

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Stanovení antioxidační aktivity v mléce malých  
přežvýkavců**

**Diplomová práce**

**Bc. Andrea Kosáčková**

**Výživa a potraviny**

**Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.**

**Konzultant: Ing. Klára Podhorecká**

© 2022 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení antioxidační aktivity v mléce malých přežvýkavců" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 04. 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Matyášovi Orsákovi, Ph.D, vedoucímu diplomové práce. Poděkování patří i Ing. Kláře Podhorecké a Ing. Zoře Kotíkové, Ph.D., za jejich cenné připomínky, konzultace a čas, který mi pokaždé s ochotou věnovaly. Dále bych chtěla poděkovat i mé rodině za podporu během celého studia.

# Stanovení antioxidační aktivity v mléce malých přežvýkavců

## Souhrn

Pravidelná konzumace potravin bohatých na přírodní antioxidační složky je jednou z možností, jak chránit lidský organismus před oxidačním stresem. Tato nežádoucí situace nastává v případě nerovnovážného stavu mezi volnými radikály a antioxidačním obranným systémem. Antioxidační sloučeniny podporují a posilují obranný mechanismus našeho organismu, minimalizují riziko rozvoje civilizačních chorob a zpomalují proces stárnutí.

Kozí mléko je cenným zdrojem antioxidačních složek. Zvyšující se poptávka po kozím mléce souvisí s jeho nutričními a terapeutickými benefity. Prokazatelné antioxidační účinky jsou přisuzovány bílkovinám s přítomností síry ve struktuře aminokyselin, antioxidačním enzymům a peptidům, karotenoidům, lipofilním vitaminům A a E a hydrofilnímu vitaminu C. Na přítomnosti těchto složek v mléce má vliv mnoho faktorů. Odlišnosti byly zaznamenány ve vztahu ke krmivu, věku, plemenné příslušnosti, fázi laktace, teplotě prostředí, klimatu, hygieně a dalších.

V rámci této diplomové práce byla zkoumána antioxidační aktivita a obsah vitaminu A a E v kozím mléce. Následně byla pozorována vzájemná korelace těchto dvou parametrů. Ke stanovení antioxidační aktivity čerstvého mléka byla použita metoda DPPH s přepočtem na syntetický standard Trolox. Pro přesné určení obsahu vitaminu A a E v lyofilizovaných vzorcích byla zvolena metoda HPLC-DAD/FLD.

Antioxidační aktivita byla naměřena ve všech analyzovaných vzorcích. Obsah vitaminu A a E bylo možné vyhodnotit pouze u některých vzorků. Důvodem byly velmi nízké hladiny koncentrací těchto detekovaných vitaminů. Průměrné složení vzorku obsahovalo 78 %  $\alpha$ -tokoferolu, 15 %  $\alpha$ -tokotrienolu, 5 %  $\gamma$ -tokoferolu a 2 % retinolu. Výsledky korelační analýzy ukázaly, že neexistuje významná závislost mezi obsahem vitaminů A a E a antioxidační aktivitou v mléce jednotlivých zvířat.

**Klíčová slova:** antioxidační aktivita; hygienické parametry mléka; kozí mléko; oxidační stres; vitaminy a další obsahové látky

# Determination of antioxidant activity in the milk of small ruminants

## Summary

Regular consumption of foods rich in natural antioxidant components is one of the options to protect the human body from oxidative stress. This undesirable situation occurs in the case of an imbalance between free radicals and the antioxidant defense system. Antioxidant compounds support and strengthen the defense mechanism of our organism, minimize the risk of developing civilization diseases and slow down the aging process.

Goat milk is a valuable source of antioxidant components. The increasing demand for goat's milk is related to its nutritional and therapeutic benefits. Proven antioxidant effects are attributed to proteins with the presence of sulfur in the structure of amino acids, antioxidant enzymes and peptides, carotenoids, lipophilic vitamins A and E, and hydrophilic vitamin C. Many factors influence the presence of these components in milk. Differences were noted in feeding, age, breed affiliation, lactation stage, environmental temperature, climate, hygiene, and others.

As part of this diploma thesis, antioxidant activity and the content of vitamin A and E in goat's milk were investigated. Subsequently, a correlation between these two parameters was observed. To determine the antioxidant activity of fresh milk, the DPPH method was used with converting to the Trolox synthetic standard. For the accurate determination of the vitamin A and E content of the freeze-dried samples, the HPLC-DAD/FLD method was chosen.

Antioxidant activity was measured in all analyzed samples. The vitamin A and E content could only be evaluated in some samples. This was due to the very low concentration levels of these detected vitamins. The average sample composition consisted of 78%  $\alpha$ -tocopherol, 15%  $\alpha$ -tocotrienol, 5%  $\gamma$ -tocopherol and 2% retinol. The results of the correlation analysis showed that there is no significant dependence between the content of vitamins A and E and the antioxidant activity in the milk of individual animals.

**Keywords:** antioxidant activity; hygienic parameters of milk; goat milk; oxidative stress; vitamins and other substances

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Mléko</b>	<b>3</b>
3.1.1	Současná situace mléka na trhu	3
3.1.2	Význam mléka v lidské stravě	4
<b>3.2</b>	<b>Onemocnění vyvolané mlékem</b>	<b>5</b>
3.2.1	Alergie na mléčné bílkoviny	5
3.2.2	Laktózová intolerance	5
<b>3.3</b>	<b>Rozdělení mléka</b>	<b>6</b>
<b>3.4</b>	<b>Kozí mléko</b>	<b>6</b>
<b>3.5</b>	<b>Hygienické a legislativní požadavky</b>	<b>8</b>
<b>3.6</b>	<b>Složení kozího mléka</b>	<b>9</b>
3.6.1	Tuk	10
3.6.2	Sacharidy	11
3.6.3	Bílkoviny	11
3.6.4	Minerální látky	12
3.6.5	Vitaminy	13
<b>3.7</b>	<b>Oxidační stres</b>	<b>13</b>
3.7.1	Volné radikály, reaktivní formy kyslíku a dusíku	14
3.7.2	Antioxidační vlastnosti mléka	16
3.7.3	Oxidační stabilita mléka	17
<b>3.8</b>	<b>Vybrané látky s prokazatelným antioxidačním účinkem</b>	<b>18</b>
3.8.1	Vitamin A	18
3.8.2	Karotenoidy	21
3.8.3	Vitamin E	21
3.8.4	Bioaktivní peptidy	26
3.8.5	Enzymy	28
<b>3.9</b>	<b>Faktory ovlivňující výnos, kvalitu a složení kozího mléka</b>	<b>30</b>
<b>3.10</b>	<b>Vybrané metody pro stanovení antioxidační aktivity</b>	<b>34</b>
<b>3.11</b>	<b>Vybraná metoda pro stanovení vitamínu A a E</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Odběr vzorků</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Stanovení obsahu vitamínu A a E ve vzorcích kozího mléka</b>	<b>39</b>
4.2.1	Chemikálie	39
4.2.2	Standardy	39
4.2.3	Příprava kalibračních roztoků	39

4.2.4	Příprava vzorků k analýze.....	40
4.2.5	Stanovení obsahu vitamínu A a E.....	41
<b>4.3</b>	<b>Stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích koziho mléka.....</b>	<b>42</b>
4.3.1	Chemikálie .....	42
4.3.2	Standardy .....	42
4.3.3	Příprava standardu Troloxu .....	42
4.3.4	Příprava vzorků k analýze.....	43
<b>4.4</b>	<b>Statistická analýza.....</b>	<b>43</b>
<b>4.5</b>	<b>Přístroje a laboratorní vybavení.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>68</b>
<b>10</b>	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>68</b>
<b>11</b>	<b>Seznam grafů.....</b>	<b>68</b>
<b>12</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>69</b>

# 1 Úvod

Již od středověku bylo kozí mléko zařazováno do lidské stravy v zemích, kde klimatické podmínky neumožňovaly chov skotu. Chov koz a výroba kozích mléčných výrobků je součástí národního hospodářství mnoha států po celém světě. Statistické údaje Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) zaznamenaly zvýšenou spotřebu kozího mléka, a v návaznosti na to se kozí mléko posunulo na aktuální třetí příčku nejprodukovanějšího mléka na světě.

Zvyšující se zájem spotřebitelů o kozí mléko a mléčné výrobky z něj vyrobené, souvisí s nutričními benefity, které tyto produkty nabízejí. Kozí mléko se svým složením nejvíce podobá mléku kravskému. Zaznamenané rozdíly mají vliv především na nutriční hodnotu a stravitelnost. Odlišné složení aminokyselin, stavba mléčných bílkovin a chemické vlastnosti kozího mléka snižují riziko projevu alergické reakce. Nejedná se však o mléko zcela hypoalergenní, ale může sloužit jako alternativní náhrada. V některých případech může být kozí mléko pro konzumenty i tak problematické.

Kozí mléko obsahuje mnoho cenných složek jako jsou bílkoviny s vysokou biologickou hodnotou, tuky, esenciální mastné kyseliny, aminokyseliny, vápník a mnoho vitamínů a biologicky aktivních látek, které pozitivně ovlivňují biologické procesy v organismu. Některé složky v kozím mléce vykazují rovněž antioxidační vlastnosti, které jsou schopny neutralizovat a inhibovat volné radikály a jejich škodlivé účinky vznikající v organismu. V případě nerovnovážného stavu volných radikálů v lidském těle může dojít k vyvolání tzv. oxidačního stresu, který se podílí na rozkladu lipidů, proteinů a molekul DNA. Následky mohou vést ke karcinogenezi, kardiovaskulárním onemocněním, neurodegenerativním poruchám, rozvoji diabetes mellitus, rychlejšímu stárnutí a řadě dalších onemocnění.

Lidské tělo se brání několika antioxidačními mechanismy. Endogenní antioxidanty nelze v organismu nijak navyšovat, avšak exogenní lze. Pestrá strava, a s tím spojený vyšší příjem antioxidantů nabízí potenciální cestu, jak cíleně chránit organismus před oxidačním stresem. Antioxidační vlastnosti kozího mléka jsou zajištěny především přítomností vázané síry v aminokyselinách, z nichž jsou sestaveny bílkoviny. Významný je i vitamin A a E, karotenoidy, antioxidační enzymy a jiné. Na obsah těchto látek v čerstvém mléce má vliv celá řada faktorů, zejména výživa, vliv plemenné příslušnosti, věk, stádium laktace, chovatelské prostředí, hygiena, ale i roční období.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

- Stanovit antioxidační aktivitu kozího mléka od jednotlivých zvířat v rámci jednoho stáda.
- Stanovit obsahy vitamínu A a E v kozím mléce od jednotlivých zvířat v rámci jednoho stáda.
- Stanovit významnou korelaci mezi antioxidační aktivitou a obsahy vitamínů A a E.

### **Hypotézy:**

- Antioxidační aktivita kozího mléka je rozdílná v závislosti na aktuálním zdravotním stavu zvířete, chovaného v prostředí stejné zootechnické praxe.
- Obsah vitamínů A a E v kozím mléce je rozdílný v závislosti na aktuálním zdravotním stavu zvířete, chovaného v prostředí stejné zootechnické praxe.
- Existuje významná korelace mezi obsahem vitamínů A a E a antioxidační aktivitou v mléce jednotlivých zvířat.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Mléko

Mléko je podle *Codex Alimentarius* definováno jako sekret mléčné žlázy savců produkujících mléko. Mléko se získává procesem dojení, kdy z nadojeného mléka nebyly odebrány ani přidány žádné další obohacující složky. Mléko slouží pro konzumaci v tekutém stavu, nebo pro další zpracování (Navrátilová 2012). Podle sensorických analýz nemá obsahovat žádné příchutě, toxiny ani pigmenty (Fox & Kelly 2012).

Syrové mléko označuje mléko, které nebylo zahřáto na teplotu vyšší 40 °C nebo nepodstoupilo jiný proces, který by měl srovnatelný účinek (Navrátilová 2012).

Tuto nutričně významnou tekutinu produkuje přibližně 4500 druhů savců. Mléčný sekret je určen primárně pro růst, výživu a vývoj narozených mláďat. V průběhu vývoje mláďate se nutriční požadavky během laktace mění. Přítomnost makroživin a mikroživin se výrazně mezidruhově liší. Zastoupení minoritních složek mléka je rozmanitější v porovnání s ostatními makroživinami. Mléko je významným zdrojem kvalitních bílkovin, aminokyselin, laktózy, mastných kyselin, ale i minerálních látek jako je vápník a fosfor. Díky technologickým procesům je možné izolovat cenné složky mléka, které mohou být dále zpracovány (Fox & Kelly 2012).

#### 3.1.1 Současná situace mléka na trhu

V současné době, i přes narušení trhu pandemií Covid-19, světová produkce a poptávka po mléku a mléčných výrobcích stále roste. Mléko je totiž nezbytná vstupní surovina pro celou řadu výrobků potravinářského průmyslu (Ministerstvo zemědělství 2020). S rostoucí populací a změnami stravovacích návyků se zvyšuje produkce i spotřeba mléka. Ze základní suroviny se vyrábí i jiné produkty. Dochází tak k neustálému rozvoji výroby mléčných výrobků na trhu (Boland & Hill 2020). Roční celosvětová produkce mléka představuje 860 milionů tun. Z toho 85 % produkce mléka tvoří skot, 11 % mléko bůvolí, 2 % mléko kozí a 2 % mléko ovčí. Mléko produkují i jiná zvířata, jako jsou velbloudi, klisny a sobi. Avšak tato zvířata jsou významná pouze v určitých geografických oblastech se specifickými kulturními a klimatickými podmínkami (Fox & Kelly 2012). Velká část vyprodukovaného mléka je určena pro tržní síť příslušného státu. Zhruba 11 % je zapojeno do mezinárodního obchodu (Boland & Hill 2020). Domácí spotřeba mléka a mléčných výrobků s výjimkou másla zaznamenala pozitivní vzrůst. Podle statistických údajů v roce 2019 hodnota mléčného ekvivalentu vzrostla z 245,7 kg

na osobu a rok na 249 kg na osobu a rok. Tento nárůst souvisí především s opětovným vzrůstajícím zájmem o mléčné výrobky a mimo jiné i programy zdravého životního stylu. V porovnání s jinými státy EU má Česká republika mírné rezervy. Úroveň těchto států se pohybuje v rozmezí 270 - 275 kg na osobu a rok. Nejnovější statistické záznamy udávají spotřebu koziho mléka pro rok 2019 0,1 kg/rok. Při porovnání s jinými roky se spotřeba koziho mléka drží na stabilní hodnotě už od roku 2010 (Ministerstvo zemědělství 2020). K největším producentům koziho mléka v Asii patří Indie, Bangladéš a Pákistán, v Africe Súdán, Jižní Súdán a Somálsko. Při pohledu na evropské státy je to Francie, následně Španělsko a Řecko (Verruck et al. 2019).

Spotřeba potravin se dle globálních vzorců v posledních desetiletí změnila výrazným způsobem. Jedna ze změn je zřetelný posun živočišných bílkovin. Podle Bolanda a Hilla (2020) celosvětová spotřeba bílkovin vzrostla za poslední tři desetiletí (1990 - 2020) o 96 %. Konzumace mléčných výrobků z celkové světové proteinové výživy představuje 10 %, což je třetí nejvýznamnější zdroj bílkovin po obilovinách (40 %) a masu (18 %). Porovnájí-li se např. velmi nízké hodnoty lysinu v obilovinách, je zřejmé, že obsah mléčných bílkovin hraje významnou výživovou roli (Boland & Hill 2020).

### **3.1.2 Význam mléka v lidské stravě**

Bílkoviny přijaté z potravin jsou považovány za klíčový prvek zdravé stravy. Samotné mléko představuje bohatý zdroj bílkovin, který pozitivně ovlivňuje zdravotní stav populace. Aktuálně převažuje konzumace mléka kravského. Některé komunity konzumují mléko i od mnoha dalších druhů zvířat. Mléčné bílkoviny jsou tvořeny přibližně z 80 % kaseinovými a 20 % syrovátkovými bílkoviny. Tyto bílkovinné frakce jsou zdrojem celé řady peptidů s potenciálními bioaktivními vlastnostmi. Klinické studie prokázaly, že mléčné bílkoviny kladně působí na chronické onemocnění, které úzce souvisí s věkem. Jedná se zejména o onemocnění diabetes mellitus 2. typu, aterosklerózy, hypertenze, riziko obezity, rakovinu tlustého střeva apod. (Bishop MacDonald 2010; Poppitt 2020). Bílkoviny mohou ovlivnit i tělesnou hmotnost, kondici, ztrátu kosterní svaloviny, osifikaci kostí, výživu matek a kojenců (Poppitt 2020).

Mléko je přirozeným zdrojem celé řady minerálních látek jako je především vápník, fosfor, hořčík, zinek a selen. Dále je mléko zdrojem vitaminů, které lze rozdělit na hydrofilní a hydrofobní. Za lipofilní vitaminy v mléce je považován vitamin A, D a E. Ve vodní frakci se pak objevuje vitamin C, thiamin B1 a riboflavin B2 (Pereira 2014).

Významný dopad mléka a mléčných výrobků má i na střevní prostředí. Trávicí trakt dospělé populace osidluje  $400 \pm 500$  doposud známých kmenů bakterií. Ty tvoří v lidském těle komplexní vyvážený ekosystém, který bojuje proti vstupu nežádoucích patogenních bakterií, virům a houbám. Jedna z možností, jak právě pozitivně podpořit prostředí střevní mikrobioty je pravidelná konzumace mléka nebo mléčných produktů. Právě tyto výrobky dodávají organismu probiotika. Na snížení rizika infekce, tvorbě imunity nebo podpory zdravého prostředí střevní mikrobioty se podílejí některé přírodní složky mléka a mléčných fermentovaných výrobků jako je vápník, kyselina mléčná, mastné kyseliny s krátkým řetězcem, laktoferin, imunoglobuliny a bioaktivní peptidy (De Vrese et al. 2010).

## **3.2 Onemocnění vyvolané mlékem**

### **3.2.1 Alergie na mléčné bílkoviny**

Nejčastější vstupní surovina mléčných výrobků na trhu je kravské mléko. Určitá část populace se však potýká s alergickou reakcí na bílkoviny, které jsou obsaženy právě v kravském mléce. Tento problém lze charakterizovat jako imunologicky zprostředkovanou nežádoucí reakce v organismu. Projev této alergické reakce je pozorován v novorozeneckém období nebo během prvních let života. Prevalence u dětí kolísá v rozmezí 2 až 7,5 %. Příznaky onemocnění se projevují gastrointestinálními poruchami např. zvracením, nevolností, nadměrnou plynatostí, průjmem, případně krvácivou stolicí. Mezi další symptomy patří také atopická dermatitida nebo respirační příznaky. Alergii vyvolává přítomný kasein, zejména  $\alpha_{s1}$ -kasein. Jako další alergeny se mohou projevovat i syrovátkové bílkoviny, především  $\beta$ -laktoglobulin. Kravské mléko lze však nahradit jinou alternativou. Kozí nebo ovčí mléko je lépe stravitelné, a to díky rozdílnému zastoupení bílkovinných frakcí a menším tukovým kapénkám v porovnání s mlékem kravským. (Pereira 2014). Studie prokázaly, že nesnášenlivost kravského mléka je nejčastěji způsobena  $\alpha_{s1}$ -kaseinem. Kozí mléko obsahuje o 89 % nižší hodnoty tohoto typu kaseinu než mléko kravské. Nejedná se však o mléko hypoalergenní, ale může sloužit jako alternativní náhrada. V některých případech může být kozí mléko pro konzumenty i tak problematické (Lad et al. 2017).

