní Afriky a Ameriky.

Pro jedince trpící touto intolerancí existují na trhu alternativní mléčné výrobky z kravského mléka s upraveným obsahem laktózy, nebo je možné konzumovat produkty z kozího mléka, které obsahuje méně laktózy.

3.3.2 Galaktosémie

Toto dědičné onemocnění je způsobeno neschopností organismu metabolizovat galaktózu, která vzniká společně s glukózou, při štěpení mléčného cukru. Vada se vyskytuje u jedinců, kteří mají nedostatek enzymu galaktóza-1-fosfát-uridylyltransferázy (Fox et al. 2015). Alternativou pro takové konzumenty mohou být bezlaktózové mléčné výrobky.

3.3.3 Alergie na bílkoviny mléka

Alergii lze obecně charakterizovat jako nepřiměřenou odpověď imunitního systému organismu na určitou látku – alergen. Mezi potravinové alergie patří alergie na bílkoviny

vyskytující se v kravském mléce. Hlavními alergeny kravského mléka jsou kaseinové bílkoviny, zejména α s1-kasein (Park et al. 2017). Podle Pereira (2014) se tato alergie může rozvinout již v útlém věku a je mnohem častější u dětí než u dospělých jedinců. Mezi symptomy se mohou objevit trávicí a dýchací potíže, u těžších případů může nastat anafylaktický šok, projevy alergie jsou však individuální a závisí na citlivosti daného organismu.

3.3.4 Hypoalergenicita kozího mléka

Řešením pro osoby trpící alergií na bílkoviny kravského mléka může být konzumace mléka kozího. Park et al. (2017) uvádí, že bílkoviny z kozího mléka jsou snadněji stravitelné a aminokyseliny, kterými jsou tvořeny, jsou lidským organismem vstřebávány efektivněji. Almaas et al. (2006) ve své studii uvádí, že bílkoviny z kozího mléka jsou při trávení degradovány rychleji než bílkoviny mléka kravského. Kozí mléko obsahuje méně alergenních bílkovin, zejména α s1-kaseinu, který je u kravského mléka považován za hlavní bílkovinu vyvolávající alergickou reakci (Dan et al. 2016; Lad et al. 2017). Stelwagen (2011) nicméně uvádí, že bílkoviny kozího mléka jsou lidskému organismu stejně cizí, jako bílkoviny mléka kravského. Nelze tedy jednoznačně tvrdit, že kozí mléko je vhodné pro alergiky a alergii nemůže vyvolat.

3.3.5 Antibakteriální vlastnosti kozího mléka

Kozí mléko přirozeně obsahuje řadu enzymů. Jedním z nich je i laktoperoxidáza. Této látce je věnována pozornost v souvislosti s jejími antimikrobiálními vlastnostmi, které mohou působit proti růstu patogenních organismů, z nichž někteří mohou být původci vážných onemocnění, například cholery (*Vibrio cholerae*) nebo tyfu (*Salmonella typhi*) (Yadav et al. 2016). Mezi další látky s enzymatickým účinkem v mléce patří například lysozym, kataláza, xanthinoxidáza, dále lipázy, proteázy a další. Antimikrobiální aktivitu vykazuje i laktoferin (Park et al. 2007).

3.4 Složení kozího mléka

McCarthy & Singh (2009) charakterizují mléko jako komplexní koloidní disperzi, která obsahuje tukové kuličky, kaseinové micely, syrovátkové bílkoviny, laktózu, minerální látky a další komponenty. Zastoupení některých složek je uvedeno v Tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Chemické složení kozího mléka (upraveno podle Ceballos et al. 2009).

Složka [%]	Kozí mléko
Bílkoviny	3,48
Tuk	5,23
Popeloviny	0,75
Laktóza	4,11

3.4.1 Obsah vody

Významnou složkou mléka je voda. Její obsah hraje důležitou roli při technologickém zpracování mléka a může ovlivňovat fyzikální, chemické i mikrobiologické procesy při výrobě mléčných výrobků – sýrů, jogurtů, ale také másla a dalších potravin. Průměrný obsah vody v pasterovaném kozím mléce je přibližně 89 g na 100 g mléka, v porovnání s pasterovaným mlékem kravským, které obsahuje v průměru 88 g na 100 g mléka (Fox et al. 2015). Zbytek po odstranění vody se nazývá sušina.

3.4.2 Obsah lipidů

Pro kozí mléko, je v porovnání s mlékem kravským i mateřským, typický vyšší obsah mastných kyselin se střední délkou uhlíkatého řetězce – kapronové (C6:0), kaprylové (C8:0) a kaprinové (C10:0), viz Tabulka č. 3, kterým je přisuzován podíl na typickém kozím aromatu mléka (Raynal-Ljutovac et al. 2008; Park et al. 2017). Tento zvýšený obsah je vysvětlován působením bachorové mikrobioty koz během trávení přijaté potravy (Park et al. 2017).

Tabulka č. 3 Obsah kyselin [mg/100 g mléka] (upraveno podle Ceballos et al. 2009).

	Kozí mléko	Kravské mléko
Kapronová kyselina	171,68	77,86
Kaprylová kyselina	192,20	57,80
Kaprinová kyselina	579,10	114,91

Fox et al. (2015) zmiňuje, že pro mléko přežvýkavců je charakteristický vyšší obsah máselné kyseliny (C4:0). Vysvětluje to tak, že β -hydroxybutyrát, sloučenina, která vzniká působením bachorové mikrobioty ze sacharidů, je transportována krví do mléčné žlázy, kde je poté redukována na máselnou kyselinu.

Hlavními prekurzory pro tvorbu mastných kyselin, které jsou součástí molekul lipidů, jsou u přežvýkavců sloučeniny acetát a β -hydroxybutyrát, které vytváří bachorová mikrobiota a jsou přenášeny krví. Tuk v kozím mléce je zastoupen v podobě emulze „olej ve vodě“. Stabilita emulze je ovlivněna nejen složením mléka, ale i jeho uchováváním a dalšími případnými operacemi, například přepravou (Fox et al. 2015). Autor dále uvádí, že lipidové emulze, mezi které patří i mléko, lze považovat za méně stabilní. Důvodem je velký rozdíl hustoty mezi lipidovou a vodnou fází a vysoké mezipovrchové napětí mezi zmíněnými fázemi.

Mléčný tuk se vyskytuje především v podobě tukových kuliček, které jsou tvořeny převážně triacylglyceroly a mají menší velikost (3,5 μm) oproti mléku kravskému (4,5 μm), viz Tabulka č. 4, což je významné pro jeho snadnější stravitelnost (Lad et al. 2017; Park et al. 2017). Malé kuličky se v mléce lépe rozptýlí a vytvoří větší plochu pro působení enzymů, což lipázám usnadní rozklad tuku (Park et al. 2017). Vstřebání tuku může být usnadněno i tím, že kyseliny se střední délkou řetězce, po uvolnění z triacylglycerolů, mohou být přímo absorbovány buňkami tenkého střeva, bez nutné předchozí esterifikace (na rozdíl od kyselin s dlouhým řetězcem) (Raynal-Ljutovac et al. 2008).

Důležitou součástí buněčných membrán jsou dle studie Park et al. (2017) fosfolipidy, jejichž průměrný obsah v kozím mléce uvádí 35,4 % fosfatidyletanolaminu, 3,2 % fosfatidylserinu, 4,0 % fosfatidylinositolu, 28,2 % fosfatidylcholinu a 29,2 % sfingomyelinu. Autor dále uvádí, že při uchovávání mléka po dobu 1 až 2 dní při 4 °C, se obsah fosfolipidů zvyšuje, což je pravděpodobně zapříčiněno rozpadem tukových kuliček.

Tabulka č. 4: Průměrná velikost tukových kuliček u mlék (upraveno podle Park et al. 2017).

Průměr [μm]	Kozí [%]	Kravské [%]	Ovčí [%]
1,50	28,40	10,70	28,70
3,00	34,70	32,60	39,70
4,50	19,70	22,10	17,30
6,00	11,70	17,90	12,10
7,50	4,40	12,20	2,00
9,00	1,00	3,10	0,20
10,50	0,20	1,40	0,00
průměr	3,49	4,55	3,30

3.4.2.1 Látky lipofilní povahy

Další látky lipofilní povahy jsou látky, které se běžně vyskytují společně s tuky, například látky steroidní povahy, z nichž některé jsou prekurzory pro syntézu hormonů. Dále se v kozím mléce nacházejí vitaminy, z nichž nejvýznamnější je vitamin A, ale i D a E. Vyšší obsah vitamínu A je způsoben tím, že kozy veškerý β -karoten (prekurzor vitamínu A) přijatý potravou přeměňují na vitamin A. Tím lze také vysvětlit zářivě bílou barvu kozího mléka (Lad et al. 2017).

3.4.2.2 Konjugovaná kyselina linolová

Zajímavá je přítomnost konjugované kyseliny linolové (CLA), která je směsí izomerů kyseliny linolové (C18:2), které obsahují nenasycené dvojnás vazby v konjugaci. Nejvíce biologicky aktivním izomerem je *cis*-9, *trans*-11-oktadekadienová kyselina, která tvoří více než 82 % z celkových izomerů CLA v mléčných výrobcích (Park et al. 2017). CLA je v poslední době věnována pozornost pro její protirakovinné vlastnosti, ačkoliv jejich přesný mechanismus nebyl dosud zcela objasněn (Lad et al. 2017). Pereira (2014) uvádí, že skupina těchto izomerů působí nejen antikancerogenně, ale pozitivně ovlivňuje i zdraví kardiovaskulárního systému a obranyschopnosti organismu.