### **3.2.2 Laktózová intolerance**

Laktóza neboli mléčný cukr je přírodní cukerná složka, která se v určitém množství objevuje téměř ve všech druzích mléka. Tento disacharid se skládá ze dvou monosacharidových jednotek, glukózy a galaktózy. Molekuly jsou mezi sebou propojeny glykosidickou vazbou.

Laktóza dokáže vyvolat závažné onemocnění, kdy se jedná se o tzv. laktózovou intoleranci. Příčina onemocnění je způsobena nedostatkem enzymu laktázy, který napomáhá trávit mléčný cukr. U pacientů s tímto onemocněním nedochází k hydrolýze laktózy a přechází v nerozštěpené formě do tlustého střeva. Intolerance laktózy vede ke gastrointestinálním poruchám jako je plynatost, bolest břicha a průjem. Bylo prokázáno, že struktura kaseinu kozího mléka umožňuje rychlejší prostup tlustým střevem a předchází intoleranci laktózy. Studie byla testována na vybrané skupině dětí, kdy kozí mléko zmírnilo příznaky u 30 - 40 % případů (Lad et al. 2017).

### **3.3 Rozdělení mléka**

Každé mléko je charakteristické svým složením makroživin. Podle chemického hlediska jsou mléka rozdělována podle zastoupení hlavních druhů bílkovin. Dle procentuálního obsahu bílkovin lze rozdělit mléka na dvě základní skupiny - mléka kaseinová a albuminová. V případě, že mléko produkují přežvýkavci (krávy, ovce, kozy, sobi, velbloudi) a obsah kaseinu je vyšší než 75 %, jedná se o mléka kaseinová. Pokud mléko produkují savci s jednoduchým žaludkem (masožravci, všežravci a býložravci), pak jsou to mléka albuminová (Gajdůšek 2003).

Dále se mléka dělí podle ontogenetických rozdílů. Vlastnosti a složení mléka se liší i v průběhu laktace. Lze tedy rozeznávat mléka nezralá a zralá. Mezi nezralá mléka se řadí mlezivo, mléko starodojné a aberantní. Mlezivo neboli kolostrum je produkováno mléčnou žlázou těsně před porodem. Jeho složení se od zralého mléka výrazně odlišuje. Jedná se o hustou lepkavou žlutohnědou tekutinu, s typickým zápachem a mírně slanou chutí. Vyznačuje se vysokým obsahem imunoglobulinů. Hladiny jednotlivých složek v mlezivu se velmi rychle po porodu mění. Mléka nezralá představují normální druhová mléka v dalším období laktace, kdy už nedochází k tvorbě mleziva (Gajdůšek 2003).

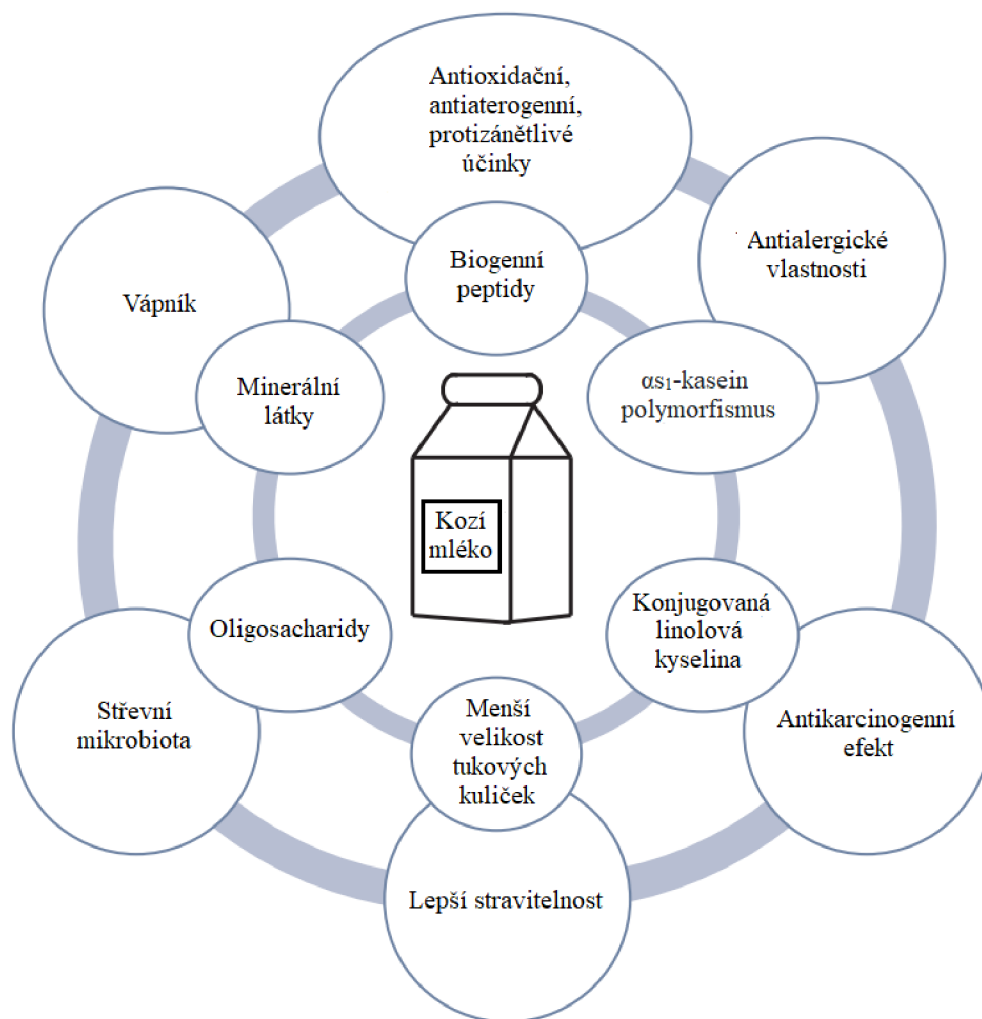
### **3.4 Kozí mléko**

Produkce kozího mléka plní celou řadu důležitých funkcí. K jedné z nich patří ekonomický růst mnoha rozvojových zemí, ale i oblast Středomoří, především státy Francie, Itálie, Španělsko a Řecko. Tyto státy jsou proslulé kvalitními a rozmanitými výrobky na trhu. Kozí mléko dodává lidskému tělu kvalitní přísun živin. Kromě ekonomického hlediska je mléko významné i z nutričního pohledu. Pro rozvojové státy představuje kozí mléko cennou obživu a základní zdroj živin. O výrobky z kozího mléka mají stále větší zájem např. i osoby s alergií na mléko (Park 2010; Ranadheera et al. 2019).

Aktuální světová produkce nebovinního mléka tvoří 133 milionů tun ročně, což představuje 17 % veškeré produkce mléka. Z této hodnoty činí 13,5 % právě mléko kozí. Současné celosvětové stavy jsou odhadovány na 780 milionů koz, které přispívají tvorbou mléka do mlékárenského průmyslu 2 %. Poptávka po kozím mléce se podle celosvětového měřítka stále navyšuje. Mléko se využívá k přímé konzumaci nebo k následné produkci mléčných výrobků (Ranadheera et al. 2019). Na trhu se objevuje široká škála produktů, ať už jsou to nápoje, fermentované sýry, podmásli, jogurty, zmrzliny, máslo nebo kondenzované či sušené kozí produkty. Kozí mléko je vhodná matrice pro vývoj a inovaci nových produktů, které podporují zdraví konzumentů (Verruck et al. 2019).

Vlastnosti kozího mléka se od mateřského a kravského mléka liší zásaditostí, stravitelností a pufrovací kapacitou. Některé prospěšné vlastnosti mají své využití i v lidské výživě. Ze zdravotního hlediska může být pro některé jedince vyhovující alternativou, avšak technologické vlastnosti kozího mléka nejsou pro zpracování zcela vyhovující. Celkový obsah kaseinu je výrazně nižší než v mléce kravském. Hodnoty  $\alpha_1$ -kaseinu jsou velmi nízké, v některých případech i nulové. Kaseinové micely kozího mléka vykazují větší disperzi, což pozitivně ovlivňuje reologické vlastnosti mléčných produktů. Na Obrázku 1 jsou uvedeny hlavní činitele příznivých účinků kozího mléka.

Konečné spotřebitele často odrazuje nepříjemný zápach a chuť kozího mléka a produktů z něj vyrobených. Existuje však způsob, jak toto nežádoucí aroma potlačit. Jedná se o metodu maskování nepříjemných zápachů a chutí. Dochází k tzv. fortifikaci vhodnými probiotickými mikroorganismy, které během kvašení vytvářejí příjemné aromatické sloučeniny a potlačují tak nežádoucí pachy. Probiotické kmeny v kozím mléce produkují exopolysacharidy, které zdokonalují výslednou texturu finálního výrobku a zároveň udržují životnost probiotik během skladování a distribuce (Ranadheera et al. 2019).



Obrázek 1: Hlavní činitele příznivých účinků koziho mléka (upraveno dle Verruck et al. 2019)

### 3.5 Hygienické a legislativní požadavky

Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 provozovatelé potravinářských podniků, kteří vyrábějí, případně svážejí syrové mléko a mlezivo, musí dohlížet na veškerá legislativní a hygienická opatření. Surové mléko a mlezivo musí pocházet od zvířat, která nevykazují žádné příznaky nakažlivých chorob přenosné mlékem a mlezivem na člověka. Kozy musí být v dobré zdravotní kondici, nesmí vykazovat žádné známky nákazy, které by mohly mít za následek kontaminaci mléka případně mleziva. Zvířata netrpí žádnou infekcí pohlavního ústrojí doprovázenou výtokem, ani enteritidou s průjmem, horečkou, nebo zjevným zánětem vemene (mastitidou). Nařízení dále zakazuje zvířatům podávat nepovolené látky či přípravky. V případě podání povoleného přípravku či látky musí být dodržena ochranná

lhůta, která je pro ně určena. Kozy musí být chovány v hospodářství, které je úředně prosté brucelózy a tuberkulózy (Ministerstvo zemědělství 2016).

Zařízení k dojení a prostory pro skladování a chlazení mléka a mleziva musí být umístěny a konstruovány tak, aby nedocházelo k rizikové kontaminaci. Zařízení určené k dojení koz musí být snadno dezinfikovatelné a zhotovené z omyvatelných a netoxických materiálů. Před samostatným dojením koz dojde k hygienickému očištění struku, vemene a přilehlé části. Po nadojení kozího mléka dochází ke zchlazení. V případě, že se jedná o denní svoz, mléko se ochladí na 8 °C. Pokud svoz není prováděn každý den, mléko se ochladí na 6 °C nebo zamrazí. Při přepravě mléka chladicí zařízení nepřesahuje 10 °C (Ministerstvo zemědělství 2016).

Přítomnost mikroorganismů v kozím mléce při teplotě 30 °C musí být  $\leq 1\,500\,000$  KTJ v 1 ml. V případě, že syrové kozí mléko slouží k produkci výrobků, které nejsou tepelně ošetřeny, množství mikroorganismů se snižuje. Obsah mikroorganismů je pak při 30 °C  $\leq 500\,000$  KTJ v 1 ml. Pokud syrové mléko, mléčné výrobky nebo mlezivo podstupuje tepelnému ošetření, pak provozovatel potravinářského podniku musí zajistit, aby ošetření bylo provedeno v souladu s danými specifikacemi. Pasterizaci lze dosáhnout vysokou teplotou a krátkým časem (min. 72 °C po dobu 15 sekund), nízkou teplotou a dlouhým časem (min. 63 °C po dobu 30 minut) nebo jakýmkoliv jiným rovnocenným účinkem. Ošetření velmi vysokou teplotou (UHT) lze dosáhnout teplotou 135 °C a krátkým časem, aby v ošetřeném výrobku nebyly přítomny žádné živé mikroorganismy ani jejich spory (Ministerstvo zemědělství 2016). Počet somatických buněk (PSB), který vypovídá o zdravotním stavu mléčné žlázy zvířete není oficiálně pro kozí mléko stanoven (Souza et al. 2012). Obecně je však známo, že kozí mléko má hodnotu PSB vyšší než mléko kravské (Stuhr et al. 2013). V některých zemích již byly vytvořeny limity pro PSB, a to v rozmezí od 500 000 do 1 000 000 na ml kozího mléka (Souza et al. 2012).

### **3.6 Složení kozího mléka**

Přestože existují specifické odlišnosti ve složení mléka, základní nutriční složky kozího mléka jsou velmi podobné mléku kravskému. Obecné rozdíly ve složení mléka závisí na stravě, plemeni, prostředí, krmivu, ročním období, stádiu laktace, lokalitě chovu, zdravotním stavu zvířete, věku a mnoha dalších faktorech (Park 2017; Turkmen 2017). Kozí mléko je v průměru tvořeno 13,2 % sušinou, kde 4,5 % tvoří tuk, 3,6 % bílkoviny, 4,3 % laktóza a 0,8 % minerální látky (Tabulka 1). V porovnání s mlékem kravským a mateřským obsahuje mléko kozí vyšší



množství sušiny, avšak nejvyšší zastoupení všech makroživin a minerálních látek zastupuje mléko ovčí. Energetická hodnota 1 ml kozího mléka dosahuje 69 kcal (Turkmen 2017).

*Tabulka 1: Základní složení kozího, kravského, mateřského a ovčího mléka (Turkmen 2017)*

Složky	Kozí	Kravské	Mateřské	Ovčí
energie (kcal)	69	61	70	108
celková sušina (g/100 g)	13,2	12,6	12,4	18,8
tuk (g/100 g)	4,5	3,7	3,8	7,5
bílkoviny (g/100 g)	3,6	3,4	1	5,6
laktóza (g/100 g)	4,3	4,7	7	4,6
minerální látky (g/100 g)	0,8	0,7	0,2	1

### 3.6.1 Tuk

Tuk v kozím mléce je tvořen z 98 % triacylglyceroly, 1 % fosfolipidy a 1 % cholesterolem a jeho estery. Hlavní rozdíly mezi kozím a kravským mléčným tukem souvisí se strukturou a velikostí tukových kapének (Prosser 2021). Průměr tukových kuliček kozího mléka představuje 2,5 až 3  $\mu\text{m}$ , což je oproti mléku kravskému nižší hodnota, kde je velikost 3 až 4  $\mu\text{m}$  (Ranadheera et al. 2019). Tukové kuličky jsou v mléce rovnoměrně rozptýleny ve formě emulze (Lad et al. 2017). Kozí mléko tedy obsahuje větší množství tukových kuliček na mililitr mléka. Z hlediska výživy člověka je přirozená homogenizace výhodou. V závěrečné fázi procesu, kdy je kozí mléko zchlazeno na požadovanou teplotu a uskladněno, nedochází ke shlukování tukových kuliček. Hlavním důvodem je absence aglutinu, který je zodpovědný za koagulaci. Touto fyzikální vlastností se kozí mléko odlišuje od mléka kravského (Park 2017; Ranadheera et al. 2019).

Pro kozí mléko je typické zastoupení mastných kyselin s krátkým a středním řetězcem. Ve srovnání s mlékem kravským se kozí mléko vyznačuje téměř dvojnásobným množstvím kapronové (C6:0), kaprylové (C8:0), kaprinové (C10:0) a laurové kyseliny (C12:0) (Park 2017; Turkmen 2017). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem přítomné v kozím mléce tvoří 15 - 18 %, v mléce kravském pouze 5 - 9 %. Za charakteristické mléčné kozí aroma jsou zodpovědné právě tyto mastné kyseliny. Další významný rozdíl se v kozím mléce projevuje vyšším zastoupením esenciálních mastných kyselin (linolovou a arachidinovou kyselinou) a konjugovanou linolovou kyselinou. Studie prokázaly, že přítomnost konjugované linolové kyseliny způsobuje antioxidační, protizánětlivé, antikarcinogenní, antidiabetické,

antihypertenzní a další účinky (Turkmen 2017). Naměřené hodnoty konjugované linolové kyseliny v kozím mléce dosahovaly až 35,75 mg/100 g, zatímco v kravském mléce hladiny netvořily ani polovinu (Turkmen 2017).

### 3.6.2 Sacharidy

Hlavní sacharid, který je majoritně zastupuje kozí mléko je laktóza, označován také jako mléčný cukr. Struktura laktózy je tvořena molekulou glukózy a galaktózy (Park 2017). Tento disacharid se syntetizuje v mléčné žláze všech savců krom tuleňů (Turkmen 2017). V látkovém složení tvoří laktóza přibližně 4,3 - 4,4 %. Koncentrace v kozím mléce se téměř nemění. Při porovnání zastoupení laktózy v kozím a kravském mléce vykazuje mléko kozí o 0,2 - 0,5 % nižší zastoupení. Laktóza je pro člověka cenná živina, která podporuje střevní absorpci vápníku, hořčíku, fosforu a vitamínu D. Zásadní význam laktózy spočívá v udržení osmotické rovnováhy mezi krevním oběhem a alveolárními buňkami mléčné žlázy během syntézy mléka. V kozím mléce se nacházejí i jiné sloučeniny sacharidového charakteru jako například oligosacharidy, glykopeptidy, glykolové proteiny a v malém množství i nukleotidové cukry (Kalyankar et al. 2016). Oligosacharidy obsažené v mléce mají obecně antigenní vlastnosti, pozitivně ovlivňují střevní mikrobiom, zejména u novorozenců, a navíc podporují funkci mozku a centrálního nervového systému (Kalyankar et al. 2016; Turkmen 2017). Oligosacharidy slouží také jako ochrana buněk střevní sliznice před nežádoucími patogeny. Podporují růst přínosných bakterií *Lactobacillus bifidus* ve střevním traktu (Turkmen 2017). Koncentrace oligosacharidů je nižší ve srovnání s lidským mlékem, ale zároveň vyšší v porovnání s mlékem ovčím a kravským (Lad et al. 2017).

### 3.6.3 Bílkoviny

Kozí mléko a mléčné výrobky se řadí k spolehlivým zdrojům vysoce kvalitních bílkovin, které zastupují vyvážené množství důležitých aminokyselin (Kalyankar et al. 2016). Obsah bílkovin je proměnlivý v závislosti na druhu plemene, období laktace, krmení, zdravotním stavu vemene a environmentálních podmínkách. Mléčné bílkoviny jsou v mléce mateřském, kravském i ovčím podobné, ale zastoupení individuálních frakcí se může druhově lišit (Selvaggi et al. 2014). Odlišnost bílkovin obsažených v kozím mléce se projevuje genetickým polymorfismem, četností a obsahem (Ahmed et al. 2015). Obecně lze bílkovinné frakce rozdělit na dvě skupiny, a to nerozpustné kaseiny a rozpustné syrovátkové bílkoviny. Do skupiny kaseinů patří  $\alpha_1$ -kasein,  $\alpha_2$ -kasein,  $\beta$ -kasein a  $\kappa$ -kasein a mezi hlavní syrovátkové bílkoviny se řadí  $\beta$ -laktoglobulin a  $\alpha$ -laktalbumin. V menších koncentracích jsou přítomné

i imunoglobuliny, sérový albumin, proteoso-peptony, laktoferin a transferin (Selvaggi et al. 2014; Turkmen 2017). Množství kaseinových a syrovátkových bílkovin v kozím mléce lze definovat poměrem 80:20 (Selvaggi et al. 2014). Přestože bílkovinné složení kozího mléka je téměř srovnatelné s mlékem kravským, existují určité rozdíly. Kozí mléko vykazuje vyšší zastoupení  $\beta$ -kaseinu, téměř totožné množství  $\kappa$ -kaseinu a nižší nebo nulové zastoupení  $\alpha_1$ -kaseinu. Na koagulační schopnosti mléka se podílí především  $\alpha_1$ -kasein, kterého je v kozím mléce nedostatek a může tak zhoršovat technologickou zpracovatelnost (Ranadheera et al. 2019). Během výroby kozího sýra dochází ke kratší době srážení mléka, avšak výsledný produkt je charakteristický sníženou pevností struktury a výtěžkem (Turkmen 2017). V kozím mléce se objevují i nebílkovinné dusíkaté frakce, kam patří močovina, volné aminokyseliny, nukleosidy, nukleotidy a polyaminy a jejich celkové zastoupení tvoří 5,8 % (Selvaggi et al. 2014).

Bílkovinné frakce se liší zastoupením aminokyselin. Nejvyšší procentuální zastoupení aminokyselin u  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ -kaseinu představuje glutamová kyselina, lysin, tyrosin a prolin, u  $\beta$ -kaseinu je to glutamová kyselina, glutamin, leucin a prolin, u  $\kappa$ -kaseinu prolin, threonin, glutamin a alanin a u  $\beta$ -laktoglobulinu pak leucin, lysin a alanin (Amigo & Fontecha 2022).

Některé cenné bílkovinné frakce našly své uplatnění v potravinářském průmyslu teprve v nedávné minulosti. Např. syrovátková bílkovina byla dříve považována za vedlejší nebo odpadní produkt mlékárenského průmyslu, a to díky malé, téměř nevýznamné hodnotě pro spotřebitele. V posledních desetiletí se však názor obrátil a zájem o syrovátkovou bílkovinu vzrostl (Hernández-Ledesma et al. 2011). Využití syrovátkové bílkoviny se rozšířilo jak v potravinářském, tak v nepotravinářském průmyslu po celém světě (Khan et al. 2019). Tento nutričně významný a cenově dostupný vedlejší produkt vzniká při procesu výroby sýra (Zhao et al. 2021). Syrovátková bílkovina je využívána v potravinářském odvětví jako emulgační, želírující nebo objemový prostředek. Nejdůležitější vlastnost této bílkoviny je však její vysoká biologická hodnota. Využitelnost syrovátkové bílkoviny stále není stoprocentní, přibližně 30 až 35 % je zlikvidováno (Khan et al. 2019).

### 3.6.4 Minerální látky

Zastoupení minerálních látek v kozím mléce vykazuje velkou variabilitu, a to v závislosti na genetických faktorech, fázi laktace, druhu krmiva a analytických postupech. Kozí mléko jednoznačně obsahuje vyšší hladinou vápníku, fosforu, draslíku, hořčíku a chlóru, a naopak nižší hodnoty sodíku než mléko kravské (Amigo & Fontecha 2022).

### 3.6.5 Vitaminy

Hladiny lipofilních a hydrofilních vitaminů se liší v závislosti na vnějších i vnitřních faktorech. Vitaminy obsažené v kozím mléce představují podobné složení jako u mléka kravského a mateřského (Turkmen 2017). Kozí mléko je zdrojem vitamínu A, D, E, C, B3 (niacin), B1 (thiamin), B2 (riboflavin) a B5 (panthotenovou kyselinu). Zároveň obsahuje i nízké koncentrace vitamínu B12 (kobalamin) a B9 (kyselinu listovou) (Ranadheera et al. 2019). Studie potvrdily, že kozí mléko obsahuje pětikrát méně vitamínu B12 a listové kyseliny, což může u kojenců vyvolat tzv. anémii neboli megaloblastickou anémii. Příčinou je především nedostatečné množství listové kyseliny a kobalaminu, které je důležité pro syntézu hemoglobinu (Park 2017, Turkmen 2017).

V podkapitole Vybrané látky s prokazatelným antioxidačním účinkem obsažené v kozím mléce je podrobně popsán vitamin A a E, které byl stanoven ve vzorcích kozího mléka. Obecně mléko není považováno jako bohatý zdroj vitaminů A a E, ale díky pravidelné konzumaci mléka a široké škále mléčných výrobků lze tvrdit, že patří ke kvalitním zdrojům těchto vitaminů (Park 2017).

### 3.7 Oxidační stres

Termín oxidační či oxidativní stres označuje nerovnováhu mezi volnými radikály a antioxidačními mechanismy v organismu. V tento okamžik je snahou antioxidantů přítomných v těle neutralizovat a detoxikovat škodlivé působení volných radikálů (El-Fattah et al. 2019). V případě, že nastane nerovnovážený systém v organismu, volné radikály spustí nežádoucí řetězovou reakci, která napadne buněčné membrány, zablokuje činnost důležitých enzymů, zabrání správnému buněčnému dělení, poškodí deoxyribonukleovou kyselinu DNA, zamezí tvorbě energie v organismu a další.

Teoretické poznatky o volných radikálech kyslíku jsou známy více než 50 let, avšak teprve před 20 lety došlo k provázání souvislostí s rozvojem rakoviny a mnoha metabolických a chronických onemocnění. Přítomnost volných radikálů v lidském těle je v určitých hladinách žádoucí. Volné radikály plní např. obrannou funkci proti bakteriím, parazitům a antigenům. Prostřednictvím leukocytů, makrofágů a volných radikálů dochází k tzv. respiračnímu vzplanutí, při němž dojde k usmrcení bakterie a následné likvidaci odumřelých buněk. Studie také vypovídají o účasti volných radikálů při některých buněčných signalizačních procesech (Sharifi-Rad et al. 2020). Dále bylo prokázáno, že malé množství reaktivní formy kyslíku (ROS) napomáhá k udržení a regulaci homeostázy (Sharifi-Rad et al. 2020). Nadbytečná

produkce ROS může naopak způsobit nekontrolovatelné pochody v organismu (Bhat et al. 2015).

### 3.7.1 Volné radikály, reaktivní formy kyslíku a dusíku

Označení volný radikál platí pro molekulární fragmenty, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů ve svém atomovém/molekulovém orbitalu. Lze je definovat jako látky nestabilní a vysoce reaktivní. Právě tyto nepárové elektrony určují volným radikálům stupeň reaktivity (Fang et al. 2002; Bhat et al. 2015).

## ROS

Reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS, Reactive oxygens species) nebo také označovány jako volné kyslíkové radikály představují nejdůležitější skupinu radikálů produkovaných v živých systémech (Valko et al. 2007). Reaktivní formy kyslíku je možné rozdělit na dvě skupiny (Tabulka 2), a to skupinu volných radikálů a skupinu neradikálových oxidačních činidel, které lze snadno na radikály přeměnit (Bayr 2005). Ke zvýšené produkci ROS v buňkách přispívá mnoho spouštěčů z okolního prostředí, kterému je jedinec vystavován. Mezi hlavní exogenní zdroje ROS patří cigaretový kouř, UV záření, ionty těžkých kovů, zvýšená produkce ozonu, léky, nebezpečné toxiny, ale i chemické přípravky jako jsou pesticidy a insekticidy. ROS nepřicházejí pouze z vnějšího prostředí, ale jsou produkovány i v samotném organismu. Hlavní endogenní zdroj ROS, ale i reaktivních forem dusíku (RNS) je mitochondriální elektronový transportní řetězec, dále pak endoplazmatické retikulum, peroxizomy a další. Imunitní buňky - makrofágy a neutrofilny také mohou produkovat ROS, a to díky svým specifickým mechanismům, které jsou závislé na kyslíku v boji proti nežádoucím napadajícím mikroorganismům. Organela mitochondrie slouží jako hlavní producent ROS a zároveň se chová i jako receptor. Nadbytečná produkce ROS může způsobit nekontrolovatelné pochody v organismu. Zasaženy nejčastěji bývají buněčné lipidy, proteiny nebo molekuly DNA (Bhat et al. 2015). U proteinů dochází k modifikaci struktury a pozměnění původní funkce, což má za následek dysfunkci a narušení životně důležitých procesů. Poškozená struktura proteinu vede k záměně aminokyselin, rozpadu peptidového řetězce, změně elektrického náboje, enzymatické inaktivaci a sklonu k proteolýze. Při zasažení lipidových buněk dochází k narušení lipidové membrány a zvýšení permeability. ROS mohou poškodit molekuly DNA, a to následnou oxidací deoxyribózy, rozpletením řetězce, odstraněním

nukleotidů, záměnou báze, případně změnou trojrozměrného uspořádání (Sharifi-Rad et al. 2020).

Všechny typy ROS jsou pro lidský organismus velmi škodlivé. Jejich cílem je oxidovat a následně inaktivovat funkci buněk. Procesy vyvolané ROS mohou způsobit nevratné změny v organismu. Nejčastěji dochází k apoptóze a nekrotické buněčné smrti (Sharifi-Rad et al. 2020).

Tabulka 2: Reaktivní formy kyslíku (Bayr 2005)

Reaktivní formy kyslíku			
Volné radikály		Neradikálová oxidační činidla	
superoxid	$O_2^{-\bullet}$	peroxid vodíku	$H_2O_2$
hydroxylový radikál	$HO^{\bullet}$	kyselina chlorná	$HOCl$
peroxyl	$ROO^{\bullet}$	ozon	$O_3$
alkoxyl	$RO^{\bullet}$	singletový kyslík	$^1O_2$
hydroperoxyl	$HO_2^{\bullet}$		

## RNS

Reaktivní sloučeniny dusíku (RNS, Reactivenitrogen species) představují sloučeniny, které jsou odvozené především od oxidu dusnatého. Hlavní reaktivní formy dusíku jsou uvedeny v Tabulce 3. Reaktivní forma oxidu dusnatého ( $NO^{\bullet}$ ) je charakteristická jedním nepárovým elektronem (Martínez & Andriantsitohaina 2009).  $NO^{\bullet}$  se v tkáních produkuje specifickými syntázami oxidu dusnatého, které napomáhají metabolizovat arginin na citrulin a zároveň tvoří tuto formu radikálu. Tento reaktivní radikál působí jako důležitá signální molekula, která se projevuje v mnoha fyziologických procesech. Studie zabývající se touto problematikou odhalila pozitivní vliv  $NO^{\bullet}$  na relaxaci hladkého svalstva, regulaci krevního tlaku, přenos nervového vzruchu a obranné mechanismy (Bhat et al. 2015). V budoucnosti by RNS mohly pomoci při léčbě neurodegenerativních, kardiovaskulárních, metabolických a zánětlivých onemocnění (Martínez & Andriantsitohaina 2009). Nadměrná produkce RNS je označována jako nitrosativní stres. K tomuto stavu dochází v případě, kdy je produkce RNS v organismu v nadbytku a organismus už není schopen tyto volné radikály neutralizovat a eliminovat. Nitrosativní stres vede ke změně struktury proteinů a zamezí jejich normální funkce (Valko et al. 2007).

Tabulka 3: Reaktivní formy dusíku (upraveno dle Martínez & Andriantsitohaina 2009)

Reaktivní formy dusíku			
Volné radikály		Neradikálová oxidační činidla	
oxid dusnatý	NO <sup>•</sup>	nitrosonium	NO <sup>+</sup>
oxid dusičitý	NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	nitroxyl	NO <sup>-</sup>
		kyselina dusitá	HNO <sub>2</sub>
		oxid dusitý	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
		oxid dusičný	N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
		nitronium	NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>
		peroxynitrit	ONOO <sup>-</sup>
		alkylperoxynitrit	ROONO

### 3.7.2 Antioxidační vlastnosti mléka

Světová populace stárne, chronických onemocnění přibývá a po celém světě panuje socioekonomický problém. Organizace pro podporu zdraví proto intenzivně vytvářejí strategie, které se podílejí na efektivní podpoře zdraví světové populace. Jedna z klíčových strategií, jak podpořit lidský organismus, je navýšit přísun antioxidantů (Benzie & Choi 2014). Lidské tělo se brání několika antioxidačními mechanismy, jako je systém enzymů superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza (Cömert & Gökmen 2020). Endogenní antioxidanty nelze v organismu nijak navyšovat, avšak exogenní lze. Pestrá strava, a s tím spojený vyšší příjem antioxidantů nabízí potenciální cestu, jak cíleně chránit organismus před oxidačním stresem (Benzie & Choi 2014). Při nedostatečném příjmu antioxidantů je organismus vystavován riziku vzniku oxidačního stresu. V tento okamžik nastává v těle nerovnováha mezi volnými radikály a antioxidačním obranným systémem. Zvýšením exogenních antioxidantů dochází ke zpomalení biologického stárnutí a snižování rizik chronických degenerativních onemocnění jako jsou např. kardiovaskulární onemocnění, rakovina, autoimunitní poruchy, neurodegenerativní onemocnění a diabetes mellitus (Cömert & Gökmen 2020). Metabolické choroby jsou úzce spjaty i s životním stylem jedince (Khan et al. 2019). Na trhu existuje mnoho komerčně dostupných antioxidačních doplňků, avšak současné doporučení pro podporu zdraví směřují populaci k vyšší konzumaci potravin bohatých na přírodní antioxidanty, nikoli doplňky stravy (Benzie & Choi 2014).

Mléko a mléčné výrobky tvoří přibližně 25 - 30 % průměrné stravy jedince. Tyto výživné potraviny obsahují celou řadu esenciálních složek. Jedná se především o olejovou kyselinu, konjugovanou linolovou kyselinu, omega 3 mastné kyseliny, vitaminy, minerální látky

a bioaktivní sloučeniny - antioxidanty. Na světovém trhu stále narůstá poptávka po potravinách, které obsahují přírodní antioxidanty. Antioxidační kapacita mléčných výrobků a samotného mléka je tvořena přítomností enzymatických mechanismů - superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza, vitaminy A, E, karotenoidy a přítomnost vázané síry v aminokyselinách, z nichž jsou tvořeny bílkoviny (Khan et al. 2019). Příjem čerstvého mléka, u novorozenců mateřského mléka, je důležitý zdroj antioxidantů, který působí jako prevence nebo snižuje poškození různých tělesných tkání. Účinky antioxidačních vlastností mléka mohou být ovlivněny mnoha faktory. Ztráty nejčastěji nastávají v průběhu pasterizačního ošetření mléka, případně fáze laktace. Pokles antioxidační aktivity může být spojován i se zeměpisnou polohou farmy, ve které jsou zvířata chována (Alyaqoubi et al. 2014).

### **3.7.3 Oxidační stabilita mléka**

Mlékárenský průmysl se při výkupu mléka od svých dodavatelů vždy zajímá o kvalitu a čerstvost. Stabilita mléka a odolnost vůči oxidaci je jedním z faktorů, který má negativní dopad na zpracování mléka a mléčných výrobků, zhoršení nutriční kvality, skladování a zejména se odráží na senzorických vlastnostech výrobku. Oxidační stabilita je dána rovnovážným vztahem mezi antioxidačními a oxidačními procesy probíhajícími v mléce a mléčných výrobcích. Při zvýšené oxidaci se mléčné produkty projevují silným nežádoucím zápachem. V současné době je možné vzorky citlivé na oxidační procesy monitorovat pomocí měření antioxidační kapacity. Oxidační stabilita mléka a mléčných výrobků závisí především na zastoupení jednotlivých mastných kyselin, dále pak na koncentraci tokoferolů a karotenoidů (Khan et al. 2019). Za nejsložitější přírodní tuk je považován tuk mléčný, a to díky vysoké rozmanitosti v zastoupení mastných kyselin. Profil mastných kyselin je dán mnoha faktory jako je plemeno, stádium laktace, mastitida, bacherová fermentace, druh krmiva, sezónní vlivy apod. (Bučević-Popović et al. 2014). Následné procesy, které probíhají po výrobě mléčného produktu, tj. zpracování, balení a skladování mají výrazný vliv na množství přirozeně se vyskytujících antioxidantů ve výrobku (Khan et al. 2019).



## 3.8 Vybrané látky s prokazatelným antioxidačním účinkem

### 3.8.1 Vitamin A

#### Funkce vitamínu A v lidském těle

Vitamin A je nezbytnou součástí mnoha metabolických pochodů, z tohoto důvodu je pro člověka potřebný v malých množstvích během celého života (Fairulnizal Md Noh et al. 2019). Podílí se na celé řadě klíčových funkcí, a to na imunitním systému, zachování integrity epitelálních buněk, reprodukci, funkci vaječnicků, embryonálním vývoji, buněčné komunikaci, a především na správné funkci zraku. Tento vitamin je také důležitý antioxidant. Nedostatečné množství tohoto vitamínu může vyvolat u člověka i metabolické onemocnění jako je obezita, diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, jaterní a kožní onemocnění (Nozière et al. 2006; Blaner 2020, NIH, Office of Dietary Supplements 2021). Neustále se objevují nové biologické funkce vitamínu A, např. souvislost s reakcí na inzulín, energetická bilance, metabolismus lipidů a vliv na nervový systém (Fairulnizal Md Noh et al. 2019).

Vitamin A zastupuje jednu z důležitých rolí v organismu, čímž je zrak. Velmi časný a subjektivní příznak nedostatku vitamínu A se projevuje sníženou schopností vidění či šeroslepostí. V lidském oku se vitamin A váže ve formě 11-cis retinal na protein opsin, a tím je umožněn vznik zrakových pigmentů rhodopsinů (tyčinek) a iodopsinů (čípků). Vstupující světlo přeměňuje izomeraci navázaný 11-cis retinal na all-trans formu, která vyvolá excitaci fotoreceptorové buňky. Tato izomerační reakce spustí nervový signál, který vede do centra mozkové kůry a následně je převeden na obraz (Fairulnizal Md Noh et al. 2019).

Retinová kyselina vzniká v návaznosti jako metabolit vitamínu A. Ten je nezbytný pro správnou činnost imunitního systému. Retinol a jeho deriváty pracují na principu imunitních zesilovačů, které posilují protilátkovou odpověď a zároveň se podílejí na obnově a integraci všech buněk sliznic. Dále se retinol podílí na vývoji leukocytů, které jsou nedílnou součástí imunitního systému organismu. Podle nejnovějších poznatků hlavní místo působení vitamínu A v imunitní odpovědi souvisí s T-lymfocyty (Fairulnizal Md Noh et al. 2019).

Vitamin A je aktivně zapojován do tvorby červených krvinek, které jsou odvozeny z kmenových buněk. Za správnou diferenciaci právě zodpovídají retinoidy. Studie prokázaly, že vitamin A má za následek usnadněnou mobilizaci zásob železa do nově vyvíjejících se erytrocytů, kde je ukládáno do struktury hemoglobinu přenášejícího kyslík (Cusick et al. 2005).

Deficit retinolu a retinové kyseliny se může negativně projevit i na vývoji lidského embrya. Nedostatek vede ke špatné diferenciaci tří zárodečných obalů nebo k nedokonalému vývoji končetin během embryogeneze (Gutierrez-Mazariegos et al. 2011).

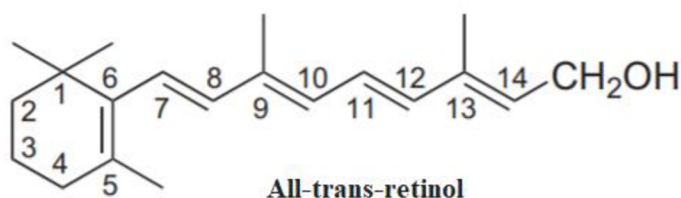
Spermatogeneze neboli vývoj spermií je rovněž ovlivněn nedostatkem některých forem vitamínu A. Např. retinová kyselina se podílí na regulaci gametogeneze u samčích i samičích gamet a následnému přechodu do stádia meiózy (Wright 2010).