3.4.3 Obsah sacharidů

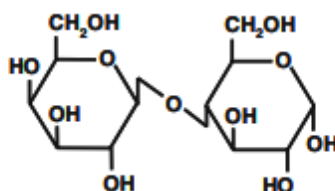
3.4.3.1 Laktóza

Jednodušší sacharidy, cukry, jsou ve výživě člověka rychlým zdrojem energie. Nejhojněji zastoupeným sacharidem v kozím mléce je laktóza, nazývaná též mléčný cukr. Její systematický název je O- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)- α -D-glukopyranóza. Poloacetalová skupina glukózy je volná, takže laktóza se může vyskytovat v podobě obou anomerů. Anomery se mohou lišit svými vlastnostmi, například rozpustností (Fox et al. 2015).

Je to disacharid skládající se z monosacharidů galaktózy a glukózy, jež jsou spojeny β (1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou, viz Obrázek č. 1. Jeho syntéza probíhá v mléčné žláze z glukózy, která je absorbována z krve. Má několik funkcí. Slouží nejen jako zdroj energie, ale pomáhá udržovat osmotický tlak v mléčné žláze (Park et al. 2007; Fox et al. 2015) a je důležitým substrátem při výrobě fermentovaných mléčných výrobků (Fox et al. 2015).

Při trávení je laktóza hydrolyzována β -galaktosidázou, známou také pod názvem laktáza. Tento enzym, působící v tenkém střevě, laktózu rozštěpí na monosacharidy, které jsou vstřebány a transportovány do jater k dalšímu zpracování. V játrech je galaktóza metabolizována na glukózu (Pereira 2014). Předpokládá se, že přítomnost laktózy v organismu ovlivňuje vstřebávání vápníku (Fox et al. 2015).

V porovnání s mlékem kravským je její obsah v kozím mléce nižší (Lad et al. 2017), Park et al. (2017) uvádí, že o 0,2-0,5 %. Obsah v mléce se mění v závislosti na stádiu laktace. Při zánětlivém onemocnění mléčné žlázy dochází ke sníženému vylučování laktózy (Fox et al. 2015).



Obrázek č. 1: Laktóza (Playne & Crittenden 2009).

3.4.3.2 Oligosacharidy

Ostatní oligosacharidy, složené ze 3-10 monosacharidových zbytků, jež byly v kozím mléce identifikovány, jsou velmi podobné sacharidům z mateřského mléka a jsou ceněny pro své protizánětlivé vlastnosti (Lad et al. 2017). Fox et al. (2015) zmiňuje, že mlezivo je v porovnání se zralým mlékem bohatší na oligosacharidy. Park et al. (2007) i Raynal-Ljutovac et al. (2008) shodně uvádí, že oligosacharidy, které jsou obsažené v kozím mléce, mohou podporovat růst bifidobakterií.

3.4.3.3 Laktulóza

Dalším významným sacharidem je laktulóza. Vzniká z laktózy při záhřevu mléka a často je využívána jako indikátor tepelného ošetření mléka. Mezi její výhody patří, že není metabolizována bakteriemi v ústní dutině, a proto je nekariogenní – nepodílí se na vzniku a rozvoji zubního kazu. Protože nepodléhá hydrolyze β -galaktosidázou v tenkém střevě, prochází až do tlustého střeva, kde může být metabolizována bakteriemi mléčného kvašení,

například *Bifidobacterium* spp. a podporovat jejich růst, což pozitivně ovlivňuje střevní mikrobiotu (Fox et al. 2015).

3.4.3.4 Galaktóza

Galaktóza je monosacharid, který je společně s glukózou, součástí disacharidu laktózy. Je syntetizována v mléčné žláze z glukózy, která je absorbována z krve (Fox et al. 2015). Může vznikat i enzymatickým rozštěpením laktózy laktázou. Její deriváty, například galaktosaminy, hrají významnou roli při tvorbě buněčných membrán (Fox et al. 2015).

3.4.4 Obsah bílkovin

Sloučeniny označované jako bílkoviny, jsou nezbytné pro výstavbu a obnovu tkání všech živočichů. Jejich základ tvoří aminokyseliny, z nichž některé jsou pro člověka esenciální – lidské tělo si je neumí syntetizovat, a proto musí být přijímány potravou. V kozím mléce lze bílkoviny rozdělit na několik skupin: kaseinové bílkoviny, syrovátkové bílkoviny, minoritní bílkoviny (do této skupiny patří zmíněné imunoglobuliny) a nebílkovinné látky dusíkaté povahy (Lad et al. 2017). Raynal-Ljutovac et al. (2008) ve své studii uvádí, že celkový obsah bílkovin v kozím mléce se může pohybovat v rozmezí 2,6-4,1 g/l.

Mezi kaseinové bílkoviny patří α 1-kasein, α 2-kasein, β -kasein, κ -kasein, γ -kasein. Do skupiny syrovátkových bílkovin je zařazován α -laktalbumin, β -laktoglobulin a imunoglobuliny (Park et al. 2017). Zastoupení kaseinu je ovlivněno genetickým polymorfismem (Selvaggi et al. 2014). Tato práce se bude detailněji věnovat pouze bílkovinám kaseinovým a syrovátkovým. Syrovátkové bílkoviny jsou bohaté na aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, jako jsou leucin, izoleucin, valin a lysin, zatímco kaseinové bílkoviny obsahují více histidinu, methioninu a fenylalaninu (Pereira 2014). Fox et al. (2015) uvádí, že v kaseinových bílkovinách se vyskytují vysoká množství aminokyseliny prolinu, nicméně obsah sirných aminokyselin je velmi nízký, což ovlivňuje jejich biologickou hodnotu, která je 80 (hodnotu 100 má vaječný bílek).

Obsah bílkovin je důležitý pro zpracovatelnost mléka a přímo ovlivňuje kvalitu mléčných výrobků (Albenzio & Santillo 2011).

3.4.5 Další významné látky

3.4.5.1 Bioaktivní peptidy

Tyto sloučeniny mohou vznikat enzymatickým rozkladem některých mléčných proteinů, například během trávení (Park et al. 2007). Jsou popisovány jako fragmenty bílkovin, které mohou být tvořeny 3-20 aminokyselinovými zbytky (Fox et al. 2015). V současné době jsou studovány pro své schopnosti ovlivňovat lidské zdraví, účinky jsou shrnuty v Tabulce č. 5. Marletta et al. (2007) uvádí, že kasomorfíny, jejichž prekurzory jsou α - a β -kaseiny, působí jako opiodní agonisté, zatímco kasoxiny, vznikající z κ -kaseinu jako antagonisté. Kasoplateliny, rovněž vznikající z κ -kaseinu vykazují antitrombotickou aktivitu, která může být významná pro zdraví oběhového systému. Z α 1-kaseinu může vznikat isracidin projevující antimikrobiální vlastnosti. Bílkoviny α -laktalbumin a β -laktoglobulin jsou prekurzory α - a β -laktorfinů, které působí jako opiodní agonisté. Například ACE-inhibitor (z angličtiny angiotensin converting enzyme) je studován v souvislosti s léčbou vysokého krevního tlaku (Park et al. 2007).

Tabulka č. 5: Tabulka bioaktivních peptidů (upraveno podle Marletta et al. 2007).

Bioaktivní peptidy	Kaseinový prekurzor	Bioaktivita
Kasomorfíny	α -, β -kasein	Opiodní agonista
Kasoxiny	κ -kasein	Opiodní antagonist
Kasokininy	α -, β -kasein	ACE-inhibitor
Imunopeptidy	α -, β -kasein	Imunomodulace
Kasoplateliny	κ -kasein	Antitrombotické úč.
Fosfopeptidy	α -, β -kasein	Vázání minerálů

3.4.5.2 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které chrání tělo tím, že zneškodňují volné radikály, sloučeniny charakterizované nepárovým elektronem, které mohou v organismu vznikat a způsobovat různá onemocnění. Mléko obsahuje některé látky, u nichž byl pozorován antioxidační charakter. Předpokládá se, že jejich hlavní úlohou je zabraňovat rozkladu mléčných složek, v případě konzumace mléka mohou mít pozitivní vliv na lidské zdraví (Lad et al. 2017). Fox et al. (2015) uvádí, že mezi tyto látky patří například tokoferoly (vitamin E), o kterých se předpokládá, že v mléce působí jako antioxidanty. Jejich obsah lze výrazně ovlivnit složením krmiva (Morrissey & Hill 2009; Fox et al. 2015).

Mezi další lze jmenovat askorbovou kyselinu (vitamin C), která se v kozím mléce nachází v relativně malém množství – Raynal-Ljutovac et al. (2008) uvádí hodnotu 1,30 mg na 100 g mléka. Ve vyšších koncentracích nicméně může působit prooxidačně. Thiolové skupiny β -laktoglobulinu po záhřevu rovněž vykazují antioxidační vlastnosti (Fox et al. 2015).

3.4.6 Faktory ovlivňující produkci a složení kozího mléka

Kozí mléko může vykazovat velkou variabilitu nejen ve svém biochemickém složení, ale i v technologických a bakteriologických vlastnostech, které jsou klíčové pro další zpracování a zdravotní nezávadnost (Yangilar 2013).

Na produkci a složení mléka má vliv mnoho faktorů, z nichž některé jsou: genetické faktory (křížení, dědivost), životní prostředí, věk zvířete, plemenná příslušnost, průběh porodu, průběh laktace (frekvence sání) a její stádium, věk první březosti, období páření, technika dojení, podmínky chovu, výživa zvířete, ošetření mléka po nadojení a případný výskyt chorob (zánět mléčné žlázy – mastitida, metabolická onemocnění) (Raynal-Ljutovac et al. 2008; Yangilar 2013). Park et al. (2017) uvádí, že heritabilita má vliv na výtěžnost mléka z 32 %, zbylých 68 % je ovlivněno vnějšími podmínkami.

Vliv výživy na složení kozího mléka dokazuje Monllor et al. (2020) ve své studii. Uvádí, že u koz, kterým bylo při experimentu podáváno krmivo v podobě artyčokové siláže, došlo v mléce ke zlepšení profilu vyšších nenasycených mastných kyselin, o kterých se předpokládá, že mají pozitivní vliv na lidské zdraví.

3.5 Dusíkaté látky v kozím mléce

3.5.1 Hlavní bílkoviny

Bílkoviny jsou důležitou součástí jídelníčku člověka a zajišťují pro organismus řadu nezastupitelných funkcí – stavební, transportní, regulační, ochrannou a obrannou a mnohé další. Mezi hlavní bílkoviny (mající nejvyšší kvantitativní zastoupení) mléka jsou zařazovány kaseiny a syrovátkové bílkoviny, v kozím mléce se vyskytují v přibližném poměru 80:20 (Selvaggi et al. 2014). Kaseiny se dále dělí na: α 1-kasein, α 2-kasein, β -kasein, κ -kasein a γ -kasein, který je produktem hydrolýzy β -kaseinu. Mezi syrovátkové bílkoviny, nazývané též globulární, je zařazován β -laktoglobulin, α -laktalbumin, sérový albumin a imunoglobuliny (Park et al. 2017), které Selvaggi et al. (2014) řadí k minoritním bílkovinám. Zastoupení některých bílkovinných frakcí shrnuje Tabulka č. 6.

Až na výjimky, jako jsou například imunoglobuliny, dochází k syntéze bílkovin mléka v mléčné žláze, na ribozomech, které jsou umístěny na drsném endoplazmatickém retikulu. Aminokyseliny pro syntézu jsou na místo dopravovány krevní plazmou (Fox et al 2015).

Tabulka č. 6: Zastoupení bílkovinných frakcí [g/100 g bílkovin] (Ceballos et al. 2009).

Bílkovina	Kozí mléko	Kravské mléko
Kaseinové bílkoviny	82,70	82,65
α 1-kasein	18,92	30,80
α 2-kasein	8,52	7,50
β - a κ -kasein	55,26	44,35
Syrovátkové bílkoviny	17,30	17,35

3.5.2 Minoritní bílkoviny

Sloučeniny označované jako minoritní bílkoviny se v mléce vyskytují v nižších množstvích než bílkoviny hlavní. Patří mezi ně sérový albumin, laktoferin a transferin, bílkoviny, které, vážou železo a mají antibakteriální účinky. Fox et al. (2015) do skupiny minoritních bílkovin zařazuje enzymy, například proteinázy, fosfatázy, laktoperoxidázy a xanthinoxidoreduktázy. Do této skupiny je v neposlední řadě zařazován též prolaktin, který podporuje růst mléčné žlázy a tvorbu mléka (Selvaggi et al. 2014).

3.5.3 Látky nebílkovinné povahy

Mléko obsahuje i řadu látek, v jejichž chemické struktuře je zastoupen dusík, ale nejsou bílkovinné povahy. Do této skupiny jsou zařazovány například vitaminy skupiny B, močovina, močová kyselina, amoniak, volně se vyskytující aminokyseliny nebo nukleové kyseliny (Selvaggi et al. 2014). Zastoupení nukleosidů i nukleotidů je nicméně vyšší v mlezivu než ve zralém mléce. Nejhojněji zastoupenou aminokyselinou vyskytující se v kozím mléce volně je taurin. Není považován za esenciální pro člověka, nicméně se předpokládá, že může hrát roli například v procesech detoxikace a při syntéze mastných kyselin (Raynal-Ljutovac et al. 2008). Fox et al. (2015) zmiňuje navíc kreatin, kreatinin a orotovou kyselinu.

3.5.4 Struktura bílkovin

Bílkoviny vznikají proteosyntézou, procesem, který probíhá na ribozomech. V poslední době je věnována pozornost jejich polymorfismu – jevu, který souvisí s počtem alel. Zastoupení bílkovin ovlivňuje vlastnosti mléka – alergenicitu, ale i technologické vlastnosti, například syřitelnost (Fox et al. 2015).

Primární struktura bílkovin je dána pořadím jednotlivých aminokyselin v polypeptidovém řetězci (mluvíme o tzv. sekvenci aminokyselin) a vzniká spojením aminokyselin peptidovou vazbou při translaci. Polohu aminokyseliny ve vznikajícím řetězci určuje triplet nukleotidových bází z m-RNA (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Na sekundární struktuře se podílejí vodíkové můstky a vyjadřuje rozložení polypeptidových řetězců v prostoru, nejčastějšími formami jsou: α -helix, kdy se řetězec stočí do šroubovice, která může být levotočivá nebo pravotočivá, nebo β -struktura jejíž podoba připomíná skládaný list a je tvořena dvěma řetězci (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Terciární struktura je výsledkem působení několika dalších interakcí, jako jsou elektrostatické síly, nepolární interakce, disulfidové můstky a další. Tvoří trojrozměrné uspořádání molekuly. V kvartérní struktuře jsou menší podjednotky spojeny do jednoho funkčního celku (Velíšek a Hajšlová, 2009).

3.5.5 Biosyntéza látek v mléčné žláze

Složky mléka jsou syntetizovány z molekul, které jsou absorbovány z krve. V mléčné žláze neprobíhá pouze syntéza hlavních bílkovin mléka, vznikají zde i další významné látky, například strukturální bílkoviny, hormony či enzymy (Stelwagen 2011). Ta má u všech živočišných druhů stejnou základní strukturu a nachází se mimo tělní dutinu (Fox et al. 2015). Děj probíhá ve speciálních epiteliálních buňkách. Tyto sekreční buňky jsou seskupeny okolo centrálního prostoru – lumenu a vytváří sférické či hruškovité útvary, jež jsou známé jako alveoly. Mléko je z těchto buněk vylučováno do lumenu alveol. Když je lumen naplněn, dochází ke kontrakci myoepiteliálních buněk, kterými je obklopen. Mléko je tak odváděno systémem kanálků k dutinám, kde setrvává do kojení či dojení (Vilotte et al. 2013; Fox et al. 2015).

3.5.6 Vlastní biosyntéza bílkovin

Aminokyseliny pro syntézu mléčných bílkovin jsou získávány z krevní plazmy. Výjimku tvoří například sérový albumin a některé z imunoglobulinů, které se přímo přenášejí z krve bez jakýchkoliv úprav (Stelwagen 2011; Fox et al. 2015). K procesu polymerace aminokyselin dochází na útvarech zvaných ribozomy, které se nacházejí na povrchu drsného endoplazmatického retikula (Fox et al. 2015).

Proces je řízen laktogenními hormony, jako jsou inzulin, prolaktin a glukokortikoidy, které regulují syntézu bílkovin v mléčné žláze (Dan et al. 2016). Hormony, společně s dalšími iniciačními faktory, vyvolávají expresi genů, a tedy i tvorbu bílkovin, která probíhá stejným mechanismem, jako u všech jiných buněk – procesy transkripce (probíhající v jádře buňky) a translace (probíhající na ribozomech, jež jsou umístěny na povrchu endoplazmatického retikula) (Stelwagen 2011). Dan et al. (2016) ve své studii zmiňuje, že exprese genů, jež kódují mléčné bílkoviny, s výjimkou laktoferinu, se během laktace významně zvyšuje.

3.5.7 Polymorfismus bílkovin

Tento jev může nastat, pokud pro jednu vlastnost organismu existují v jeho genetické výbavě alespoň dvě varianty téhož genu, nazývané také alely (Formaggioni et al. 1999).

K detekci polymorfismu byla dříve využívána elektroforéza, v posledních letech je nicméně nahrazována například hmotnostní spektrometrií v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (Marletta et al. 2007). Genetický polymorfismus mléčných bílkovin může ovlivňovat kvantitativní i kvalitativní vlastnosti mléka (Albenzio & Santillo 2011).

Více než 95 % bílkovin, které jsou obsaženy v mléce přežvýkavců, je syntetizováno z šesti strukturních genů, které kódují bílkoviny α -laktalbumin, β -laktoglobulin a α s1-kasein, α s2-kasein, β -kasein, κ -kasein (Martin et al. 2002; Selvaggi et al. 2014). Moioli et al. (1998) uvádí, že polymorfismy mléčných bílkovin mohou být způsobeny záměnou nebo delecí aminokyselin v polypeptidovém řetězci.