Princip antioxidační aktivity vitamínu A či  $\beta$ -karotenu pramení ze schopnosti vychytávat reaktivní formy kyslíku, a kromě vyvolání antiproliferačního účinku prostřednictvím receptoru retinové kyseliny a receptoru retinoidu může zlepšit imunitní funkci. Tímto způsobem jsou zablokovány některé karcinogenní procesy a zároveň je omezen růst nádorových buněk (Oruch & Pryme 2012).

### Chemická struktura vitamínu A

Vitamin A je řazen do skupiny lipofilních vitaminů. V lidském těle se vyskytují 3 aktivní formy vitamínu A, a to nejvýznamnější all-trans-retinol, retinal a retinová kyselina (Higdon 2000). Struktura těchto látek je velmi podobná. Všechny tyto příbuzné látky spadají do skupiny terpenoidů označované také jako isoprenoidy (Graulet 2010).

Za hlavní formu vitamínu A je obecně považován biologicky aktivní all-trans-retinol neboli axeroftol či vitamin A<sub>1</sub> (Obrázek 2). Tato lipofilní látka žluté barvy je vstřebávána konzumací potravin živočišného původu. Sloučenina retinol je tvořena 20 atomy uhlíku s 5 konjugovanými dvojnými vazbami v řetězci, resp. alicyklický diterpenový alkohol s charakteristickým  $\beta$ -jononovým cyklem, na který je na 6. uhlíku napojen polyenový řetězec se 4 konjugovanými dvojnými vazbami. Existuje i vitamin A<sub>2</sub> (3,4-didehydroretinol), jehož aktivita je v porovnání s retinolem rapidně nižší. Retinol zastupuje v potravinách mnoho analogů nebo metabolitů, které se liší strukturou jononového cyklu nebo jeho postranního řetězce (Ball 2004; Graulet 2010; Kumar et al. 2021).



Obrázek 2: Chemická struktura all-trans-retinolu (Combs & McClung 2017)

## Doporučené denní dávky

Vstřebávání jednotlivých provitaminů je velmi variabilní v závislosti na látkovém složení potravin, způsobu přípravy pokrmů, a především na množství tuku. Transport provitaminů z potravin do těla není kvantitativní, vždy dochází k mírným ztrátám. Obecně denní potřeby člověka jsou pokryty z 50 % provitaminy zastoupenými v rostlinné stravě. Přibližně 40 % potřeby tvoří provitaminy zeleniny, 20 % provitaminy a retinol masa, 15 % provitaminy a retinol mléka, 8 % provitaminy ovoce, 8 % retinol tuků a 6 % provitaminy a retinol vajec (Velíšek & Hajšlová 2009).

Obsah vitamínu A je vyjádřen v mezinárodních jednotkách (IU). Jedna jednotka IU je definována jako 0,3 µg retinolu nebo 0,6 µg β-karotenu případně 1,2 µg dalších provitaminů A. V Tabulce 4 jsou uvedeny denní doporučené dávky pro jednotlivé skupiny populace (Velíšek & Hajšlová 2009). Lidské tělo toleruje široký rozsah vitamínu A, avšak nedostatečný nebo nadměrný příjem může vyvolat negativní dopad na organismus. Pokud hodnota retinolu poklesne pod hladinu < 500 µg na den, mohou být u jedince pozorovány známky šerosleposti, xeroftalmie neboli vysychání oční rohovky, keratinizace nebo až úplné vyčerpání a smrt. V nadbytečném množství, tzn. více než stonásobek doporučeného příjmu pro dospělé osoby a více než dvacetinásobek doporučeného příjmu pro děti, je vitamin A pro organismus toxický. K hlavním příznakům hypervitaminózy se řadí zvracení, bolesti hlavy, praskání rtů, poškození kostí a jater, alopecie apod. (Fox et al. 2015).

*Tabulka 4: Doporučené denní dávky retinolu pro specifické skupiny (Velíšek & Hajšlová 2009)*

Skupina populace	Doporučená denní dávka retinolu [mg]
děti	0,4 - 0,6
dospělí	0,8 - 1,0
těhotné ženy	1,0 - 1,2
kojící ženy	1,2 - 2,0

## Vitamin A mléce a mléčných výrobcích

Mléko a mléčné produkty patří také k významnému zdroji vitamínu A. V porovnání s jinými potravinami mléko a mléčné produkty obsahují poměrně nízké koncentrace retinolu, avšak konzumace tohoto sortimentu je u spotřebitelů pravidelná. Obsah vitamínu A roste s přítomným tukem, zejména u mléčných výrobků a másla (Velíšek & Hajšlová 2009). Podle dostupných informací se vitamin A v kozím mléce pohybuje okolo hodnoty 0,04 mg/100 g

a pouze stopové množství karotenoidů (Lima et al. 2018). Pro porovnání naměřených hodnot plnotučné kravské mléko obsahuje v průměru stejné množství retinolu jako mléko kozí a 0,02 mg karotenu/100 g (Fox et al. 2015).

Na mléko a mléčné výrobky působí mnoho výrobních faktorů, které snižují hladiny retinolu ve finálním produktu. Např. při vysoké pasteraci (UHT) mléka a při sušení dochází k jeho degradaci až o 6 %. Volba nevhodného obalového materiálu může při skladování zapříčinit vitaminové ztráty. Průnik světla a kyslíku k výrobku způsobuje 20 - 30% pokles vitamínu za pouhou hodinu. Obecně sušené mléko obsahuje nejstabilnější formu vitamínu A i při dlouhodobém skladování (Velíšek & Hajšlová 2009).

### **3.8.2 Karotenoidy**

Aktivita vitamínu A byla prokázána přibližně u 50 přirozeně se vyskytujících sloučenin ze skupiny karotenoidů. Nejznámějším provitaminem vitamínu A je  $\beta$ -karoten. Mezi další provitaminy vitamínu A lze zařadit  $\alpha$ -karoten,  $\gamma$ -karoten,  $\beta$ -kryptoxanthinem, echinenonem a další (Velíšek & Hajšlová 2009). Rozsáhlá skupina karotenoidů je tvořena více než 600 přírodními pigmenty, které jsou syntetizovány vyššími rostlinami, řasami a fotosyntetickými bakteriemi. Xantofyl, karoten a lykopen jsou zodpovědné za žluté, oranžové a červené zbarvení. Rostlinné karotenoidy přecházejí do živočišných produktů, někdy ve velké míře jako např. vaječný žloutek nebo v menším množství, jako u mléčných produktů přežvýkavců. Karotenoidy upravují barvu mléka a mléčných výrobků. Nažloutlé odstíny jsou způsobeny pastevním produkčním systémem přežvýkavců (Nozière et al. 2006). Mléko od koz krmených na pastvě obsahuje vyšší hladiny karotenoidů než od koz, které byly krmeny koncentrovanými krmivými. Existuje také velká sezónní variabilita v koncentraci vitamínu A. Bylo zjištěno, že mléko produkované v letních měsících obsahuje vyšší hladiny vitamínu A a  $\beta$ -karotenu než mléko nadojené v zimě (Fox et al. 2015).

### **3.8.3 Vitamin E**

#### Funkce vitamínu E v lidském těle

Vitamin E je nezbytný pro organismus a je přijímán výhradně ze stravy. Mezi nejdůležitější lipofilní antioxidanty patří právě  $\alpha$ -tokoferol, který pozitivně ovlivňuje lidské zdraví. Hlavním úkolem těchto vitaminů je chránit polynenasycené mastné kyseliny před procesem oxidace, která probíhá na úrovni buněčných membrán a v plazmatických lipoproteinech (Graulet 2010). Ochrana je zvláště důležitá u novorozenců pro správný vývoj

nervového systému a zároveň předchází rozvoji degenerativních zánětlivých onemocnění v dospělosti (Debieer et al. 2005; Graulet 2010). Mezi další zdravotní účinky, které byly prokázány při příjmu tokoferolů a tokotrienolů je řazena prevence před kardiovaskulárním onemocněním, metabolickými poruchami, rakovinou a neurodegeneračním onemocněním. Dále působí protizánětlivě a posiluje imunitní systém (De Camargo et al. 2019).

Studie a průzkumy, které se prováděly na populaci jedinců konzumující vysoké množství vitamínu E, odhalily snížený výskyt chronických onemocnění. Vše souvisí s antioxidační kapacitou skupiny vitamínů E. Princip je založen na schopnosti vitamínu E darovat volným radikálům. Výsledný tokoferoxylový radikál je při porovnání s volným radikálem mnohem méně reaktivní, tudíž nešíří oxidační řetězovou reakci. Vzniklý tokoferoxylový radikál může vstoupit do reakce s jiným tokoferoxylovým radikálem nebo může být zredukován askorbovou kyselinou za vzniku stabilních produktů, které neohrožují lidský organismus (Ehizuelen Ebhohimen et al. 2021).

V roce 2010 vzrostl celosvětový počet diagnostikovaných případů rakoviny na 13,3 milionů. Rok 2018 navýšil na 18,8 milionů a předpověď na rok 2030 se má pohybovat okolo 20 milionů diagnostikovaných případů (Ghosh et al. 2020). Rakovina je charakterizována jako komplikovaný chorobný stav organismu, kdy není možné kontrolovat buněčný růst. Karcinogenezi lze rozdělit na tři fáze - iniciace, progresse a promoce. Volné radikály působí ve všech úrovních a jsou schopni reagovat se všemi složkami DNA (Ehizuelen Ebhohimen et al. 2021). Problém tohoto onemocnění je ukotven v genetické heterogenitě a složitosti pokročilých stádií. Komplikace také souvisejí s rezistencí na léčbu a opakovaným návratem nemoci (Ghosh et al. 2020).

Vitamin E se objevuje v několika podobách. Formy vitamínu E se od sebe navzájem liší rozdílnou protirakovinnou aktivitou (Rizvi et al. 2014). Vyšší protirakovinné vlastnosti byly zaznamenány u  $\gamma$ -tokoferolu,  $\delta$ -tokoferolu,  $\gamma$ -tokotrienolu a  $\delta$ -tokotrienolu (Ehizuelen Ebhohimen et al. 2021). Mnoho studií se zabývalo pozorováním účinku suplementace či zvýšeného příjmu vitamínu E na rozvojové stádium rakoviny, avšak výsledky jsou sporné. Podle Liebeskind (2005) lze tvrdit, že vysoký příjem vitamínu E nebo doplňků stravy může snížit riziko rakoviny tlustého střeva. Nicméně Kohortová studie (Nurses' Health Study and the Health Professionals Follow-up Study) nedokázala výsledky potvrdit (Ghosh et al. 2020).

Existuje souvislost deficitu vitamínu E a šedého zákalu. Onemocnění postihuje starší populaci, kdy dochází ke snížené funkci zraku. Šedý zákal vzniká v důsledku akumulace proteinů oxidovaných volnými radikály (Ehizuelen Ebhohimen et al. 2021). Některé studie odhalily potenciální vztah mezi suplementací vitamínu E a vznikem šedého zákalu. Prozatím

výsledky a důkazy studií nepostačují k závěru, aby vitamin E ve formě suplementace nebo v kombinaci s jinými antioxidanty byl označen za prostředek snižující výskyt šedého zákalu (Rizvi et al. 2014).

Vznik a nástup neurologických poruch souvisí také s oxidačním stresem. Jedná se především o Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu. V obou případech se projevuje zvýšená oxidace proteinů, lipidů a molekul DNA, a to v závislosti na věku a snížené antioxidační aktivitě (Ehizuelen Ebhohimen et al. 2021). V případě Alzheimerovy choroby proces oxidace vyvolá zesíťování proteinů a agregaci  $\beta$ -amyloidního proteinu, což vede k degenerativnímu zániku neuronů (Rizvi et al. 2014). Studie zabývající se Alzheimerovou chorobou potvrdila, že suplementace vitaminu E může zpomalit postupování onemocnění u pacientů, kteří se nacházejí ve středně těžkém stádiu (Mangialasche et al. 2013).

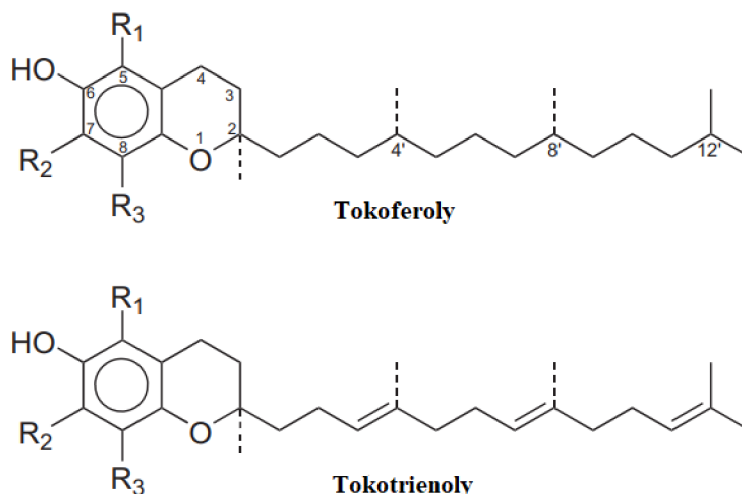
Kardiovaskulární onemocnění je vyvoláno procesem oxidace lipoproteinů s nízkou hustotou a následným vznikem zánětu. Výzkumy zjistily, že  $\gamma$ -tokoferol prokazatelně podporuje kardiovaskulární funkce zvýšením aktivity syntázy, která produkuje oxid dusnatý, a tím uvolňuje cévy. Studie zabývající se tímto problematickým onemocněním uvedla, že suplementace  $\gamma$ -tokoferolu v denní dávce 100 mg u pacientů vedla k redukci některých rizikových faktorů. Zavedená suplementace omezila agregaci krevních destiček a snížila hladinu cholesterolu (Rizvi et al. 2014).

Přestože několik forem vitaminu E má prokazatelný antioxidační účinek a pozitivně působí proti mnoha onemocněním, aktuálně neexistuje žádné klinické použití jako léčivo. Studie antioxidační aktivity v podobě *in vitro* je plně zdokumentována, avšak studie *in vivo* není zcela průkazná (Ehizuelen Ebhohimen et al. 2021). V posledních 15 až 20 letech se výzkum rozšířil z primárního  $\alpha$ -tokoferolu i na jiné antioxidační formy tokoferolů a tokotrienolů. Dobře zdokumentované antioxidační a pozitivní účinky mezi příjmem, suplementací  $\alpha$ -tokoferolu a chronickým onemocněním doposud neprokázaly dostatečně stabilní přínosy pro prevenci výše popsanych onemocnění (Jiang 2014).

### Chemická struktura vitaminu E

Skupina vitaminu E se skládá z 8 strukturálně příbuzných derivátů chroman-6-olu, které lze rozdělit na tokoferoly a tokotrienoly (Obrázek 3). Tyto sloučeniny mají ve své struktuře zabudovaný typický chromanový cyklus s hydrofobním nasyceným nebo nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem, který se skládá z 16 atomů uhlíku (Combs & McClung 2017). Pro tokoferoly je typický nasycený terpenoidní postranní řetězec, kdežto pro

tokotrienoly nenasycený postranní řetězec s 3 dvojnými vazbami. Odlišnost jednotlivých tokoferolů a tokotrienolů je závislá na poloze a počtu methylových skupin, které jsou navázány na chromanový cyklus. Aby tyto sloučeniny vykazovaly biologickou aktivitu vitamínu E, musí obsahovat ve struktuře volný hydroxyl nebo esterovou vazbu na 6. uhlíku v chromanovém cyklu. Vitamíny E jsou pak pojmenovány podle polohy a počtu methylových skupin navázaných na chromanovým jádře. Každý tokoferol se může díky chirálnímu uhlíku ve struktuře vyskytovat v 8 isomerních formách, avšak v přírodě se objevují jen některé (Ball 2004). K nejznámějším zástupcům přírodních tokoferolů je řazen (RRR)- $\alpha$ -tokoferol, ve zkratce označován jako  $\alpha$ -T. Za pokojové teploty se jedná o světle žlutou olejovitou látku, která je nerozpustná ve vodě, ale snadno rozpustná v nepolárních rozpouštědlech. U tokotrienolů je také známo 8 isomerů. V přírodě se lze setkat pouze s  $\alpha$ -tokotrienolem, který se ve zkratce označuje jako  $\alpha$ -T-3 nebo  $\alpha$ -TT (Graulet 2010).



Obrázek 3: Chemická struktura skupiny vitamínů E (Combs & McClung 2017)

### Doporučené denní dávky

Denní doporučené dávky vitamínu E nejsou doposud přesně definovány. Potřeba vitamínu závisí na příjmu polyenových mastných kyselin, které jsou obsaženy především v rostlinných olejích, margarínech, ale i v potravinách živočišného původu jako např. maso, játra, mléko a další. Pro jedince, kteří v průměru denně konzumují 14 - 19 g mastných kyselin byl doporučen příjem 15 mg vitamínu E. Těhotné ženy by měly navýšit doporučený denní příjem o 2 mg a kojící ženy až o 5 mg (Velíšek & Hajšlová 2009). Nejnovější poznatky reálné spotřeby vitamínu E, resp.  $\alpha$ -tokoferolu jsou uvedeny v Tabulce 5. Pro představu biologická

aktivita  $\beta$ -tokoferolu činí 50 % aktivity  $\alpha$ -tokoferolu,  $\gamma$ -tokoferolu 10 % a  $\delta$ -tokotrienolu 3 % (Fox et al. 2015).

Tabulka 5: Doporučené denní dávky  $\alpha$ -tokoferolu pro specifické skupiny (Combs & McClung 2017)

Skupina populace	Doporučená denní dávka $\alpha$ -tokoferolu [mg]
0 - 6 měsíců	4
7 - 11 měsíců	5
1 - 3 let	6
4 - 8 let	7
9 - 13 let	11
14 - 70 + let	15
těhotné ženy	15
kojící ženy	19

Hypervitaminóza vitamínu E se u populace vyskytuje pouze ojediněle. Extrémně vysoké dávky vitamínu mohou narušit proces srážlivosti krve (Fox et al. 2015). Naopak nedostatek vitamínu E je poměrně vzácný. Deficit se objevuje převážně jen u jedinců s vrozenými predispozicemi, kdy je omezená schopnost vstřebávat potřebné vitamíny z potravy. Tento stav může nastat např. při cystické fibróze, syndromu krátkého střeva nebo při obstrukci žlučovýchodů. Jedinci pak mají omezenou absorpci tuků z potravin nebo trpí vzácnými poruchami metabolismu tuků (Rizvi et al. 2014).

#### Vitamin E v mléce a mléčných výrobcích

Vitamin E je v potravinách živočišného původu silně ovlivněn složkami krmiva a na vysoké výkyvy má vliv i roční období. Tuky živočišného původu vykazují výrazně nižší hladinu vitamínu E v porovnání s rostlinnými oleji. Khan et al. (2019) uvádí obsah vitamínu E v kozím mléce 0,03 mg/100g, zatímco Amigo & Fontecha (2022) ve své studii došli k hodnotě 0,12 mg/100 g, což je čtyřnásobek první hodnoty. Sunaric et al. (2012) stanovovali hodnoty  $\alpha$ -tokoferolu v syrovém kozím mléce. Vzorky mléka pocházely z venkovského horského chovu, kde kozy byly krmeny přírodními krmivy, nikoli krmivem obohaceným o vitamíny. Množství  $\alpha$ -tokoferolu obecně závisí na obsahu mléčného tuku. V odebraných vzorcích syrového mléka, které obsahovaly průměrně 4,4 % tuku bylo naměřeno 1,25 pg/ml  $\alpha$ -tokoferolu.