3.5.7.1 Polymorfismus kaseinů

Geny, které kódují kaseiny byly u koz lokalizovány na chromozomu 6 (Martin et al. 2002, Vilotte et al. 2013). Marletta et al. (2007) uvádí, že geny byly pojmenovány: CSN1S1 pro α s1-kasein, který je složen z 19 exonů, CSN1S2 pro α s2-kasein, který je složen z 18 exonů, CSN2 pro β -kasein, který je složen z 9 exonů a CSN3 pro κ -kasein, který je složen z 5 exonů. Marletta et al. (2007) dále zmiňuje, že každý kasein se skládá ze dvou či více forem, které jsou geneticky podmíněny kodominantními alelami, a primární struktura se liší v závislosti na možných bodových mutacích, insercích nebo delecích. Rozdílnosti v primární struktuře mohou ovlivnit řadu vlastností, jako je například velikost či tvar molekuly nebo její náboj. Kaseiny nacházející se v kozím mléce vykazují rozsáhlý polymorfismus, který může ovlivňovat složení i kvalitu mléka (Marletta et al. 2007).

V kozím mléce byl zjištěn polymorfismus α s1-kaseinu, na němž se podílí nejméně čtrnáct autozomálních alel, může tak existovat sedm proteinových variant, z nichž každá je spojena s jiným stupněm exprese genů. Varianty A, B, C a E α s1-kaseinu se navzájem liší substitucemi aminokyselin, u variant F a G je syntetizováno méně proteinů. U varianty F dochází k vnitřní delecí 37 aminokyselinových zbytků (Martin et al. 2002). Autor dále uvádí, že polymorfismus α s1-kaseinu nemá významný vliv na výtěžnost mléka, avšak přítomnost silných alel je spojena s vyšším obsahem tuku v mléce.

Selvaggi et al. (2014) i Marletta et al. (2007) shodně uvádí, že v kozím mléce bylo identifikováno: devět alel – A, B₁, B₂, B₃, B₄, C, H, L a M, které jsou spojovány s vyšším obsahem α s1-kaseinu (přibližně 3,5 g/l mléka), dvě alely – E a I, pro které je typický výskyt středního obsahu α s1-kaseinu (1,1-1,7 g/l mléka) a tři alely – D, F a G, které zapříčiňují nižší obsah α s1-kaseinu (přibližně 0,45 g/l mléka). Alely pojmenované O₁, O₂ a N jsou označovány jako nulové, protože v případě jejich výskytu k tvorbě α s1-kaseinu v kozím mléce dochází v malém množství nebo vůbec. Takové mléko pak vykazuje menší alergenicitu, než mléko s obsahem α s1-kaseinu (Selvaggi et al. 2014). Předpokládá se, že u alely N je tato vlastnost spojena s delecí cytosinu na 23. nukleotidu v oblasti exonu 9 (Marletta et al. 2007).

V souvislosti s polymorfismem α s2-kaseinu bylo prozatím identifikováno osm alel – A, B, C, D, E, F, G a O. Varianty D a O jsou spojeny s nízkou nebo nulovou syntézou α s2-kaseinu, zatímco v případě ostatních variant dochází k běžné syntéze tohoto proteinu. Bylo zjištěno, že obsah α s2-kaseinu má vliv na alergenicitu mléka. Varianty A, B, C, E a F vykazují vyšší alergenní potenciál, než varianty D a O, pravděpodobně pro zmíněný nižší obsah α s2-kaseinu (Selvaggi et al. 2014). Marletta et al. (2007) uvádí, že vlastnost alely O je způsobena substitucí bázi na 80. nukleotidu exonu 11. Stop kodon vznikne příliš brzy a vytvoří se proto méně bílkoviny nebo vůbec žádná.

U β -kaseinu bylo doposud objeveno osm alel – A, A₁, B, C, D, E, O a O'. Pro varianty A, A₁, B, C, D a E je typický normální obsah kaseinu v mléce. Alely O a O', které jsou označovány jako nulové, jsou pravděpodobně zodpovědné za produkci β -kaseinu v množství, které je podle

Selvaggi et al. (2014) pod mezí detekce. I Marletta et al. (2007) uvádí, že výskyt těchto alel způsobuje nižší produkci β -kaseinu.

U κ -kaseinu bylo identifikováno šestnáct alel – A, B, B', B'', C, C', D, E, F, G, H, I, J, K, L a M. Je pravděpodobné, že alely A a B se vyskytují s nejvyšší četností u plemen španělských, francouzských, italských a egyptských koz. Výskyt varianty F byl prozatím pozorován pouze u divoce žijících koz. Vyšší výskyt alely G byl doposud zjištěn pouze u italských plemen. Předpokládá se, že různý výskyt alel u jednotlivých plemen souvisí s místem vzniku plemene a je ovlivněn genetickým driftem (Yahyaoui et al. 2003). Marletta et al. (2007) uvádí, že varianty D, E, K a M jsou spojeny s vyšším obsahem kaseinu v mléce.

3.5.7.2 Polymorfismus syrovátkových bílkovin

Formaggioni et al. (1999) uvádí, že β -laktoglobulin byl první bílkovinou, u které byl objeven roce 1955 polymorfismus. Bylo zjištěno, že, β -laktoglobulin existuje ve dvou formách, které byly pojmenovány β 1 a β 2. Až v roce 1957 byly zavedeny názvy A a B. Liší se od sebe jedinou aminokyselinou na pozici 118. Varianta A na této pozici obsahuje alanin, zatímco varianta B valin (Fox et al. 2015). Selvaggi et al. (2014) uvádí, že se liší dvěma substitucemi – navíc na pozici 64. aminokyseliny, kde asparagová kyselina je nahrazena glycinem. Zmíněný autor dále shodně zmiňuje, že to byla první bílkovina, u které byl polymorfismus objeven.

Mléko může však obsahovat obě varianty, pak je označováno AA, BB nebo AB, v závislosti na přítomnosti daných variant. Výzkum prokázal, že u vybraných druhů koz výskyt typu AA souvisí s vyšší produkcí mléka, na rozdíl od typu AB (Selvaggi et al. 2014). Geny kódující syrovátkové bílkoviny byly lokalizovány na chromozomech 5 a 11 (Martin et al. 2002).

3.5.8 Fyzikálně-chemické vlastnosti bílkovin

Vlastnosti bílkovin jsou determinovány jejich strukturou a prostředím, ve kterém se nacházejí.

Izoelektrický bod

Významnou charakteristikou je hodnota izoelektrického bodu, který je definován jako rozmezí na stupnici pH, v němž bílkovina, peptid či aminokyselina vykazuje neutrální vnější náboj, je ve formě amfiontu a nepohybuje se v elektrickém poli.

Denaturace

Tento proces lze definovat jako nekovalentní změnu sekundární či terciární struktury molekuly proteinu. Nastává vlivem různých faktorů, lze ji vyvolat například zvýšením teploty (Anema 2009).

Rozpustnost

Tato vlastnost hraje klíčovou roli při výrobě tekutých výrobků z mléka a má značný vliv na jejich vlastnosti. Je dána množstvím bílkoviny, které za určitých podmínek přejde do roztoku. Kaseiny jsou nerozpustné ve svém izoelektrickém bodě, to znamená v přibližném rozmezí 3,5–4,6 pH. Rozmezí rozpustnosti se zvětšuje se vzrůstající teplotou (Fox et al. 2015). Ceballos et al. (2009) nicméně uvádí, že pro kaseiny, které se nachází v kozím mléce, se předpokládá spíše hodnota pH okolo 4,1, na rozdíl od kaseinů z kravského mléka, pro které se hodí hodnota pH 4,6.

Hydratace

Je definována jako schopnost bílkoviny navázat a zachycovat vodu ve své molekule. Stupeň hydratace se liší v závislosti na podmínkách prostředí, ve kterém se bílkovina nachází,

například pH či přítomnosti solí. Hydratace se zvyšuje se vzrůstajícím pH (Fox et al. 2015). Různé bílkoviny mají odlišnou schopnost hydratace. Například u kaseinů může být tato vlastnost ovlivněna přítomností micel, jejich sklony ke shlukování či stupněm fosforylace (Fox et al. 2015).

Koagulace

Koagulace je reakce využívaná při výrobě sýrů, kdy se na mléko působí syřidlem s cílem vytvořit sýřeninu, meziproduct výroby sýrů (Raynal-Ljutovac et al. 2008; Kilara et al. 2018).

Povrchová aktivita

Povrchově aktivní látka je charakterizována současným výskytem hydrofilních i hydrofobních částí ve své molekule. Zmíněná místa mohou reagovat s vodou či jinou látkou, což je označováno, jako povrchová aktivita. Tato schopnost propůjčuje některým bílkovinám emulgační a pěnotvorné vlastnosti, ceněné při výrobě mnohých potravinářských výrobků (McCarthy & Singh 2009). Fox et al. (2015) uvádí, že kaseiny jsou dobrými emulgátory, avšak tvoří poměrně nestabilní pěny.

3.6 Hlavní bílkovinné frakce

3.6.1 Kaseinové bílkoviny

Pojmenování kasein pochází z původního latinského označení pro sýr – “*caseus*“. V mléce se kaseiny vyskytují v podobě útvarů zvaných micely, které se mohou spojovat do větších celků za pomoci fosforečnanu vápenatého a dalších látek, jako jsou hořčík, citráty a sodík, které dávají mléku jeho charakteristickou bílou barvu (Park et al. 2007). Kaseiny jsou fosfoproteiny – proteiny, které jsou charakterizovány přítomností fosforu ve svých molekulách, bohaté především na aminokyselinu prolin (Marletta et al. 2007). Fox et al. (2015) uvádí, že kaseiny mají vysoký podíl (35-45 %) nepolárních aminokyselin (například valinu, leucinu a izoleucinu). Předpokládá se, že jak sekundární, tak terciární struktura kaseinů je pravděpodobně narušována přítomností velkého množství prolinových zbytků, a to zvláště u β - kaseinu (Fox et al. 2015).