### 3.8.4 Bioaktivní peptidy

Mléčné bioaktivní peptidy vznikají z mléčných bílkovin buď enzymatickým rozkladem trávicími enzymy, tj. gastrointestinálním trávením nebo jsou tvořeny během mikrobiální fermentace mléka bakteriemi mléčného kvašení. Vzniklé bioaktivní peptidy se skládají obvykle ze 2 - 20 aminokyselin a k jejich aktivaci dochází po uvolnění z prekurzorového proteinu. Bioaktivní peptidy podporují v lidském organismu mnoho funkcí. Projevují se svými antimikrobiálními, imunomodulačními, antihypertenzními, opioidními a antioxidačními vlastnostmi (Mohanty et al. 2016).

Bioaktivní peptidy (Tabulka 6) odvozené od kaseinu a syrovátkové bílkoviny vznikají odlišným způsobem. Kaseinové bioaktivní peptidy se mohou uvolňovat při technologickém procesu výroby potravinových produktů nebo enzymatickou hydrolýzou. Syrovátkové bioaktivní peptidy vznikají za podmíněného použití specifických enzymů nebo během chemické syntézy (Hernández-Ledesma et al. 2011).

Tyto bioaktivní mléčné frakce jsou považovány za potenciální přísady pro výrobu zdraví prospěšných funkčních potravin. Důkazy o bioaktivních účincích pocházejí převážně ze studií *in vitro*. Velmi často je však obtížné účinky reprodukovat *in vivo* (Vargas-Bello-Pérez et al. 2019).

Tabulka 6: Vybrané bioaktivní peptidy v mléce (upraveno dle Park & Nam 2015)

Mléčný prekurzor	Bioaktivní peptid	Pozorovaná bioaktivita
$\alpha$ -, $\beta$ -kasein	kasomorfin	opioidní agonista
	kasokinin	ACE inhibitor
	fosfopeptid	minerální vazba
	imunopeptid	imunomodulační
$\kappa$ -kasein	kasoplatelin	antitrombotikum
	kasoxin	opioidní agonista
$\alpha$ -laktalbumin, $\beta$ -laktoglobulin	laktorfin	opioidní agonista
$\alpha_{s1}$ -kasein	isracidin	antimikrobiální
$\alpha_{s2}$ -kasein	kasocidin	antimikrobiální

### Antioxidační peptidy

Některé mléčné peptidy mají schopnost regulovat oxidativní stres, což je nezbytná funkce pro přežití buněk a zároveň udržení rovnovážného stavu volných radikálů v organismu. V případě, že je rovnováha volných radikálů narušena, dojde k nekontrolovatelné oxidaci buněčných proteinů, membránových lipidů, molekul DNA, což má za následek iniciaci

některých závažných onemocnění. Antioxidační vlastnosti mléčných peptidů mohou pracovat na principu zachycování nebo zabraňování tvorbě volných radikálů. Tyto antioxidační peptidy obsažené v mléce jsou tvořeny 5 - 11 hydrofobními aminokyselinami (Mohanty et al. 2016). Přítomnost hydrofobních aminokyselin ve struktuře má významný podíl na zvýšené antioxidační aktivitě (Li et al. 2013).

Účinnost antioxidačních peptidů závisí na biologické dostupnosti. Absorpce a transport probíhá různými mechanismy, a to na základě velikosti a struktury molekul. V organismu musí peptid s antioxidačním účinkem překonat mnoho bariér. Zároveň musí být odolný proti enzymatickým gastrointestinálním peptidázám, dále pak peptidázám kartáčového lemu a sérovým peptidázám. Antioxidační peptid nesmí vstoupit do jaterního metabolismu. Za těchto předpokladů se peptid s antioxidačním účinkem dostane do cílového orgánu nebo místa působení, kde vyvolá pozitivní efekt (De Gobba et al. 2014).

Peptidy s antioxidační aktivitou jsou spojovány spíše s mlékem kravským než s mlékem kozím. Kravské mléko obsahuje mnoho již známých a ověřených peptidových fragmentů s antioxidačním účinkem jako např.  $\alpha$ 1-kasein (144 - 149),  $\beta$ -kasein (98 - 105),  $\beta$ -kasein (154 - 160),  $\beta$ -laktoglobulin (19 - 29),  $\beta$ -laktoglobulin (58 - 61) a  $\kappa$ -kasein (96 - 106) (Kim et al. 2019). V současné době probíhá mnoho studií a analýz, které se zabývají přesnou identifikací těchto peptidů v kozím mléce (De Gobba et al. 2014).

Li et al. (2013) prováděli studii, která byla zaměřena na přesnou identifikaci antioxidačních kaseinů z kozího mléka. Kaseinová frakce byla hydrolyzována za pomoci kombinace neutrálních a alkalických proteáz. Cílem této studie bylo získat kaseinové hydrolyzáty z kozího mléka, které při následném proměření vykazovaly výrazně vyšší antioxidační aktivitu. Příčina zvýšené antioxidační aktivity byla přisuzována pěti nově identifikovaným oligopeptidům, jejichž struktura se skládala z těchto sekvencí aminokyselin: VYPF (Val-Tyr-Pro-Phe), FGGMAH (Phe-Gly-Gly-Met-Ala-His), FPYCAP (Phe-Pro-Tyr-Cys-Ala-Pro), YVPEPF (Tyr-Val-Pro-Glu-Pro-Phe) a YPPYETY (Tyr-Pro-Pro-Tyr-Glu-Thr-Tyr). Tyto získané kaseinové hydrolyzáty s prokazatelným antioxidačním účinkem mohou mít v budoucnosti uplatnění jako funkční potravinářské přísady. Nandhini et al. (2012) ve své studii potvrdili antioxidační aktivitu kozího mléka, které bylo fermentováno rodem *Lactobacillus plantarum*, avšak antioxidační peptidy nebyly identifikovány. Silva et al. (2006) hodnotili antioxidační aktivitu peptidů ve vodném extraktu ze systému podobající se kozímu sýru. Pro analýzu byly použity enzymy proteáz získané z rostlinného materiálu *Cynara cardunculus*. Identifikovány byly tyto tři peptidy s antioxidačními vlastnostmi: YQEP a YQEPPVLDP z bílkovinné frakce  $\beta$ -kaseinu a YQKFPOY z bílkovinné frakce  $\alpha$ <sub>s2</sub>-kaseinu.

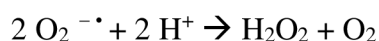
Izolované kaseiny s antioxidačním účinkem je možné aplikovat v potravinářském průmyslu při komerční výrobě povlaků, které zabráňují hnědnutí ovoce a zeleniny vyvolané procesem oxidace. Výzkum zabývající se aplikací kaseinátu vápenatého a práškové formy syrovátkové bílkoviny pro oddálení enzymatického hnědnutí u jednotlivých druhů ovoce a zeleniny potvrdil účinek těchto antioxidačních látek. Tato studie byla prováděna na krájených odrůdách brambor a jablka. Při vyhodnocení byl efektivnější antioxidační účinek zaznamenán v práškové formě syrovátkových bílkovin, avšak rozdíly byly přisuzovány odlišnému profilu aminokyselin (Tien et al. 2001; Khan et al. 2019). V současné době existuje značný potenciál ve výrobě přírodních materiálů. Bílkovinné frakce je možné aplikovat jako aditiva do obalových materiálů nebo se mohou podílet na texturních a chuťových vlastnostech, dále mohou usnadňovat vstřebatelnost některých živin nebo sloužit jako přísady, které zvyšují stabilitu potravinářských produktů. Bílkoviny izolované z mléka hrají významnou roli v budoucnosti balení potravin, protože jsou schopny plnit mnoho funkcí a zároveň mohou být vhodným nosičem nutraceutik (Daniloski et al. 2021).

### 3.8.5 Enzymy

V kozím mléce bylo identifikováno mnoho původních (nativních) enzymů. Některé z nich slouží jako indikátory kvalitní pasterace mléka, jiné jako ukazatele mastitidy a některé jsou důležité z hlediska stability a antioxidačního účinku (Fox & Kelly 2006). Mezi enzymatické antioxidanty Khan et al. (2019) řadí superoxid dismutázu, glutathion peroxidázu a katalázu.

#### Superoxid dismutáza

Enzym superoxid dismutáza (SOD) je zodpovědný v anaerobních systémech za ochranu tkáně před nebezpečnými volnými radikály kyslíku. SOD vycytává superoxidové radikály podle níže uvedené reakce (Fox & Kelly 2006). Enzym kataláza, peroxidáza nebo jiné vhodné redukční činidlo přeměňuje vzniklý  $H_2O_2$  na  $H_2O$  a  $O_2$  (Khan et al. 2019).



SOD existuje ve čtyřech možných izoformách, a to Cu/Zn-SOD, extracelulární SOD, Mn-SOD a Fe-SOD. Nejčastěji se u savců vyskytuje ve formě Cu/Zn-SOD, která byla izolována z mnoho tkání (Khan et al. 2019). Enzym SOD je v mléce stálý v případě, že dojde k tepelnému opracování. Stabilita SOD nastává při zahřevu na 71 °C po dobu 30 minut. Při překročení

teploty nad 71 °C se stabilita vytrácí a enzym je zbaven svých schopností, proto mírné změny teplot při pasterizaci znamenají riziko následného žluknutí mléka.

Hlavní funkce SOD je založena na inhibici oxidaci lipidů v živých systémech, která udržuje stabilitu mléka. Do mléčných výrobků byla zvažována možnost aplikace exogenního SOD pro zvýšenou stabilitu produktů, avšak z ekonomického hlediska je v porovnání s jinými chemickými antioxidanty příliš nákladný (Fox & Kelly 2006).

### Glutathion peroxidáza

Enzym glutathion peroxidáza označována také jako GSH peroxidáza (GSHPOx) má ve své struktuře zabudovaný selen, kterým aktivuje ochranu proti peroxidaci lipidů (Khan et al. 2019). GSH peroxidáza katalyzuje reakci, jak je níže uvedeno (Fox & Kelly 2006).



Do reakce vstupuje tripeptid glutathion (GSH,  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycin) a organický hydroperoxid (ROOH), zahrnující  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Redukující schopnost v reakci zastupuje thiolová skupina, která je obsažena ve struktuře cysteinu. Vzniká molekula vody a dvě molekuly GSH peroxidázy. Mezi molekulami GSHPOx se může vytvořit disulfidický můstek, který mění strukturu na tzv. dimer glutathionu GS-SG (Fox & Kelly 2006). Tuto strukturu lze redukovat zpět na původní dvě molekuly GSH peroxidázy za účasti NADPH získaného z pentotózafosfátové dráhy (Young 2001).

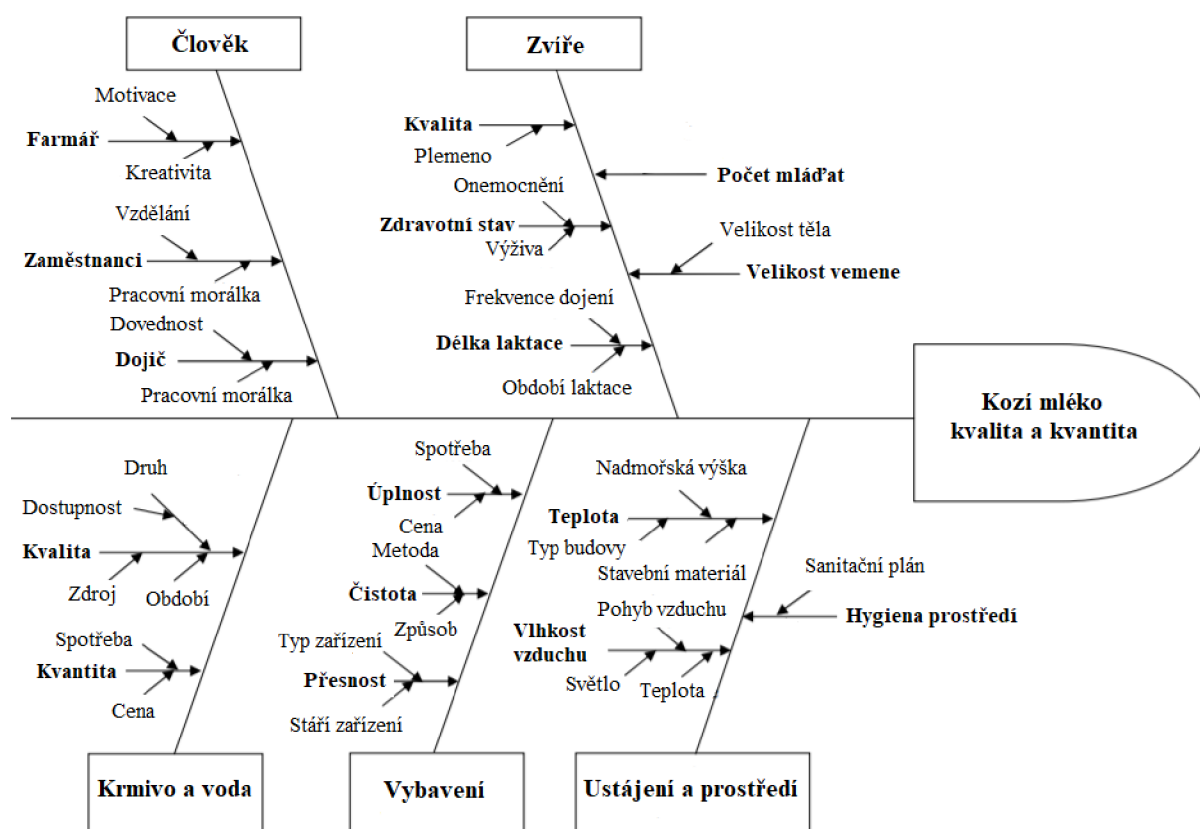
Koncentrace GSHPOx jsou v mléce velmi nízké a více než 90 % tvoří extracelulární enzymy. Hladina GSHPOx se v mléce savců výrazně liší, a to v závislosti na druhu a složení potravy. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány v mléce mateřském, dále pak v kozím a nejnižší koncentrace byly naměřeny v mléce skotu (Khan et al. 2019).

### Kataláza

Enzym kataláza patří k prvním enzymům, které byly identifikovány v mléce. Základ tohoto enzymu tvoří hemový protein. Kataláza je stabilní v širokém rozhraní pH 5 - 10, avšak při přesažení této hranice se aktivita enzymu rychle vytrácí (Khan et al. 2019). Úkolem katalázy v mléce je dismutace  $\text{H}_2\text{O}_2$ , při které dochází k přeměně peroxidu vodíku na vodu a molekulární kyslík (Domínguez et al. 2010). V syrovém mléce je aktivita katalázy přímo úměrná celkovému počtu somatických buněk. Tento enzym tedy slouží jako snadný indikátor pro detekci mastitidy (Šustová et al. 2015).

### 3.9 Faktory ovlivňující výnos, kvalitu a složení koziho mléka

Složení a celková výtežnost koziho mléka se může odrazit od mnoha faktorů. Důležitou roli hrají jak vnější, tak vnitřní vlivy. Kvalita mléka se pak odvíjí od krmiva, věku, plemenné příslušnosti, fáze laktace, teploty prostředí, klimatu apod. Podrobné schéma všech ovlivňujících faktorů je uvedeno na Obrázku 4.



Obrázek 4: Schéma faktorů ovlivňující kvalitu koziho mléka (upraveno dle Cyrilla et al. 2015)

#### Krmivo

Druh krmiva má obdobné účinky na zastoupení jednotlivých složek mléka u koz, jako u dojnic, i když mohou existovat prokazatelné rozdíly. V případě, že se navýší energetický příjem ve stravě koz s vysokou užitkovostí během laktace, dojde ke zvýšení produkce mléka, a zároveň se navýší i obsah dusíku. Přírůstek dusíku v kozím mléce má však negativní dopad na celkový obsah mléčného tuku. Mezi těmito složkami existuje vzájemná korelace. Pokud se obsah dusíku navýší o 0,1 - 0,2 % jednotek, obsah mléčného tuku se může snížit až o 0,2 - 0,4 % (Park & Haenlein 2010). Park (2010) uvádí, že typ krmiva ovlivňuje celkové zastoupení bílkovin v kozím mléce, zatímco obsah tuku je neměnný. Dostatečný pitný režim zamezuje

značným výkyvům v doživosti. Při pozorování vysoce užitkových plemen koz byl zaznamenán nedostatek tekutin během 48 hodin. Tento deficit vody se projevil na snížené produkci mléka, avšak koncentrace laktózy a bílkovin byly naměřeny ve vyšších hladinách. Strava by měla podle doporučené denní dávky tvořit alespoň 17 % hrubé vlákniny. Dostatečné množství hrubé vlákniny zabraňuje snižování obsahu mléčného tuku v kozím mléce (Park & Haenlein 2010).

V současné době probíhá mnoho studií, které zkoumají, jak krmiva obohatit přírodními prospěšnými látkami. Např. podle autora Mitsiopoulou et al. (2021) sezamová semínka v kozí stravě v množství 10 % zlepšují profil mléčných mastných kyselin, podílí se na oxidační stabilitě mléka a svými antioxidačními vlastnostmi přispívají k lepšímu zdravotnímu stavu zvířete. Pozitivní vliv má také přítomnost linolové kyseliny v semínkách. Ianni et al. (2021) se zabýval doplňkem stravy z olivových listů, které jsou vedlejším produktem při výrobě olivového oleje. Doplněk stravy byl podáván plemeni kozy sánské. Výsledky prokázaly pozitivní vliv suplementace tímto doplňkem ve stravě. Strava obohacená olivovými listy vedla k celkovému navýšení některých fenolických sloučenin a antioxidační aktivity. Tyto získané poznatky budou však dále podrobeny hodnocení *in vitro*.

## **Věk**

Věkový faktor patří k významným důvodům kolísání doživosti. Maximální vrchol mléčné užitkovosti dosahují kozy ve stáří 4 let, kdy dovrší své tělesné zralosti. Mléko produkované mladými kozami má ve svém složení zakomponovaný vyšší obsah tuku oproti kozám starším (Park & Haenlein 2010).

## **Plemenná příslušnost**

Plemenná příslušnost koz má vliv zejména na užitkovost a složení mléka. Mezi jednotlivými plemeny existují významné rozdíly. Některá kozí mléka jsou pak svým složením připodobňována mléku kravskému. Například koza sánská, která produkuje velké množství mléka s nízkým obsahem mléčného tuku je přirovnávána mléku holštýnského skotu. Mléko produkující plemeno anglonubijské kozy je svým složením ekvivalentní jerseykému skotu. Anglonubijská plemena koz se vyznačují nižší doživostí, avšak struktura mléka obsahuje větší množství tukových částic. Obecně se u plemen koz vyskytuje vyšší variabilita v přítomnosti mléčného tuku než v obsahu bílkovin (Park & Haenlein 2010). Klíčové složky mléka, tj. tuk a bílkoviny hrají významnou roli v mlékárenském průmyslu. Informace o kvalitě jsou přínosné nejen pro výrobce, ale i pro chovatele v rámci programu křížení (Mohsin et al. 2019).