Bylo zjištěno, že kasein se vyskytuje v několika variantách: α 1-kasein, α 2-kasein, β - kasein, κ -kasein a γ -kasein (vzniká rozkladem β -kaseinu), které se od sebe navzájem liší rozdílným zastoupením aminokyselin (Petrotos et al. 2014). Jejich hlavní funkcí je transport minerálních látek, zejména vápníku a fosforu (Selvaggi et al. 2014; Pereira 2014). Také z nich mohou vznikat biologicky aktivní peptidy, které vykazují pozitivní účinky, například na lidské zdraví (Pereira 2014).

3.6.1.1 Struktura kaseinové micely

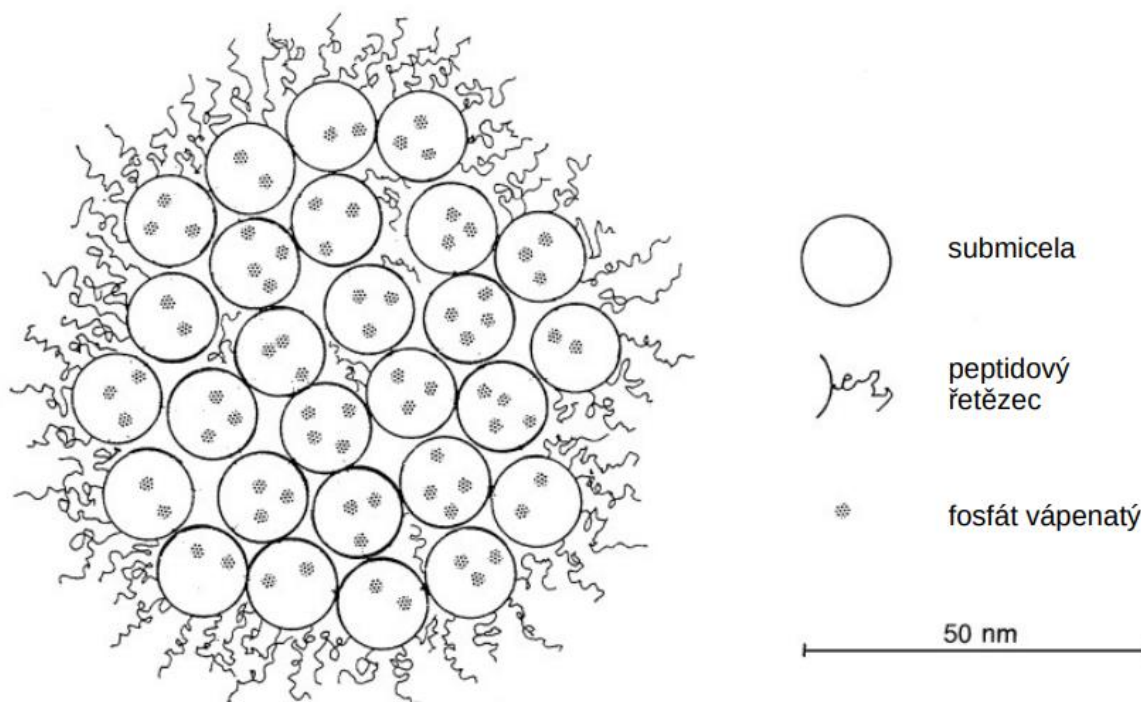
Existuje více názorů, jak tyto útvary popsat a charakterizovat. Postupem času byly navrhovány různé modely, první z nich byl navržen roku 1958 (Fox & Brodkorb 2008; Fox et al. 2015). To bylo možné díky důkladnějšímu prozkoumání funkce κ -kaseinu, který se nachází na povrchu micel a podílí se na tvorbě jejich obalu a stabilitě (Fox & Brodkorb 2008).

V dnešní době jsou kaseinové micely charakterizovány jako supramolekuly – větší molekuly, které jsou složeny z několika menších molekul, nebo mohou být také popisovány jako systém jednotlivých molekulárních entit, submicel, které jsou spojeny pomocí nekovalentních intermolekulárních interakcí, například pomocí vodíkových můstků nebo elektrostatických sil. Ve svých velikostech se mohou lišit (McMahon & Oommen 2008), v závislosti na počtu navázaných submicel, ale většinu z nich charakterizuje kulovitý tvar.

Stelwagen (2011) popisuje kaseinové micely jako sférické útvary jež se skládají z mnoha tisíc jednotlivých molekul kaseinu. Systém je obalen ionty vápníku, ale také fosfáty a menším množstvím citrátů. Podobně popisuje micelu i Walstra (1999), viz Obrázek č. 2.

Fox & Brodkorb (2008) uvádějí, že mnohé vlastnosti mléka jsou ovlivňovány přítomností kaseinových micel, například barva nebo tepelná stabilita.

Park et al. (2007) popisuje, že kaseinové micely v kozím mléce obsahují, v porovnání s mlékem kravským, více vápníku a fosfátů a vykazují nižší tepelnou stabilitu.



Obrázek č. 2: Struktura kaseinové micely (Walstra 1999).

3.6.1.2 α 1-kasein

Kozí mléko je charakterizováno nižším obsahem tohoto proteinu v porovnání s mlékem kravským, kde je klasifikován jako jeden z hlavních možných alergenů (Lad et al. 2017). Jeho molekula je složena z 214 aminokyselin. Jde o vysoce fosforylovanou bílkovinu a jako součást kaseinové micely hraje důležitou roli při výrobě mléčných výrobků, jako jsou tvaroh a jiné sýry (Selvaggi et al. 2014). Může se vyskytovat ve formě tetramerů, přičemž se zvyšující se teplotou a koncentrací bílkoviny se stupeň polymerace zvyšuje (Fox et al. 2015).

3.6.1.3 α 2-kasein

Patří mezi méně prozkoumané bílkoviny, důvodem je pravděpodobně náročnější postup jeho izolace a purifikace. Bylo zjištěno, že se hojně nachází ve větších kaseinových micelách kozího mléka. Jedná se o fosforylovaný peptid, jehož role nebyla ještě zcela objasněna. Jeho molekula vzniká spojením 207 aminokyselin a obsahuje množství vedlejších postranních řetězců, které nesou kladný náboj (Formaggioni et al. 1999; Selvaggi et al. 2014). Fox et al. (2015) uvádí, že z kaseinů je nejvíce hydrofilní a že je bohatý na výskyt aminokyseliny lysinu, která je pro člověka esenciální.

3.6.1.4 β -kasein

Je nejhojnější bílkovinou v kozím mléce, na rozdíl od mléka kravského, kde převládá α 1-kasein (Selvaggi et al. 2014; Lad et al. 2017). Vyznačuje se citlivostí na přítomnost vápenatých iontů, již při jejich nižších koncentracích dochází k jeho vysrážení. I β -kasein je fosforylovan, v porovnání s oběma α -kaseiny však méně. Ze všech kaseinů vykazuje největší hydrofobicitu. Při teplotě 4 °C se nachází v roztoku v monomerní formě, při zvyšování teploty polymeruje a vzniká řetězec, který se již při teplotě 8,5 °C sestává z přibližně dvaceti jednotek a může se dále prodlužovat. Proces závisí nejen na teplotě, ale i na koncentraci bílkoviny daném roztoku (Fox et al. 2015). Analýzou bylo zjištěno, že β -kasein může ovlivňovat chování mléka

při výrobě sýrů – například ovlivněním doby potřebné pro srážení nebo tvrdosti sýřeniny (Selvaggi et al. 2014).

3.6.1.5 κ -kasein

Z kaseinů je tento jediný, který je v přítomnosti vápenatých iontů rozpustný. Nachází se především na povrchu kaseinových micel a podílí se na jejich stabilitě (Formaggioni et al. 1999; Park et al. 2017). Molekula této bílkoviny je složena z 171 aminokyselin, 105. aminokyselinou je fenylalanin, 106. je methionin. Pokud dojde k rozštěpení peptidové vazby mezi zmíněnými aminokyselinami, vzniknou dva zlomky – *para*- κ -kasein (z 1.-105. aminokyseliny) a kaseinmakropeptid (ze 106.-171. aminokyseliny) (Park et al. 2017).

3.6.2 Syrovátkové bílkoviny

Syrovátka vzniká jako vedlejší produkt při srážení mléka (Kilara et al. 2018). Bílkoviny, které se z mléka nevyloučí srážením, jsou označovány jako syrovátkové, nebo též sérové. Srážení může být například sladké, za přídavku syřidla (používané pro výrobu sýrů) nebo kyselé, za použitím kyselin, které jsou produkovány bakteriemi mléčného kvašení (pro výrobu tvarohu) (Kilara et al. 2018).

Selvaggi et al. (2014) charakterizuje syrovátkové bílkoviny jako skupinu mléčných proteinů, které zůstanou rozpuštěné v mléčném séru či syrovátce, po vysrážení kaseinů při pH 4,6, teplotě 20 °C a po syřidlovém srážení kaseinu. Dále uvádí, že na rozdíl od kaseinů, neobsahují fosfor, ale je pro ně typický vyšší obsah sirných aminokyselin (zejména cysteinu a methioninu), které pozitivně podporují růst mláďat. Patří mezi ně β -laktoglobulin a α -laktalbumin, které jsou podle svého prostorového uspořádání řazeny do skupiny globulárních proteinů.

3.6.2.1 α -laktalbumin

Syntéza této bílkoviny je lokalizována v mléčné žláze. Protein slouží jako koenzym při syntéze laktózy – zvyšuje aktivitu substrátu β -1,4-galaktosyltransferázy, která katalyzuje syntézu laktózy z glukózy a UDP-galaktózy (Formaggioni et al. 1999; Martin et al. 2002; Stelwagen 2011). Hraje roli i při sekreci mléka.

Patří mezi metaloproteiny, což znamená, že se podílí na vazbě iontů kovů, především vápníku (Petrotos et al. 2014; Selvaggi et al. 2014). Jeho molekula je složena ze 123 aminokyselin (Kilara et al. 2018). Gen pro jeho tvorbu je uložen na chromozomu 5 (Selvaggi et al. 2014). Fox et al. (2015) uvádí, že je bohatý na aminokyselinu tryptofan a síru, která je zastoupena především ve formě cystinu a methioninu. Autor dále zmiňuje, že α -laktalbumin vykazuje nejvyšší tepelnou stabilitu ze syrovátkových bílkovin.

3.6.2.2 β -laktoglobulin

Chatterton et al. (2006) popisuje β -laktoglobulin jako rozpustný globulární protein s širokým využitím. Petrotos et al. (2014) uvádí, že úloha β -laktoglobulinu doposud nebyla zcela objasněna. Předpokládá se, že působí jako přenašeč, podílí se na pasivní imunitě mláďat a reguluje metabolismus fosforu v mléčné žláze (Formaggioni et al. 1999; Petrotos et al. 2014). Podle studie Pereira (2014) je důležitým přenašečem retinolu – vitamínu A a rovněž má antioxidantní vlastnosti. Kilara et al. (2018) uvádí, že je nejhojněji zastoupenou bílkovinou v syrovátce. Skládá se ze 162 aminokyselin. Podle Stelwagena (2011) je β -laktoglobulin z kozího mléka pro člověka lépe stravitelnější než β -laktoglobulin z mléka kravského.

3.6.3 Využití mléčných bílkovin v potravinářském průmyslu

Kaseinové bílkoviny, syrovátkové bílkoviny i výrobky z nich mají široké využití v potravinářství. K vlastnostem, které propůjčují potravinářským výrobkům patří například: tepelná stabilita, tvorba pěny či gelu, barva, viskozita (Harper 2009). Fox et al. (2015) uvádí, že v potravinářství je klíčová role bílkovin pro tvorbu textury, barvy, vůně a stability. Využití mléčných proteinů je rozsáhlé, tato práce uvádí pouze několik příkladů jejich možné aplikace.

3.6.3.1 Využití kaseinů

V pekařských výrobcích – těstech na chleby, sušenkách, dortech, se tyto bílkoviny využívají například pro zlepšení textury nebo jako emulgátory. V jogurtech zvyšují tuhost, upravují konzistenci a pozitivně ovlivňují soudržnost produktu. V mléčných nápojích zajišťují celkovou strukturu, případně pěnivost. Sensorické vlastnosti a texturu poskytují polevám a sladkým pomazánkám (Fox et al. 2015).

3.6.3.2 Využití syrovátkových bílkovin

Rovněž syrovátkové bílkoviny nacházejí využití v pekařských výrobcích. Používají se jako emulgátory a lze je využít i jako náhradu vajec. V jogurtech je využívána jejich schopnost tvořit gely a rovněž poskytují sensorické vlastnosti. V ochucených nápojích na bázi mléka zajišťují viskozitu a koloidní stabilitu (Fox et al. 2015).

3.7 Vybrané metody stanovení bílkovin

Existuje mnoho metod pro stanovení bílkovin, tato práce stručně představuje pouze některé z nich. Obecně lze rozdělit metody na rozhodčí, nazývané také referenční, které slouží pro ověření výsledků metod provozních, a metody provozní, pro které je charakteristická především rychlost. Bílkoviny lze stanovovat komplexně (formolovou titrací) nebo se stanoví jejich jednotlivé frakce (kapalinovou chromatografií).

Bílkoviny ve vzorku nepodléhají nežádoucím změnám tak rychle, jako například mléčný tuk, přesto je třeba věnovat potřebnou péči a pozornost nejen vzorkování a přepravě, ale i uchovávání vzorku, neboť vzorek by měl být podroben analýze co nejdříve.

Formolová titrace

Tato metoda byla popsána Steineggerem roku 1905 a po několika modifikacích se používá i dnes (Kala et al. 2019). V bílkovinách mléka převažují volné karboxylové skupiny nad aminoskupinami, proto vykazují kyselou reakci a lze je stanovit alkalimetry. Stanovení ruší volné aminoskupiny, které se blokují přidávkem formaldehydu ke vzorku.

Vzorek, zneutralizovaný na indikátor fenolftalein, se titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného v přítomnosti formaldehydu, který vytváří s aminoskupinou Schiffovu bázi, čímž dochází k blokaci aminoskupin. Zjištěný obsah dusíku se pomocí přepočítacího faktoru 6,38 převede na obsah bílkovin. Tento faktor byl ustanoven v minulém století a vychází z průměrného obsahu dusíku v přečištěném kaseinu, který byl oddělen kyselým srážením (Dupont et al. 2018).

Stanovení podle Kjeldahla

Tato metoda byla poprvé popsána Kjeldahlem roku 1883, patří mezi nejčastěji využívaná stanovení dusíku a je zařazována mezi referenční metody. Postupem času prošla několika modifikacemi, především se týkaly nahrazení původních katalyzátorů, které obsahovaly rtuť a zmenšení množství nejen vzorku, ale i chemikálií potřebných k analýze (Moore et al. 2010). S přesností na čtyři desetinná místa se naváží vzorek, který se mineralizuje kyselinou sírovou (pro zvýšení bodu varu kyseliny sírové se přidává síran draselný ve formě tablet). Bílkovinný dusík se uvolní ve formě amoniaku, v prostředí kyseliny sírové vzniká síran amonný. Působením hydroxidu sodného se uvolní amoniak, který se destilací s vodní párou převede do předlohy s kyselinou boritou. Titrace se provádí roztokem kyseliny chlorovodíkové (Kala et al. 2019). Pro přepočet dusíku na obsah bílkovin se použije faktor 6,38.

Úskalí této metody spočívá v tom, že je stanoven i nebílkovinný dusík nacházející se například v nukleových kyselinách či fosfolipidech, což v případě stanovení bílkovin zkresluje výsledek analýzy. Výsledek může být rovněž ovlivněn i ztrátou dusíku vlivem pyrolytického rozkladu amoniaku. Tato situace nastává u mlék s vyšším obsahem tuku, kde dojde ke zvýšení bodu varu (Dupont et al. 2018). Metoda je složena z více dílčích kroků, které mohou vést k zanesení chyb. Nevýhodou může být i potřeba manipulace s koncentrovanou kyselinou sírovou (Moore et al. 2010). Fox et al. (2015) uvádí, že mezi další nevýhody patří časová náročnost metody a upozorňuje, že pro stanovení většího množství vzorků může být proto nevhodná. Pro využití metody svědčí možnost automatizace.

Stanovení podle Dumase

Metoda byla popsána na počátku 19. století Dumasem. Od svého vzniku prošla několika modifikacemi, avšak základní princip zůstává stejný – vzorek je spalován v atmosféře bohaté na kyslík. Kala et al. (2009) uvádí teplotu 900 °C, zatímco Moore et al. (2010) udává rozmezí 950-1050 °C. Dusík uvolněný v plynné formě je zachycen a poté je změřen jeho objem.

Stanovení je vhodné nejen pro mléko, ale i pro mléčné výrobky, například sýry či jogurty (Kala et al. 2019). Tato metoda rovněž stanovuje i látky s obsahem nebilkovinného dusíku.

Koulometrické stanovení

Po neutralizaci, oxidaci a redukcí (případně vysrážení) zkoušeného vzorku se na vzorek působí elektrickým proudem. Ke zjištění obsahu dané látky se využívá Faradayových zákonů. Metoda je vhodná především pro měření vzorků syrového mléka (Kala et al. 2019).

Spektrofotometrické stanovení

Spektrofotometrie je zařazována mezi optické metody a slouží ke zjišťování koncentrace barevných roztoků na základě změření jejich transmitance nebo absorbance. Zbarvení je úměrné obsahu stanovované látky. Na základě změření vzorku a proměření řady standardů lze stanovit koncentraci látky ve vzorku. V praxi se využívá mnoho metod pro spektrofotometrické stanovení bílkovin, z nichž každá využívá jiné činidlo k iniciaci barvené reakce.

Biuretová metoda

Biuretová metoda, popsána poprvé Bertholletem roku 1873, je založena na reakci bílkovin a peptidů v zásaditém prostředí, které s ionty mědi tvoří fialový barevný komplex. Název je odvozen od sloučeniny biuretu, která se však pro stanovení dnes již nepoužívá. Absorbance je měřena při vlnové délce 540 nm. Metoda je relativně jednoduchá na provedení, nicméně k jejím úskalím patří nižší citlivost, v porovnání s ostatními kolorimetrickými metodami (Moore et al. 2010).