## **Fáze laktace**

Období laktace se spouští hormonálními změnami po porodu. Jedná se o období, při kterém dochází k sekreci mléka z mléčné žlázy. Doba laktace u koz přetrvává po dobu 280 dnů. V mnoha případech je delší a přesahuje až 300 dnů. Délka doby laktace u koz je pro porovnání delší než u dojných ovcí (Park & Haenlein 2010). V průběhu laktace se objevují vysoké variability ve složení a jakosti kozího mléka. Laktační období se z těchto důvodů rozdělují na tři části. Ihned po porodu mláďate nastává období kolostrální, dále pak navazuje období produkce zralého mléka a v poslední fázi jde o období produkce starodojného mléka (Navrátilová 2012). V první fázi rané laktace kolostrum obsahuje vysoké množství tuku, bílkovin a minerálních látek. Tyto koncentrace po 5. dnu laktace výrazně klesají. Autor této literatury uvádí, že mezi dojivostí a procentuálním zastoupením tuku, bílkovin a minerálních látek existuje negativní vztah. Jinak je tomu u laktózy. Maximální produkce laktózy byla naměřena v prostřední fázi laktace, tedy v době, kdy dochází k nejvyšší denní dojivosti (Park & Haenlein 2010).

Zastoupení jednotlivých makroživin je individuální např. Idamokoro et al. (2017) zkoumal vliv fáze laktace na složení kozího mléka. Mléčný tuk u vybraného plemene (Nguni) dosahoval na začátku laktace nejvyšších hodnot (5,6 %). Uprostřed laktační periody hodnota mléčného tuku mírně poklesla (4,2 %) a v závěrečné fázi laktace se rapidně snížila (2,2 %). Nejvyšší procentuální zastoupení bílkovin a laktózy bylo zaznamenáno v rané fázi laktace.

## **Teplota prostředí**

Nejen kozy, ale i všichni savci jsou považováni za organismy extrémně citlivé na teplotu a vlhkost vzduchu. Změna klimatického prostředí nebo výkyvy počasí mohou mít negativní dopad na dojivost mléka. Studie prokázaly, že nepříznivé podmínky prostředí ovlivňují pokles produkce mléka u dojnic a celkový metabolismus zvířete. Vysoká teplota a vlhkost vedla ke snížení produkce mléka u dojnic přibližně o 1 - 2 % (Zhu et al. 2020). Nízké teploty částečně snižují sekreci kozího mléka, a to díky nedostatečnému prokrvení vemene. V tomto případě je nutné poskytnout zvířeti dostatečné množství krmiva, které pokryje energii k udržení stálé tělesné teploty. Park & Haenlein (2010) uvádějí, že množství laktózy obsažené v kozím mléce, s rostoucí teplotou klesá, zatímco obsah chloridů roste. Při teplotě < 25 °C se zvyšuje procentuální zastoupení mléčného tuku.

## Hygiena

Všechny operace od samotného dojení, přes manipulaci s kozím mlékem musí probíhat za přísných hygienických podmínek. V případě, že tato striktní nařízení nejsou dodržována, mikrobiologická kvalita mléka se snižuje a počty bakterií a somatických buněk intenzivně narůstají. Snižovaná dojivost a kvalita mléka může zapříčinit ekonomické ztráty pro zemědělské podniky (Goetsch et al. 2011).

Termín mastitida je označení pro bakteriální onemocnění, které se projevuje v několika různých formách (Olechnowicz & Jaskowski 2014). Zánět mléčné žlázy způsobuje vážné zdravotní problémy, zejména u dojných plemen. Toto onemocnění vemene má vliv nejen na zdravotní stav jedince, ale i na jakost mléka, dojivost a ekonomické náklady vynaložené na antibiotickou terapii zvířete (Omar & Mat-Kamir 2018). Mastitidu lze kategorizovat na klinické, subklinické a chronické onemocnění. Klinická mastitida se projevuje bakteriální infekcí a viditelnými známkami na mléčné žláze. Vemeno je oteklé, zarudlé a bolestivé. Mezi další příznaky klinické mastitidy patří abnormální výtok mléka a hnisu, horečka, anorexie apod. (Olechnowicz & Jaskowski 2014).

Nejčastěji se objevuje forma subklinické mastitidy. Tato forma onemocnění je vyvolána patogeny, které osidlují oblast mléčné žlázy a zároveň jsou přítomny i v mléce. Subklinická mastitida se téměř v každém případě týká celého stáda, nikoli pouze jedince. Charakteristickým znakem pro detekci subklinické mastitidy je poškozený parenchym mléčné žlázy. Patogenní bakterie prostupují do mléčné žlázy z prostředí farmy, rukou ošřovatelů nebo od samotných koz. Množení pak probíhá v buňkách vemene nebo ve strukových kanálcích (Omar & Mat-Kamir 2018). Rod *Staphylococcus* spp. patří k nejvíce diagnostikovatelným mikroorganismům intramamárních infekcí koz a ovcí (Olechnowicz & Jaskowski 2014). Vyskytují se i jiné bakterie jako např. *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Mycoplasma* spp., *E. coli*, *Bacillus* spp. *Listeria* spp. (Omar & Mat-Kamir 2018). Při mastitidě se vemeno neprojevuje žádnými klinickými abnormalitami. Nadojené kozí mléko v tomto stádiu onemocnění obsahuje zvýšený počet somatických buněk. Pro kozí mléko není legislativně stanoven přesný hraniční limit. Jak již bylo zmíněno v kapitole Hygienické a legislativní požadavky, v některých zemích již byly vytvořeny limity pro PSB, a to v rozmezí od 500 000 do 1 000 000 na ml kozího mléka (Souza et al. 2012).

Mastitidu lze předcházet pravidelným sledováním a kontrolováním hygieny mléka, zdravotního stavu vemene a prostředí, ve kterém se dojně kozy pohybují. V případě, že se zvíře



potýká již se subklinickou mastitidou, může ošetřující personál zlepšit a zajistit preventivní podmínky, které zamezí riziku přechodu na klinickou mastitidu (Omar & Mat-Kamir 2018).

### **3.10 Vybrané metody pro stanovení antioxidační aktivity**

Při měření antioxidační aktivity je možné aplikovat několik možných metod. Velký výběr metod vyplývá ze skutečnosti, že látky s prokazatelným antioxidačním účinkem se mohou projevovat různými mechanismy. Nejčastěji se objevují přímé reakce s radikály, kdy dochází k tzv. zhášení, vychytávání volných radikálů. Mezi další významné reakce patří reakce s přechodnými kovy. Metody pro stanovení antioxidační aktivity lze rozdělit na dvě skupiny, a to metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a metody posuzující redoxní vlastnosti látek. V praxi bývají nejčastěji aplikovány metody ABTS (TEAC), DPPH, ORAC a FRAP (Paulová et al. 2004).

#### **Metody na principu eliminace volných radikálů**

- metoda využívající ABTS (metoda TEAC)
- metoda využívající DPPH
- metoda využívající galvinoxyl
- aplikace jiných stabilních radikálů
- metoda ORAC
- metoda založení na vychytávání volných OH<sup>•</sup> radikálů

#### **Metody posuzující redoxní vlastnosti látek**

- metoda FRAP
- cyklická voltametrie
- metoda HPLC s elektrochemickou detekcí

#### **Metoda ABTS (metoda TEAC)**

Tato základní spektrofotometrická metoda je jedna z nejpoužívanějších spektrofotometrických metod, která stanovuje celkovou antioxidační aktivitu (TAA Total Antioxidant Activity). Lze stanovovat samotné antioxidační účinky látek různého původu nebo i směsné vzorky. Metoda je založena na schopnosti vzorku či látek inaktivovat kation - radikál ABTS. Tento radikál je systematicky označován jako 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina). Někdy je možné se setkat s označením metody jako metoda TEAC (Trolox

Equivalent Antioxidant Capacity). Naměřená antiradikálová aktivita vzorku je ekvivalentní antiradikálové aktivitě syntetickému antioxidantu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-karboxylová kyselina). TAA Troloxu je vždy známá, jedná se o syntetickou podobu vitamínu E. Výsledky měření při použití metody TEAC jsou přepočítány na antioxidační kapacitu Troloxu. Princip metody je založen na zhášení radikálu ABTS<sup>•+</sup> antioxidanty, které se svým chováním podobají donoru vodíku. V průběhu měření dochází ke změnám absorpčního spektra ABTS<sup>•+</sup>. Měření probíhá ve viditelném světle v oblasti 600 - 750 nm a roztok je charakteristický zeleným zbarvením (Paulová et al. 2004, Šulc et al. 2007).

### **Metoda DPPH**

Tuto metodu je možné aplikovat pro posouzení antiradikálové aktivity buď směsných nebo čistých látek. V případě směsných vzorků je možné radikálovou aktivitu vyjadřovat jako ekvivalent askorbové kyseliny nebo syntetického standardu Troloxu. Princip metody je založen na reakci testovaného vzorku se stabilním organickým dusíkatým radikálem difenylpikrylhydrazylem označovaného zkratkou DPPH. V průběhu reakce dochází k redukci radikálu a vzniká DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Během reakce probíhají vizuální změny, kdy fialové zbarvení vzorku se mění na světle žluté a dochází k částečnému odbarvení. Měření probíhá také na spektrofotometru. Pokles absorbance při vlnové délce 517 nm lze měřit dvěma způsoby. Měření probíhá buď v kinetickém režimu nebo po uplynutí konstantního času. Metoda je po technické stránce jednoduchá a rychlá, avšak má i své nevýhody. DPPH se rozpouští pouze v organických rozpouštědlech, zejména v alkoholech, nikoli ve vodných rozpouštědlech. Pro hydrofilní antioxidanty tato metoda není vhodná (Paulová et al. 2004, Šulc et al. 2007, Karadag et al. 2009).

### **Metoda ORAC**

Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) hodnotí schopnost testované látky zbrzdít nebo úplně zastavit radikálovou reakci a zároveň v testovaném systému generovat kyslíkové radikály. Detekce je založena na pozorování poklesu fluorescence  $\beta$ -fykoerytrinu po kontaktu s radikály. Peroxidové radikály jsou generovány tepelným rozkladem AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidinopropan) dihydrochloridu), kdežto hydroxilové radikály systémem  $\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ . Peroxidové a hydroxilové radikály jsou hodnoceny jako nejreaktivnější, proto se metoda ORAC řadí k důležitým parametrům, které charakterizují antioxidanty (Paulová et al. 2004, Karadag et al. 2009).

## **Metoda FRAP**

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential) je založena na principu redoxní reakce. Podstatou metody je schopnost antioxidantů, konkrétně fenolických látek redukovat železitý komplex žluté barvy ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) na modrý železnatý komplex ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ). Měření probíhá opět spektrofotometricky při vlnové délce 593 nm a při velmi nízké hodnotě pH (3,6), což může být pro provedení velmi limitující (Paulová et al. 2004, Karadag et al. 2009).

## **Princip metody molekulové absorpční UV-VIS spektrofotometrie**

Metoda molekulové absorpční UV-VIS spektrofotometrie patří k přesným, citlivým a automatizovaným analytickým instrumentálním metodám. Metoda slouží ke kvantitativnímu stanovení analyzovaného vzorku, kde musí platit pravidlo Lambert-Beerova zákona. Princip metody je založen na měření a vyhodnocování elektronových spekter látek, které jsou schopny absorbovat elektromagnetické záření v UV oblasti 200 - 400 nm a viditelné oblasti 400 - 760 nm (Klimeš 2015).

V rozsahu UV-VIS oblasti spektra dochází k absorpci záření v elektronových obalech analyzovaných molekul. Volné molekuly mohou absorbovat energii z této oblasti záření za možnosti přechodu z nižší energetické hladiny na vyšší, tj. ze základního do excitovaného stavu. Při přechodu molekuly zpět do orbitalu s nižší energetickou hladinou, dojde k uvolnění přebytečné energie ve formě elektromagnetického záření (Klouda 2016).

## **3.11 Vybraná metoda pro stanovení vitamínu A a E**

### **Princip metody HPLC**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) se řadí k velmi moderním a efektivním analytickým separačním metodám. Tímto způsobem je možné oddělovat širokou škálu analytů. Mechanismus metody HPLC aplikuje různé formy separace, ať je to adsorpce, rozdělování na základě rozdílné rozpustnosti, iontová výměna, molekulový síťový efekt apod. (Klouda 2016). V průběhu separace dochází k dělení látek za zvýšeného tlaku na sorbentech s malými průměry částic (řádově  $\mu\text{m}$ ). Během separace se analyzovaný vzorek rozděluje mezi mobilní fázi (kapalnou) a stacionární fázi (pevný sorbent). Metoda umožňuje kvantitativně i kvalitativně hodnotit separované složky analytu (Moldoveanu & David 2013).

Čas strávený ve vybrané fázi závisí na afinitě analytu k jedné nebo druhé fázi. V případě, že látky projevují nulovou afinitu ke stacionární fázi, nedochází k zadržení v koloně a jsou eluovány v mrtvém retenčním čase  $t_m$ . Látky projevující afinitu ke stacionární fázi pak vycházejí z kolony s retenčním časem  $t > t_m$ . Separované složky na koloně jsou dále unášeny mobilní fází k detektoru, který bezprostředně vyhodnotí každou složku formou píku znázorněného Gaussovou křivkou. Podle vzniklého chromatogramu je možné identifikovat danou sloučeninu za pomoci retenčních časů a kvantifikovat množství sloučeniny, které je vypočteno z výšky a plochy píku (Káš et al. 2005).

## **4 Metodika**

### **4.1 Odběr vzorků**

V rámci diplomové práce byla stanovena antioxidační aktivita a obsahy vitamínu A a E ve vzorcích kozího mléka, které pocházely od jednotlivých zvířat v rámci jednoho stáda. Individuální vzorky byly získány z večerního nádoje od plemene Koza bílá krátkosrstá, a to v průběhu dvou po sobě následujících odběrů 28. 6. 2021 a 30. 6. 2021. Celkem bylo odebráno 58 vzorků kozího mléka. Individuální vzorky pocházely od koz, u kterých porod proběhl v březnu a jednalo se o jejich druhé laktální období. Vzorky byly poskytnuty ekologickou biofarmou, která se nachází na území České republiky. Krmná dávka se skládala ze sena, senáže, granulovaného koncentrovaného krmiva a ad libitní pastvy ve volném výběhu.

Při odběrech byly první odstříky kozího mléka separovány a ihned následovala důkladná dezinfekce hrotu struku za pomoci lihové utěrky. Mléko bylo odebíráno do sterilních vzorkovnic. Následně všechny získané vzorky byly v krátkém časovém intervalu zchlazeny na teplotu 4 - 5 °C. Při této teplotě byly vzorky přepraveny v chladícím boxu do laboratoře k analýze. Pro posouzení antioxidační aktivity a obsahy vitamínu A a E byly vyhodnoceny všechny získané vzorky.

#### **Plemeno koza bílá krátkosrstá**

Koza bílá krátkosrstá patří mezi významná česká plemena. Tento typ se řadí k nejvíce uznávaným plemenům s mléčnou užitkovostí. Kontroly mléčné užitkovosti se u tohoto plemene provádějí pravidelně už od roku 1928. Koza bílá krátkosrstá vznikla křížením typově nejednotných koz z Čech a Slovenska s kozly sánského plemene. Plemeno je vysoce odolné a plodné. Srst koz je krátká, zbarvená do bíla, bez přítomných pigmentů. Živá hmotnost se pohybuje u koz v rozmezí 50 - 70 kg, u kozlů 70 - 90 kg. Kohoutková výška dosahuje u koz 70 - 80 cm, u kozlů 75 - 85 cm. Roční dojivost se pohybuje v rozmezí 800 - 1000 kg mléka. Nadojené mléko obsahuje průměrně 3,7 % tuku a 2,7 % bílkovin (Fantová 2015).

## 4.2 Stanovení obsahu vitamínu A a E ve vzorcích kozího mléka

### 4.2.1 Chemikálie

- hydroxid draselný, p.a. (Lach-ner, ČR)
- chlorid sodný, p.a. (Lach-ner, ČR)
- ethanol,  $\geq 96$  % (Lach-ner, ČR)
- pyrogallol, p.a. (Lach-ner, ČR)
- ethylacetát, p.a.  $\geq 99,5$  % (Penta, ČR)
- hexan,  $\geq 95$  % (Penta, ČR)
- methanol, p.a.  $\geq 99,5$  % (Lach-ner, ČR)
- deionizovaná voda (Milipore, Francie)
- methanol, HPLC grade,  $\geq 99,9$  % (Lachner, ČR)

### 4.2.2 Standardy

- $\alpha$ -tokoferol, čistota  $\geq 95$  % (Sigma-Aldrich, USA)
- $\gamma$ -tokoferol, čistota  $\geq 95$  % (Sigma-Aldrich, USA)
- $\alpha$ -tokotrienol, čistota  $\geq 95$  % (Sigma-Aldrich, USA)
- retinol, čistota  $\geq 95$  % (Sigma-Aldrich, USA)

### 4.2.3 Příprava kalibračních roztoků

Ze zakoupených standardů byly připraveny zásobní roztoky o teoretické koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ , jejichž přesná koncentrace byla zjištěna spektrofotometricky za pomoci extinkčních koeficientů (1 % roztoků) uvedených v Tabulce 7.

Tabulka 7: Extinkční koeficienty vybraných standardů

Standard	Rozpouštědlo maximální vlnová délka (nm)	Extinkční koeficient	Reference
$\alpha$ -tokoferol	ethanol (292)	75,8	(Podda et al. 1996)
$\gamma$ -tokoferol	ethanol (298)	91,4	(Podda et al. 1996)
$\alpha$ -tokotrienol	ethanol (292)	91	(Podda et al. 1996)
retinol	ethanol (325)	1570	(Tee & Khor 1995)

Ze zásobních roztoků standardů byly postupným ředěním připraveny přesné počty roztoků o daných koncentracích (Tabulka 8).

Tabulka 8: Příprava kalibračních roztoků standardů

Zásobní roztok standardu	Počet pracovních roztoků	Koncentrace [μg/ml]	Lineární rovnice kalibrace	Koeficient R <sup>2</sup>
α-tokoferol	6	0,05 - 10	y = 0,2523x	0,9999
γ-tokoferol	6	0,02 - 5	y = 0,7814x	0,9999
α-tokotrienol	6	0,05 - 10	y = 0,2523x	0,9999
retinol	8	0,01 - 5	y = 1,6203x	0,9997

### Metoda vnitřního standardu

Pro kvantifikované stanovení přítomné složky ve vzorku byla použita metoda vnitřního standardu (Internal Standard - IS). Známé množství vnitřního standardu (δ-tokoferolu) bylo přidáno k analyzovanému a referenčnímu vzorku. Metoda je proveditelná pouze za podmínek, pokud látka vnitřního standardu není součástí vzorku a zároveň musí mít podobný retenční čas jako analyzovaná složka. Správně zvolený vnitřní standard by měl mít podobné vlastnosti a strukturu analytu. Pro zajištění přesné kvantitativní analýzy je důležité vnitřní standard aplikovat na začátku analytického postupu. Hlavním důvodem je eliminace případně zanesených chyb během analýzy. Výsledná koncentrace odpovídá poměru plochy píku analytu a plochy píku vnitřního standardu (Klouda 2016).

#### 4.2.4 Příprava vzorků k analýze

Pro stanovení obsahu vitamínu A a E v kozím mléce byla zvolena mírně modifikovaná metoda autorů Burešová et al. (2021). Přibližně 0,250 g vzorku lyofilizátu bylo smícháno s 0,5 ml 1M KOH, 0,5 ml 0,15M vodného NaCl, 0,5 ml 96 % ethanolu, 1,25 ml 0,48M ethanolického pyrogallolu a 100 μl vnitřního standardu (IS) δ-tokoferolu v 50 ml centrifugační zkumavce Eppendorf se šroubovacím uzávěrem. Směs byla vortexována 20 sekund a následně inkubována v třepací vodní lázni při 30 °C po dobu 10 minut. Do vzorku bylo přidáno 3,75 ml 0,15M NaCl a výsledná směs byla dvakrát extrahována 5 ml směsí hexan/ethylacetát (9:1, obj./obj.). Extrakce byla podpořena 15 minutovým třepáním. K oddělení nemísitelných fází došlo pomocí centrifugace (5000 rpm, 8 °C, 5 min). Vzniklá anorganická fáze byla pomocí pipety přenesena do 20 ml skleněné zkumavky a odpařena pod proudem dusíku do sucha. Odparek byl rekonstituován v 1 ml methanolu a následně převeden přes injekční mikrofiltr (Nylon 13 mm, 0,2 μm) do HPLC vialky.

#### 4.2.5 Stanovení obsahu vitamínu A a E

Pro stanovení obsahu vitamínu A a E ve vzorku kozího mléka byla zvolena metoda HPLC-DAD/FLD. Vitamin A byl stanoven detektorem FLD (fluorescenční detektor) a vitamin E detektorem DAD (detektor s diodovým polem).

##### Chromatografické podmínky

- analytická kolona Develosil® RP-AQUEOUS C30 (250 × 4,6 mm, 5 µm)
- mobilní fáze deionizovaná voda:methanol (3:97, obj./obj.)
- izokratická eluce
- provozní podmínky:
  - průtok 1,0 ml/min
  - teplota kolony 30 °C
  - teplota autosampleru 10 °C
  - vstřikovaný objem 10 µl
  - doba analýzy 35 min
- podmínky detekce (FLD):
  - excitační vlnová délka  $\lambda = 292$  nm
  - emisní vlnová délka  $\lambda = 330$  nm

Meze detekce pro jednotlivé tokoly byly vyjádřeny jako signál/šum = 3 v µg/ml:

- $\alpha$ -tokoferol ( $\alpha$ -T) = 0,05 µg/ml
- $\gamma$ -tokoferol ( $\gamma$ -T) = 0,02 µg/ml
- $\alpha$ -tokotrienol ( $\alpha$ -T3) = 0,05 µg/ml
- retinol = 0,01 µg/ml

Jednotlivé vitamíny byly následně identifikovány v porovnání s retenčními časy analytických standardů. Kvantifikace byla provedena pomocí lineárních kalibrací stanovených analytů (viz. Tabulka 8).



## 4.3 Stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích kozího mléka

### 4.3.1 Chemikálie

- DPPH - 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl (Sigma-Aldrich, USA)
- ethanol,  $\geq 96\%$  (Lach-ner, ČR)
- chloroform,  $\geq 99\%$  (Penta, ČR)

### 4.3.2 Standardy

- Trolox, čistota  $\geq 98\%$  (Fluka, Švýcarsko)

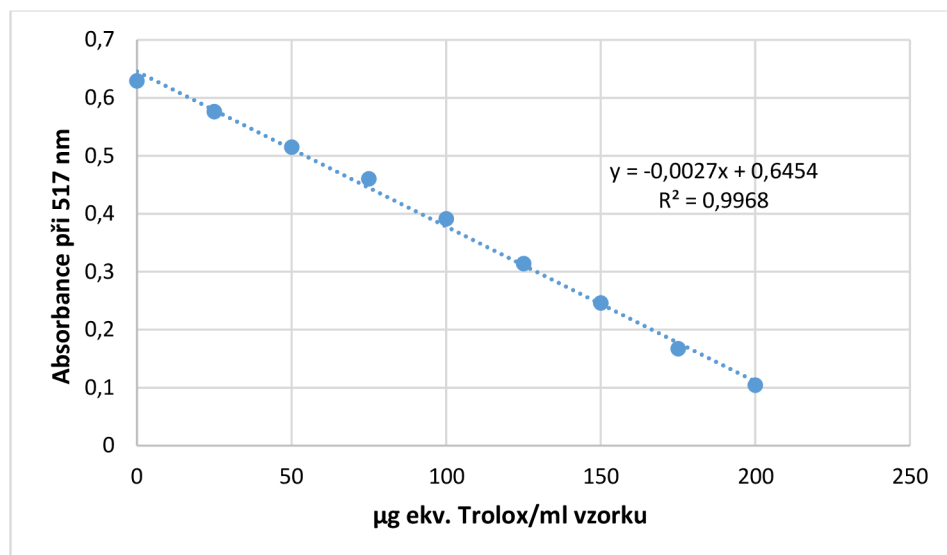
### 4.3.3 Příprava standardu Troloxu

Pro sestavení kalibrační závislosti byl použit hydrofilní analog vitamínu E, jehož antioxidační aktivita je přesně definována. Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo 5 mg standardu Troloxu a doplněno ethanolom po rysku. Výsledná koncentrace zásobního roztoku odpovídala 100  $\mu\text{g/ml}$ . Z tohoto zásobního roztoku bylo postupným ředěním připraveno 9 pracovních roztoků o přesných koncentracích (25 - 250  $\mu\text{g/ml}$ ), jak je uvedeno v Grafu 1. Získané hodnoty byly následně vyjádřeny jako závislost absorbance na koncentraci standardu Troloxu. Pro porovnání výsledků s různými studiemi byla antioxidační aktivita vyhodnocena i v %, což udává přesné množství inhibovaného radikálu DPPH. Procentuální inhibici volného radikálu lze vyjádřit z níže uvedené rovnice:

$$\% \text{ inhibice} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$$

$A_{\text{blank}}$  ... absorbance slepého vzorku (ethanol)

$A_{\text{sample}}$  ... absorbance analyzovaného vzorku



Graf 1: Devítibodová kalibrace provedena na látku TROLOX v rozsahu 25 - 200 ug/ml

#### 4.3.4 Příprava vzorků k analýze

Ke stanovení antioxidační aktivity vzorků koziho mléka byla použita modifikovaná metoda autorů Mal et al. (2018). Pro analýzu byl zvolen stabilní syntetický volný radikál DPPH. Do 15 ml plastové centrifugační zkumavky s víčkem (typ Falcon) bylo napipetováno 100 µl vzorku mléka, 2 ml ethanolického roztoku DPPH o koncentraci 100 µM a 1 ml chloroformu. Vzniklá směs byla promíchána a inkubována při laboratorní teplotě 30 minut. Po uplynutí požadovaného času byly vzorky vortexovány a následně centrifugovány za definovaných podmínek (7000 rpm, 8 °C, 5 min). Pro odstranění mírných nečistot byly vzorky přefiltrovány přes PVDF membránové filtry. Čirý supernatant byl převeden do kyvet. Absorbance byla měřena při vlnové délce 517 nm proti ethanolu, který sloužil jako slepý vzorek.

#### 4.4 Statistická analýza

Naměřená data vybraných parametrů byla statisticky vyhodnocena programem STATISTICA verze 12.0 a Microsoft Office Excel verze 2016. Získaná data byla vždy stanovena ze tří paralelních opakování. Pro podrobné vyhodnocení antioxidační aktivity a obsahu vitamínu A a E ve vzorcích koziho mléka byla použita metoda popisných statistik. Pro zjištění vztahu mezi antioxidační aktivitou a vybraných vitaminů byla vybrána regresní a korelační analýza. Pro statistické šetření byla zvolena hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 4.5 Přístroje a laboratorní vybavení

- HPLC systém Ultimate 3000 (Dionex, USA)
  - vysokotlaká pumpa Ultimate 3000
  - automatický dávkovač Ultimate 3000
  - termostat kolon Ultimate 3000
  - DAD detektor Ultimate 3000
  - FLD detektor Ultimate 3000
  - zásobníky mobilní fáze
  - komunikační modul, počítač s chromatografickým programem
- spektrofotometr Helios  $\gamma$  (Spectronic Unicam, Anglie)
- centrifuga Eppendorf miniSpin plus (Unimed, ČR)
- lyofilizátor LYOVAC GT2 (GmbH, Německo)
- kuchyňská lednice s mrazicím boxem (Gorenje, Slovinsko)
- zásobník deionizované vody (Millipore Simplicity UV, Francie)
- elektronické stopky TimerClock (GmbH, Německo)
- ultrazvuková lázeň Ultrasonic Compact Cleaner (Notus-Powersonic, Slovensko)
- vortex Basic 3 IKA Werke (Staufen, Německo)
- třepací vodní lázeň VWR International (Leuven, Belgie)
- třepačka vratná GFL 3006 (Burgwedel, Německo)
- míchačka magnetická IKA RET control-visc C (ILABO, ČR)
- vakuová pumpa
- pH-metr SHOTT (Camlab, Anglie)
- váhy s přesností na 3 a 4 desetinná místa Kern&Sohn (GmbH, Německo)
- membránové filtry Nylon póry 0,2  $\mu\text{m}$ , PVDF póry 0,45  $\mu\text{m}$  (SISw, ČR)
- centrifugační zkumavky s kónickým dnem typu Eppendorf (iBioTech, ČR)
- plastové jednorázové kyvety semimikro UV transparent
- pipety (Acura)
- plastové špičky, stojany, vialky, běžné laboratorní sklo

## 5 Výsledky

V roce 2021 byla provedena analýza koziho mléka získaného od jednotlivých zvířat v rámci jednoho stáda se zaměřením na stanovení antioxidační aktivity a obsahu vitamínu A a E. Zároveň byla provedena korelace mezi antioxidační aktivitou a naměřenými obsahy vitamínů A a E. Přibližně 60 odebraných individuálních vzorků koziho mléka bylo dále určeno pro externí mikrobiologickou laboratoř, která provedla analýzu patogenních mikroorganismů a celkovou mikrobiologickou kvalitu mléka.

### Stanovení antioxidační aktivity

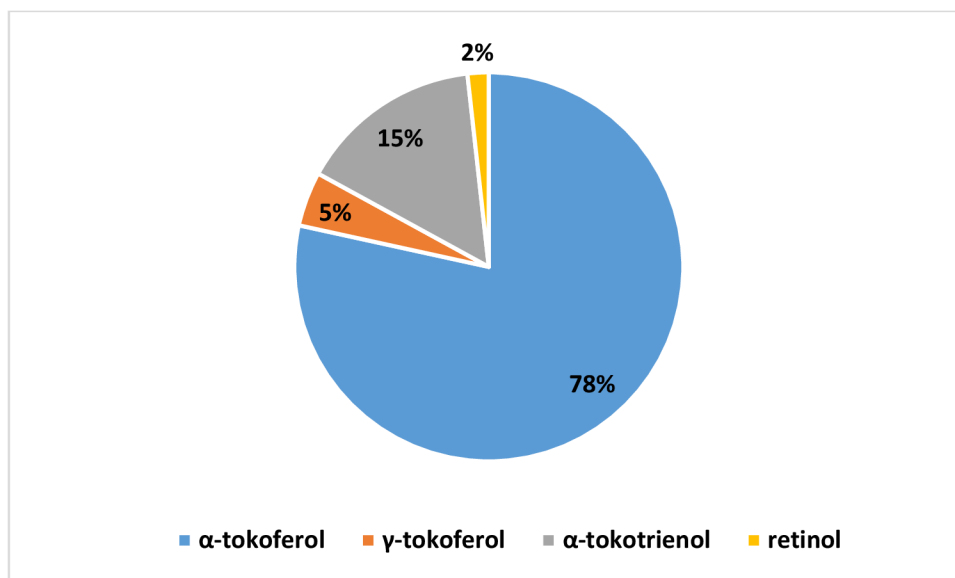
U 60 vzorků koziho mléka byla stanovena celková antioxidační aktivita za pomoci vybrané metody DPPH. Výsledné hodnoty byly přepočítány na syntetický standard Trolox, jehož antioxidační aktivita je přesně definována. Zároveň výsledky AA byly vyjádřeny jako procentuální inhibice volného radikálu. Z Grafu 2 je zřejmé, že maximální hodnota AA byla naměřena u vzorku č. 14 ( $109,78 \pm 1,89 \mu\text{g/ml}$ ;  $44,52 \pm 0,01 \%$ ), naopak minimální hodnota AA byla zaznamenána u vzorku č. 43 ( $26,63 \pm 0,56 \mu\text{g/ml}$ ;  $9,33 \pm 0,01 \%$ ). Průměrná hladina AA se pohybovala okolo hodnoty  $48,32 \pm 13,34 \mu\text{g/ml}$ ;  $18,13 \pm 0,04 \%$ , což vypovídá o vysoké variabilitě analyzovaných vzorků.



Graf 2: Stanovení průměrných obsahů antioxidační aktivity ve vzorcích

## Stanovení obsahu vitamínu A a E

Obsah vitamínu A (retinolu) a E ( $\alpha$ -tokoferolu,  $\gamma$ -tokoferolu a  $\alpha$ -tokotrienolu) byl analyzován ve všech 60 vzorcích kozího mléka. Provedení statistického vyhodnocení výsledků bylo možné pouze u vybraných vzorků, kde se obsah vitamínů nepohybovaly pod hranicí meze detekce. Pro každý vitamin byla určena individuální mez detekce. Průměrný podíl vybraných vitamínů na celkovém obsahu vzorku je uvedeno v Grafu 3. V kozím mléce byl majoritně identifikován  $\alpha$ -tokoferol, který tvořil celkově 78 % vzorku. Zbýlý procentuální podíl tvořil  $\alpha$ -tokotrienol (15 %),  $\gamma$ -tokoferol (5 %) a retinol (2 %).



Graf 3: Průměrný podíl vybraných vitamínů na celkovém obsahu vzorku kozího mléka

Pro kvantitativní stanovení  $\alpha$ -tokoferolu ( $\alpha$ -T) byla určena hranice detekčního minima 0,05  $\mu\text{g/ml}$ . V tomto případě bylo možné všechny vzorky podrobit statistickému vyhodnocení. Ze statistických výsledků maximální hodnota  $\alpha$ -T byla naměřena u vzorku č. 57 ( $8,01 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu), naopak minimální hodnota byla zaznamenána u vzorku č. 2 ( $1,66 \pm 0,18 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu). Průměrný obsah  $\alpha$ -T tvořil  $3,89 \pm 1,39 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu.

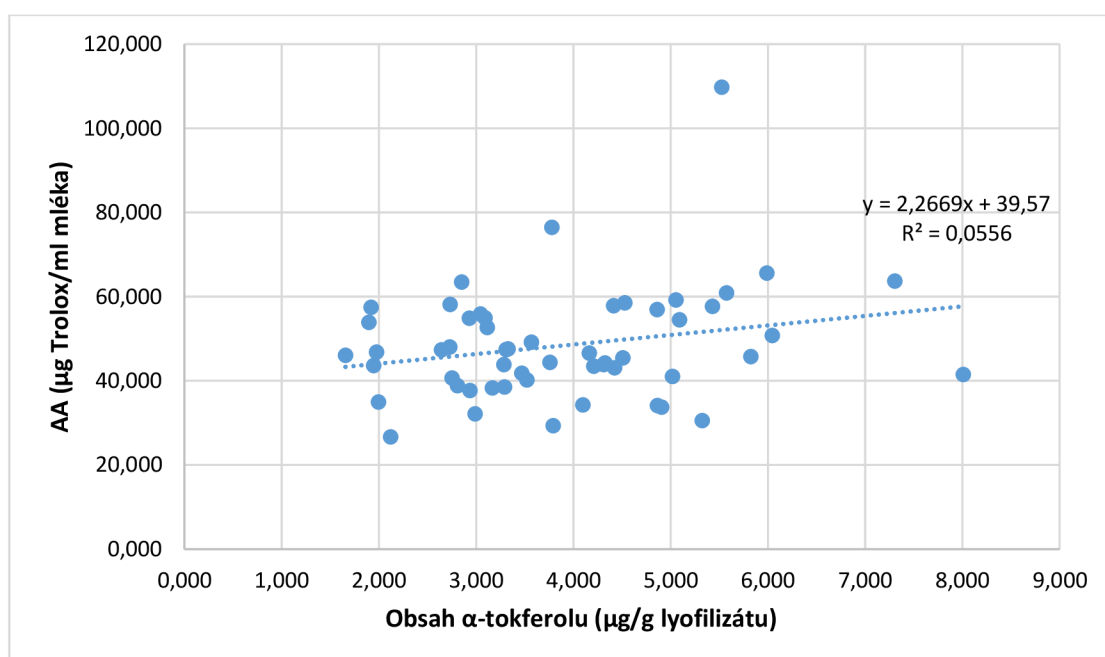
V případě kvantitativního stanovení  $\alpha$ -tokotrienolu ( $\alpha$ -T3) ve vzorku byla určena stejná hranice detekčního minima 0,05  $\mu\text{g/ml}$ . Statistickou analýzu podstoupilo pouze 36 vzorků, 18 vzorků nepřekročilo hranici 0,05  $\mu\text{g/ml}$ . Ze statistických výsledků maximální hodnota  $\alpha$ -T3 byla naměřena u vzorku č. 51 ( $1,38 \pm 0,22 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu), naopak minimální hodnota byla zaznamenána u vzorku č. 15 ( $0,305 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu). Průměrný obsah  $\alpha$ -T3 dosahoval hodnoty  $0,76 \pm 0,26 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu.

Nejnižší naměřená hodnota vitamínu E byla při proměření vzorků zaznamenána u  $\gamma$ -tokoferolu ( $\gamma$ -T). Do statistické analýzy bylo zapojeno pouze 19 z 54 vzorků, přestože hranice detekce byla snížena na hodnotu 0,02  $\mu\text{g/ml}$ . Ze statistických výsledků lze identifikovat maximální hodnotu  $\gamma$ -T, která byla zaznamenána u vzorku č. 57 ( $0,38 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu). Naopak nejnižší hodnota  $\gamma$ -T byla naměřena u vzorku č. 50 ( $0,13 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu). Průměrná obsah  $\gamma$ -T ve vzorku činil  $0,23 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu.