Lowryho metoda

Metoda vyvinuta Lowrym ve 40. letech minulého století je velmi ceněna, protože dovoluje stanovit i velmi nízké koncentrace bílkovin ve vzorku. Vzorek reaguje s Lowryho činidlem (alkalickou směsí iontů mědi a vinanu draselno-sodného), za vzniku modře zbarveného produktu. Ke zvýšení citlivosti metody je přidávána fosfo-molybdenová směs. Absorbance je měřena při vlnové délce 750 nm. Nevýhodou může být delší čas, který je zapotřebí k analýze (Moore et al. 2010).

Stanovení s organickými barvivy

Některá organická barviva (například azobarviva Oranž G, Amidočern 10 B) jsou schopna vytvářet s bílkovinami nerozpustné komplexy. V okyseleném roztoku dochází k reakci negativně nabitých sulfonových skupin, které jsou obsažené v azobarvivech, s kladně nabitými částmi molekul proteinů, čímž dojde ke vzniku komplexu. Po oddělení vytvořeného komplexu se spektrofotometricky stanovuje nezreagované barvivo, jehož obsah se využije pro výpočet obsahu bílkovin ve vzorku (Moore et al. 2010).

Stanovení pomocí UV absorpce

Většina bílkovin vykazuje maximální absorpci UV (ultrafialového) záření při vlnové délce 280 nm, především díky aminokyselinám, které ve své molekule obsahují aromatický systém – například tryptofan nebo tyrosin (Fox et al. 2015). UV absorbance vzorku se změří při vlnové délce 280 nm a porovnáním s řadou standardů je zjištěna koncentrace bílkovin ve vzorku. Nevýhodou této metody je, že při vlnové délce 280 nm vykazuje absorpci i řada dalších látek (volné aminokyseliny, nukleové kyseliny), které mohou zkreslovat výsledek analýzy (Moore et al. 2010).

Elektroforetické stanovení

Stanovované látky jsou izolovány a identifikovány na základě své rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Elektroforetické stanovení lze provést několika způsoby. Dupont et al. (2018) ve své práci uvádí, že při polyakrylamidové gelové elektroforéze bílkoviny migrují na základě rozdílného poměru náboje a hmotnosti. Kilara et al. (2018) uvádí, že polyakrylamidová gelová elektroforéza byla poprvé využita ke stanovení jednotlivých složek syrovátkových bílkovin.

Pro stanovení zmíněnou metodou je vhodné zásadité prostředí, ve kterém bílkoviny mají záporný náboj. Pro snadnější separaci kaseinů je využíváno prostředí močoviny, která, v kombinaci s vhodným redukcujícím činidlem, narušuje disulfidové můstky α 2-kaseinu a κ -kaseinu (Dupont et al. 2018).

Stanovení kapalinovou chromatografií

Metoda slouží k oddělování jednotlivých složek vzorku na základě rozdílné afinity stanovovaných složek k fázi mobilní a fázi stacionární. Každá analyzovaná látka je charakterizována specifickým retenčním časem a určitou plochou píku. Výhodou této metody je možnost stanovení nejen jednotlivých bílkovin, ale i jejich jednotlivých složek. Jde o vysoce selektivní, přesnou a rozšířenou metodu. Úskalím je delší čas potřebný k případné úpravě vzorku pro vlastní analýzu (naředění, odstředění, filtrace). Nevýhodou rovněž může být nutnost skladování toxických chemikálií ve větších množstvích pro doplňování mobilní fáze (Moore et al. 2010).

Mezi metody chromatografie patří například iontově-výměnná chromatografie. Jejím principem je výměna iontů mezi roztokem vzorku a ionxem. Bílkoviny jsou, díky svému náboji, schopny zachytit se na stacionární fázi, která je tvořena iontoměničtem. Poté mohou být odděleny například roztokem chloridu sodného (Dupont et al. 2018).

Stanovení infračervenou spektroskopií

Podstatou této metody je měření interakce infračerveného záření se vzorkem, absorpcí, emisí či odrazem. K měření mléka se využívá oblasti MIR (2,5-25,0 μ m) nebo NIR. Pro koloidní systémy mající stabilní strukturu je tuto metodu možné použít nejen pro kvalitativní stanovení, ale i za účelem kvantitativní analýzy (Bogomolov et al. 2012).

Stanovení hmotnostní spektrometrií

Analýza probíhá na základě zjištění hmotnosti molekul. Princip je založen na ionizaci chemických sloučenin zdrojem ionizačního záření, vytvoření nabitých molekul a změření jejich hmotnosti v poměru k náboji (Dupont et al. 2018).

Hmotnostní spektrometrie může být využívána pro stanovení obsahu hlavních bílkovin mléka, ale i pro proteiny, které mají nižší kvantitativní zastoupení a nacházejí se například v membráně tukových kuliček. Pomocí hmotnostní spektrometrie byla rovněž odhalena složitost kaseinové frakce u mléka kozího, kravského i ovčího. Metodou lze odhalit i změny struktury proteinů, které jsou způsobeny technologickým zpracováním (Dupont et al. 2018).

3.8 Porovnání mléka a kozího, ovčího, kravského

Porovnání složení kozího a ovčího mléka

Kalyankar et al. (2016) zmiňuje, že ovčí mléko je, v porovnání mlékem kozím, bohaté nejen na obsah bílkovin, ale i na tuk, který se zde vyskytuje v kuličkách (menší než 3,5 μm), které jsou v porovnání s ostatními přežvýkavci nejmenší. To z něj činí mléko, u kterého dochází k velmi dobré a snadné homogenizaci a lehké stravitelnosti. Autor dále uvádí, že ovčí mléko obsahuje v průměru 5,6 % bílkovin a 6,4 % tuku. Kozí mléko obsahuje průměrně 3,5 % bílkovin a 3,8 % tuku (Park et al. 2017).

V ovčím mléce se rovněž vyskytuje více laktózy (4,39-5,20 %), v porovnání s kozím (3,77-4,90 %). Nižší jsou obsahy sodíku a draslíku, nicméně ostatní minerální látky jsou zastoupeny v dostatečných množstvích (Kalyankar et al. 2016).

Provnání obsahu bílkovin v kozím a kravském mléce

Obsah bílkovin, stejně jako dalších látek obsažených mléce, je ovlivněn mnoha faktory, například stádiem laktace, zdravotním stavem zvířete, věkem, způsobem výživy. Rozdíly se nachází nejen mezi živočišnými druhy, ale i mezi jednotlivými plemeny stejného druhu. Rozdíly v některých složkách mléka shrnuje Tabulka č. 7.

Tabulka č. 7: Porovnání složení mlék různých druhů (upraveno podle Jandal 1996).

Složka [%]	Kozí	Kravské	Ovčí
Tuk	3,80	3,67	7,62
Laktóza	4,08	4,78	3,70
Bílkoviny	2,90	3,23	6,21
Kaseiny	2,47	2,63	5,16
Syrovátkové bílkoviny	0,43	0,60	0,81
Popeloviny	0,79	0,73	0,90

Bylo prokázáno, že u koz má velký vliv na zastoupení bílkovin v mléce přítomnost či nepřítomnost určitých alel (Martin et al. 2002; Marletta et al. 2007; Raynal-Ljutovac et al. 2008; Selvaggi et al. 2014; Park et al. 2017).

Ceballos et al. (2009) uvádí ve své studii, že základní složení kozího a kravského mléka je podobné, avšak jisté rozdíly existují. Tato studie o složení mléka byla provedena na obou druzích zmíněných zvířat. Autor dále zmiňuje, že analyzované kozí mléko, v porovnání s mlékem kravským, vykazovalo vyšší obsah nejen bílkovin, ale i lipidů a minerálních látek.

Předpokládá se, že v kozím mléce je obsaženo méně αs1 -kaseinu, který je u kravského mléka považován za hlavní bílkovinu, která může vyvolávat alergickou reakci (Lad et al. 2017). Park et al. (2017) ve své studii uvádí, že kozí mléko má, ve srovnání s mlékem kravským, až pětkrát nižší obsah listové kyseliny a vitamínu B₁₂.

4 Závěr

Na základě odborné literatury byl vytvořen literární přehled o složení kozího mléka, se zaměřením na obsah hlavních bílkovinných frakcí a jejich charakteristiku. Rozebráno bylo složení kozího mléka a možné účinky na lidské zdraví, především v souvislosti s alergií a využitím kozího mléka jako alternativy k mléku kravskému. Bylo zjištěno, že pro kozí mléko je charakterický obsah mastných kyselin se střední délkou řetězce, které se podílí na jeho typických senzorických vlastnostech, zejména aromatu. Byl zmíněn i obsah ostatních látek, kterým je v současné době věnována pozornost, například bioaktivním peptidům.

Byly uvedeny hygienické požadavky na produkci syrového mléka a mleziva, které jsou dány Nařízením Evropského parlamentu a Rady ES č. 853/2004 a Nařízením komise (ES) č. 1662/2006.

Dále byl popsán proces biosyntézy bílkovin. Zmíněn byl polymorfismus hlavních bílkovinných frakcí, jev, který ovlivňuje obsah bílkovin v kozím mléce.

Byly rozebrány některé vlastnosti bílkovin – kaseinových i syrovátkových. V kozím mléce se kaseinové a syrovátkové bílkoviny vyskytují přibližně v poměru 80:20. Bylo zjištěno, celkový obsah bílkovin v kozím mléce činí přibližně 2,90 %. Mezi kaseinové bílkoviny patří α 1-kasein, α 2-kasein, β -kasein, κ -kasein a γ -kasein. Průměrné zastoupení jednotlivých frakcí kaseinů na 100 g bílkovin je: 18,92 g α 1-kaseinu, 8,52 g α 2-kaseinu, 55,26 g β -kaseinu a κ -kaseinu. Nejhojněji zastoupenou frakcí je β -kasein. Díky nižšímu obsahu α 1-kaseinu (v porovnání s mlékem kravským), vykazuje kozí mléko nižší alergenicitu. Do skupiny syrovátkových bílkovin je zařazován α -laktalbumin, β -laktoglobulin a imunoglobuliny. Průměrné zastoupení syrovátkových bílkovin na 100 g bílkovin je 17,30 g.

I přes rozdílné složení kaseinových bílkovin je kozí mléko zajímavé z hlediska zpracování a je oblíbeno především ve formě mléčných výrobků, například sýrů.

Potravinářským výrobkům zajišťují mléčné bílkoviny důležité organoleptické vlastnosti – podílí se například na jejich barvě, textuře či chuti. Z technologického hlediska jsou využívány pro své emulgační, gelotvorné, pěnotvorné a jiné vlastnosti.

Dále byly zmíněny některé z metod pro stanovení proteinů. Mezi nejpoužívanější metody patří stanovení kapalinovou chromatografií a infračervenou spektroskopií. Z hlediska chemického složení bylo porovnáno mléko kozí, kravské a ovčí.

5 Literatura

Albenzio M, Santillo A. 2011. Biochemical characteristics of ewe and goat milk: Effect on the quality of dairy products. *Small Ruminant Research* **101**:33-40. Elsevier.

Almaas H, Cases AL, Devold TG, Holm H, Langsrud T, Aabakken L, Aadnoey T, Vegarud GE. 2006. In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal* **16**:961-968. Elsevier.

Anema, SG. 2009. The whey proteins in milk: thermal denaturation, physical interactions, and effects on the functional properties of milk. Pages 239-273 in Thompson A, Boland M, Singh H, editors. *Milk Proteins From Expression To Food*. Academic Press. Elsevier.

Attaie R, Richter RL. 2000. Size Distribution of Fat Globules in Goat Milk. *Journal of Dairy Science* **83**:940-944.

Bogomolov A, Dietrich S, Boldrini B, Kessler RW. 2012. Quantitative determination of fat and total protein in milk based visible light scatter. *Food chemistry* **134**:412-418. Elsevier Ltd.

Ceballos LS, Morales ER, de la Torre Adarve G, Castro JD, Martínez LP, Sampelayo MRS. 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis* **22**:322-329.

Český statistický úřad. 2020. Český statistický úřad: Spotřeba potravin – 2019. Available from <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2019> (accessed April 2021).

Dan Ch, Na Z, Xue-mei N, Qing-zhang L, Xue-jun G. 2016. Potential Genes for Regulation of Milk Protein Synthesis in Dairy Goat Mammary Gland. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)* **23**:50-56. ScienceDirect.

Dupont D, Croguennec T, Pochet S. 2018. *Milk Proteins – Analytical Methods*. Reference Module in Food Science. Elsevier. Academic press.

Evropský parlament a Rada. 2004. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Brusel.

Formaggioni P, Summer A, Malacarne M, Mariani P. 1999. Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus. *Annali della Facolta di Medicina Veterinaria* **XIX**. Universiti degli Studi Parma.

Fox PF, Brodtkorb A. 2008. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal* **18**:677-684. Elsevier Ltd.

Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O' Mahony JA. 2015. *Dairy Chemistry and biochemistry: Second Edition*. Springer.

- Gajdůšek S. 2003. Laktologie: První vydání. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno.
- Harper, WJ. 2009. Model food systems and protein functionality. Pages 409-422 in Thompson A, Boland M, Singh H, editors. Milk Proteins From Expression To Food. Academic Press. Elsevier.
- Hodgkinson AJ, Wallace OAM, Boggs I, Broadhurst M, Prosser CG. 2018. Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child in vitro digestion conditions. Food Chemistry **245**:275-281. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.028>.
- Chatterton EW, Smithers G, Roupas P, Brodtkorb A. 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin – Technological implications for processing. International Dairy Journal **16**:1229-1240. Elsevier.
- Kala R, Samová E, Hanuš O, Pecová L, Sekmokas K, Riaukienė D. 2019. Milk Protein Analysis: an Overview of the Methods – Development and Application. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis **67**:345-359.
- Kalyankar SD, Sarode AR, Khedkar CD, Deosarkar SS, Pawshe RD. 2016. Sheep: Milk. Pages 758-763 Encyclopedia of Food and Health: First edition. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00621-8>.
- Kilara A, Vaghela MN. 2018. Whey proteins. Pages 93-126 in Yada RY, editor. Proteins in Food Processing: Second Edition. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X>.
- Komise Evropských Společenství. 2006. Nařízení komise (ES) č. 1662/2006 ze dne 6. listopadu, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Brusel.
- Lad SS, Aparnathi KD, Bhavbhuti M, Velpula S. 2017. Goat Milk in Human Nutrition and Health – A Review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences **6**: 1781-1792.
- Marletta D, Criscione A, Bordonaro S, Guastella AM, D' Urso G. 2007. Casein polymorphism in goat' s milk. Lait **87**:491-504.
- Martin P, Szymanowska M, Zwierzchowski L, Leroux Ch. 2002. The impact of genetic polymorphisms on protein composition of ruminant milks. Reproduction Nutrition Development **42**:433-459. INRA, EDP Sciences.
- McCarthy OJ, Singh H. 2009. Physico-chemical Properties of Milk. Pages 691-749 in McSweeney P, Fox PF, editors. Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents: Third Edition. Springer Science + Business Media.
- McMahon DJ, Oommen BS. 2008. Supramolecular Structure of the Casein Micelle. Journal of Dairy Science **91**:1709-1721. American Dairy Science Association.

Moioli B, Pilla F, Tripaldi C. 1998. Detention of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research* **27**:185-195. Elsevier.

Monllor P, Romero G, Atzori AS, Sandoval-Castro CA, Ayala-Burgos AJ, Roca A, Sendra E, Díaz JR. 2020. Composition, Mineral and Fatty Acid Profiles of Milk from Goats Fed with Different Proportions of Broccoli and Artichoke Plant By-Products. *Foods* **9**:700.

Moore JC, DeVries JW, Lipp M, Griffiths JC, Abernethy DR. 2010. Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9**:330-357. Institute of Food Technologists.

Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**:88-113. Elsevier.

Park YW. 2017. Goat milk: Goat milk-chemistry and nutrition. Pages 42-83 *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals: Second Edition*. Wiley Blackwell.

Pereira PC. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* **30**:619-627. Elsevier. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>.

Petrotos K, Tsakali E, Goulas P, D' Alessandro AG. 2014. Casein and Whey Proteins in Human Health. Pages 94-146 in Kanekanian A, editor. *Milk and Dairy Products as Functional Foods: First Edition*. John Wiley & Sons, Ltd.

Playne MJ, Crittenden RG. 2009. Galacto-oligosaccharides and Other Products Derived from Lactose. Pages 121-188 in McSweeney P, Fox PF, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents: Third Edition*. Springer Science + Business Media.

Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard P, Guillet I, Chilliard Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research* **79**:57-72. Elsevier. Available from <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.07.009>.

Ribeiro AC, Ribeiro SDA. 2010. Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research* **89**:225-233. Elsevier.

Selvaggi M, Laudadio V, Dario C, Tufarelli V. 2014. Major proteins in goat milk: An updated overview on genetic variability. *Molecular Biology Reports* **41**:1035-1048.

Stelwagen K. 2011. Mammary Gland, Milk Biosynthesis and Secretion/Milk Protein. Pages 359-366 in Fuquay JW, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second edition*. Elsevier Ltd.

Velíšek J, Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin I.: Třetí vydání*. OSSIS. Tábor.

Vilotte JL, Chanut E, Le Provost F, Whitelaw CBA, Kolb A, Shennan DB. 2013. Genetics and Biosynthesis of Milk Proteins. Pages 431-461 in McSweeney PLH, Fox PF, editors. *Advanced Dairy Chemistry: Fourth Edition*. Springer Science + Business Media New York.

Walstra P. 1999. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal* **9**: 189- 192.

Yadav AK, Singh J, Yadav SK. 2016. Composition, nutritional and therapeutic values of goat milk: A review. *Asian Journal of Dairy & Food Research* **35**:96-102.

Yahyaoui MH, Angiolillo A, Pilla F, Sanchez A, Folch JM. 2003. Characterization and Genotyping of the Caprine κ -Casein Variants. *Journal of Dairy Science* **86**:2715-2720. American Dairy Science Association.

Yangilar F. 2013. As a potentially Functional Food: Goat' s Milk and Products. *Journal of Food and Nutrition Research* **1**:68-81. Science and Education Publishing.

6 Seznamy

6.1 Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Zastoupení minerálních prvků a vitaminů v různých druzích mlék

Tabulka č. 2: Chemické složení koziho mléka

Tabulka č. 3 Obsah kyselin [mg/100 g mléka]

Tabulka č. 4: Průměrná velikost tukových kuliček u mlék

Tabulka č. 5: Tabulka bioaktivních peptidů

Tabulka č. 6: Zastoupení bílkovinných frakcí [g/100 g bílkovin]

Tabulka č. 7: Porovnání složení mlék různých druhů

6.2 Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Laktóza

Obrázek č. 2: Struktura kaseinové micely