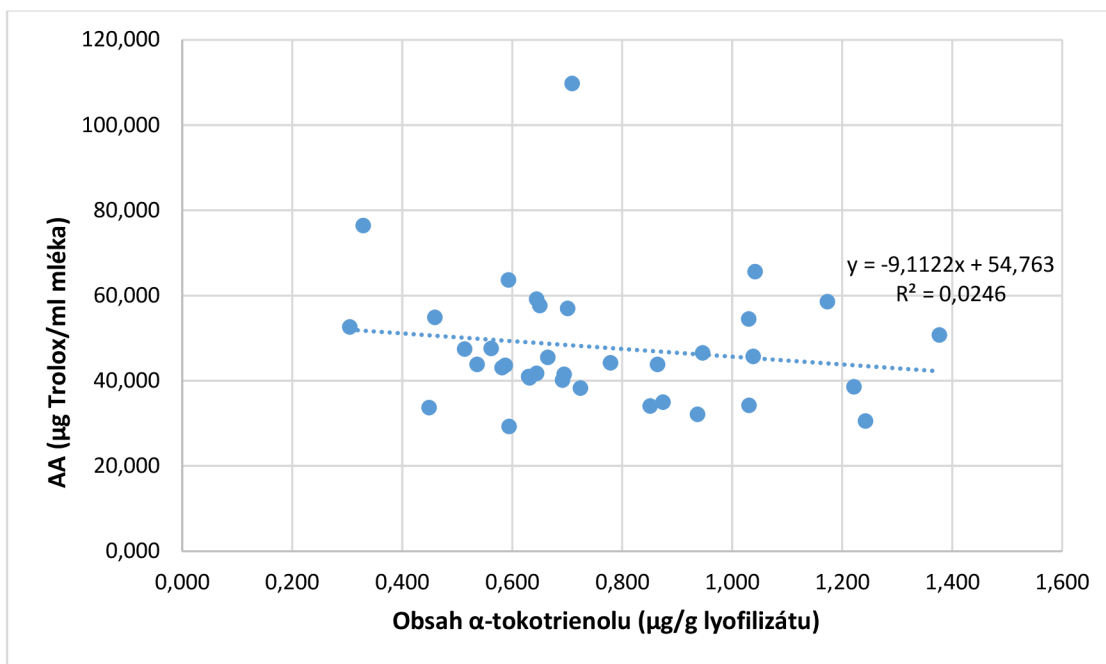
Pro analýzu vitamínu A byla vybrána pouze jedna forma, kterou lze stanovit v kozím mléce, a tou je retinol. Obsažený retinol v analyzovaných vzorcích dosahoval velmi nízkých koncentrací. Z tohoto důvodu byla hranice detekčního minima snížena na hodnotu 0,01  $\mu\text{g/ml}$ . Pro statistickou analýzu bylo vybráno pouze 30 vzorků, zbylých 24 vzorků nepřesáhlo stanovenou hranici. Nejvyšší obsah retinolu byl naměřen u vzorku č. 34 ( $0,20 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu), naopak nejnižší obsah retinolu byl vyhodnocen pro vzorek č. 1 ( $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu). Průměrný obsah retinolu dosahoval hodnoty  $0,09 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$  lyofilizátu.

### Stanovení korelace mezi antioxidační aktivitou a obsahem vitamínů A a E

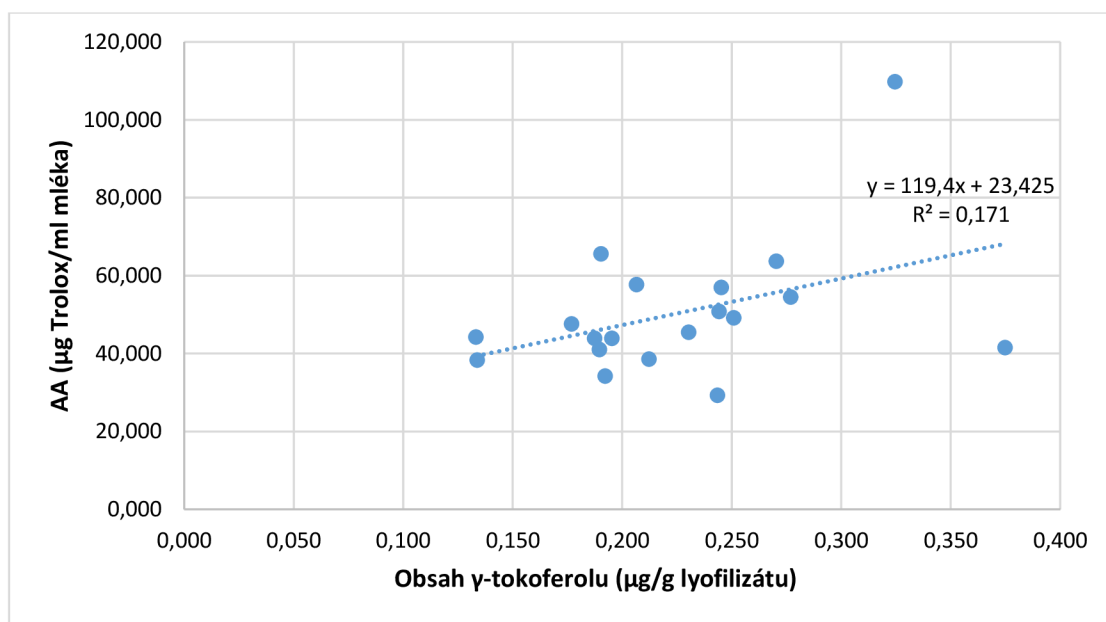
Pro stanovení korelační analýzy byl posuzován vztah mezi naměřenými hodnotami antioxidační aktivity získaných metodou DPPH (Trolox) a obsahu vitamínu A a E. Síla závislosti proměnných byla hodnocena samostatně pro každý vitamin, jak je uvedeno v Grafu 4, 5, 6 a 7. Pro přesné stanovení síly závislosti byl použit koeficient determinace.



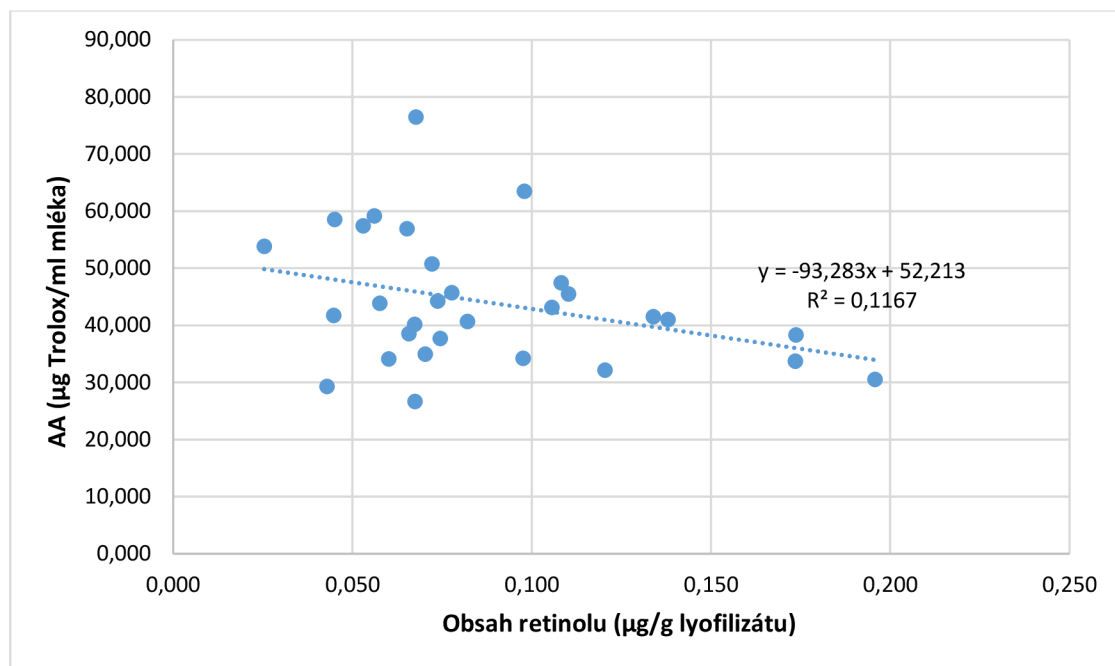
Graf 4: Korelační analýza antioxidační aktivity a obsahu  $\alpha$ -tokoferolu



Graf 5: Korelační analýza antioxidační aktivity a obsahu α-tokotrienolu



Graf 6: Korelační analýza antioxidační aktivity a obsahu γ-tokoferolu



Graf 7: Korelační analýza antioxidační aktivity a obsahu retinolu

Provedením statistické korelační analýzy bylo zjištěno, že existují velmi slabé, téměř bezvýznamné závislosti mezi získanými hodnotami antioxidační aktivity a obsahu  $\alpha$ -T a  $\alpha$ -T3. Střední statistická závislost byla odhalena mezi naměřenými hodnotami antioxidační aktivity a obsahu  $\gamma$ -T a retinolu. Nutné je však zmínit, že hodnoty korelačních koeficientů těchto dvou vitaminů se pohybovaly v těsné blízkosti hranice slabé závislosti.

### Mikrobiologické rozbory koziho mléka

Po předložení výsledků mikrobiologického rozboru jednotlivých vzorků koziho mléka lze tvrdit, že na naměřenou antioxidační aktivitu a obsah vitaminu A a E nemá vliv aktuální zdravotní stav zvířete. Mikrobiologické rozbory byly zaměřeny na hodnocení celkového počtu mikroorganismů (CPM) a vybraný alimentární patogen *Staphylococcus aureus*. Právě tento patogen patří k nejvíce diagnostikovatelným mikroorganismům, který způsobuje infekci mléčné žlázy. Získané hodnoty mikrobiologických testů jsou v souladu s hodnotami uvedených v legislativních požadavcích.



## 6 Diskuze

Narůstající zájem o kozí mléko a jeho mléčné výrobky na světovém trhu souvisí s nutričními benefity a zdravotními přínosy, které tyto produkty poskytují (Verruck et al. 2019). Organizace na podporu zdraví intenzivně vytváří strategie, které se podílejí na efektivním posílení zdraví celosvětové populace. Jedna z klíčových strategií, jak podpořit lidský organismus, je navýšit přísun antioxidantů (Benzie & Choi 2014). Lidské tělo se brání svým vlastním antioxidačním systémem (Cömert & Gökmen 2020). Endogenní antioxidanty nelze v organismu nijak navyšovat, avšak exogenní lze (Benzie & Choi 2014). Při převaze volných radikálů nad antioxidanty v organismu může dojít k poškození struktur biomolekul, případně pozměnění jejich funkcí nebo dokonce k vyvolání buněčné smrti (Shu et al. 2015). Autoři Cömert & Gökmen (2020) uvádějí, že při zvýšeném příjmu exogenních antioxidantů dochází ke zpomalení biologického stárnutí a snižování rizik chronických degenerativních onemocnění. Výběr pestré stravy, a s tím spojený vyšší příjem antioxidantů nabízí potenciální cestu, jak cíleně chránit organismus před oxidačním stresem (Benzie & Choi 2014).

Tato diplomová práce je zaměřena na stanovení antioxidační aktivity v mléce malých přežvýkavců cílené na kozí mléko. Na antioxidační aktivitě mléka a mléčných výrobků se podílí několik bioaktivních sloučenin. Za nativní antioxidanty je možné považovat enzymy superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza, dále pak vitaminy A, E, karotenoidy a přítomnost vázané síry v aminokyselinách, z nichž jsou tvořeny bílkoviny (Khan et al. 2019). Shu et al. (2015) dále uvádí antioxidační peptidy, které byly v posledních letech studovány kvůli jejich rozmanitým funkčním vlastnostem, nicméně studie zabývající se peptidy kozího mléka jsou stále omezené. Další část diplomové práce spočívala v analýze lyofilizovaných vzorků kozího mléka se zaměřením na vybrané obsahy vitamínu A a E.

Důležité je však zmínit, že na zastoupení jednotlivých nativních antioxidačních složek má vliv mnoho důležitých faktorů. Tyto negativní vlivy zároveň ohrožují celkovou antioxidační aktivitu mléka. Variabilita celkového složení a kvality kozího mléka je dána z 30 % genotypem a ze zbylých 70 % okolním prostředím. Mezi hlavní faktory, jak uvádí Belanger & Thomson Bredesen (2014) je možné řadit krmivo, plemennou příslušnost, fázi a pořadí laktace, prostředí a roční období. Goetsch et al. (2011) považuje za další velmi rizikový faktor správné dodržování hygienických postupů při dojení. Kladený důraz na hygienu snižuje prevalenci výskytu onemocnění ve stádě zvířat a zároveň přispívá i k ekonomickému hledisku (Gökdağ et al. 2020). Podle autorů Omar & Mat-Kamir (2018) k nejčastěji vyskytujícím se onemocněním patří

mastitida. Zánět mléčné žlázy způsobuje vážné zdravotní problémy, zejména u dojných plemen. Onemocnění vemene má vliv nejen na zdravotní stav zvířete, ale i na jakost mléka, dojivost a ekonomické náklady je nutné vynaložit na antibiotickou terapii. Za rizikový faktor považují autoři Sunaric et al. (2012) i operace spojené s tepelným zpracováním, skladováním a následnou distribucí konečného výrobku.

Mezi primární antioxidanty přítomné v kozím mléce, které jsou rozpustné v tucích lze řadit  $\alpha$ -tokoferol, retinol a karotenoidy, jak uvádí autor Khan et al. (2019). Hlavní úkol těchto vitaminů spočívá v ochraně polyneenasycených mastných kyselin a biochemických sloučenin před peroxidací. Podle Khan et al. (2019)  $\alpha$ -tokoferol patří k nejdůležitějším antioxidantům rozpustným v tucích kozího mléka, protože tvoří součást membrán kuliček mléčného tuku. Tudíž může působit jako prevence, případně narušovat řetězové reakce a zhaset singletový kyslík v mléce. Antioxidační aktivita  $\alpha$ -tokoferolu je v porovnání s ostatními formami vitamínu E ( $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ -tokoferolu) až o 80 - 90% vyšší, jak publikují ve své studii autoři Li a Beta (2011). Alyaqoubi et al. (2014) dále doplňuje, že na antioxidačních vlastnostech kozího mléka se podílejí i antioxidanty rozpustné ve vodě, které z velké části zastupuje vitamin C.

Pozitivní antioxidační vlastnosti vitamínu A a E v kozím mléce byly několikrát vědecky podloženy, avšak koncentrace těchto vitaminů ve vzorcích jsou velmi nízké. V případě retinolu v mnoha analyzovaných vzorcích byly naměřené hodnoty pod hranicí meze detekce. Snahou této analýzy bylo zjistit přesný obsah vybraných forem vitamínu E ( $\alpha$ -tokoferolu,  $\alpha$ -tokotrienolu,  $\gamma$ -tokoferolu) a vitamínu A (retinolu). V kozím mléce byl majoritně identifikován  $\alpha$ -tokoferol, který tvořil 78 % vzorku. Zbýlý procentuální podíl zastupoval  $\alpha$ -tokotrienol 15 %,  $\gamma$ -tokoferol 5 % a retinol 2 %. Studie autorů Karmowski et al. (2015) je v identické shodě procentuálního podílu  $\alpha$ -tokotrienolu. Zastoupení  $\alpha$ -tokoferolu bylo nižší o 8 %, přesto se jednalo o hlavní antioxidační izomer vitamínu E. V rámci experimentální analýzy vitamínu E ve vzorcích byl stanoven obsah  $\alpha$ -T v rozmezí 1,66 - 8,01  $\mu\text{g/g}$  s průměrným obsahem  $3,89 \pm 1,39 \mu\text{g/g}$ , v případě  $\alpha$ -T3 byl obsah ve vzorku zastoupen v rozmezí 0,31 - 1,38  $\mu\text{g/g}$  s průměrnou hodnotou  $0,76 \pm 0,26 \mu\text{g/g}$  a obsah  $\gamma$ -T byl vyhodnocen v rozmezí 0,13 - 0,38  $\mu\text{g/g}$  s průměrným obsahem  $0,23 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$ . Naměřené hodnoty retinolu dosahovaly rozmezí 0,03 - 0,20  $\mu\text{g/g}$  s průměrnou hodnotou  $0,09 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$ .

Plno vědeckých studií, které se zabývají danou problematikou se soustředí pouze na přítomnost antioxidačních vitaminů, zejména celkový obsah vitamínu A a E. Literární zdroje neuvádí jednotlivé zastoupení izomerů tokoferolů a tokotrienolů v lyofilizovaných vzorcích kozího mléka. Důvodem jsou nejspíše velmi nízké hladiny koncentrací ve vzorku. Podle literatury průměrný vzorek kozího mléka obsahuje v rozmezí 0,3 - 0,4  $\mu\text{g/g}$  vitamínu E, jak

uvádí studie Park & Guo (2006) a Khan et al. (2019). Autoři Amigo a Fontecha (2022) ve své studii naměřili průměrně 1,2 µg/g vitamínu E, což je čtyřnásobek předchozího tvrzení. Hodnoty uvedené v práci Michlové et al. (2016) se shodují s autory Amigo a Fontecha (2022). V případě součtu průměrného obsahu všech tří námi identifikovaných izomerních forem vitamínu E ( $\alpha$ -T,  $\alpha$ -T3 a  $\gamma$ -T), dojdeme k identické shodě s autory Michlová et al. (2016) a Amigo a Fontecha (2022). Hodnoty retinolu, které jsou uvedeny ve studii Michlová et al. (2016) jsou v porovnání výrazně vyšší (0,79 µg/g). Autoři Raynal-Ljutovac et al. (2008) naměřili nám bližší hodnoty retinolu (0,4 µg/g), avšak stále nejsou ve shodě.

Při porovnání vědeckých studií lze tvrdit, že výsledky jsou velmi variabilní, což je zřejmě způsobené rozdílnou metodikou, způsobem uchování vzorků a mnoha dalšími faktory, které jsou uvedeny v první části této kapitoly.

Jak již bylo řečeno, hlavním cílem této diplomové práce bylo stanovit antioxidační aktivitu vzorků čerstvého koziho mléka. K identifikaci přesné antioxidační aktivity byla vybrána metoda DPPH, která je vhodná pro lipofilní antioxidanty. Mnoho vědeckých studií zabývajících se shodnou tematikou uvádí nejen metodu DPPH, ale i ABTS, FRAP nebo ORAC. Účinnost těchto metod je složité porovnávat. Každá metoda je totiž založena na odlišném principu. Pro srovnání jednotlivých studií bylo vybráno vyjádření antioxidační aktivity v %, což vyjadřuje množství inhibovaného radikálu DPPH. Naměřená antioxidační aktivita našich vzorků se pohybovala v rozmezí 9,33 - 44,52 %. Průměrný vzorek dosahoval hodnoty  $18,13 \pm 0,04$  %. Podobné hodnoty uvádí i autoři Mal et al. (2018) ( $17,85 \pm 0,54$  %) a Stobiecka et al. (2022) (19,53 - 23,57 %). Ostatní uvedené studie již byly ovlivněny vybranými faktory, proto nelze jednoznačně zhodnotit a porovnat antioxidační aktivitu s našim experimentem.

Autor Sharma et al. (2019) ve své studii uvádí, že antioxidační aktivita plemene kozy Gadii byla výrazně nižší. Jedná se o původní Indické plemeno, které je hospodářsky významné ve vysokých nadmořských výškách v oblasti západních Himalájí. Za limitující faktor je však považována pastva a nadmořská výška.

Dále autoři Chávez-Servín et al. (2018) pozorovali vliv krmného systému na antioxidační aktivitu koziho mléka. Kozy byly buď ustájeny, nebo se trvale pásly na pastvě. Nižší hodnoty antioxidační aktivity ( $20,86 \pm 3,33$  %) byly pozorovány u ustájených koz. Tato hodnota je velmi blízká našemu průměrnému vzorku. Podobné výsledky je možné připisovat úplně stejnému nebo podobnému krmnému systému, ze kterého pocházelo kozí mléko pro naši analýzu.

Některé studie se zabývaly vlivem teploty na antioxidační potenciál koziho mléka. Kalyan et al. (2021) ve své studii tvrdí, že tepelná úprava má škodlivé účinky na antioxidační vlastnosti koziho mléka, zejména úprava krátkodobá s vysokou teplotou. Nejvyšší antioxidační

aktivita byla naměřena u syrového kozího mléka, následovalo krátce považené kozí mléko a nakonec pasterizované. Toto tvrzení potvrdili i autoři Alyaqoubi et al. (2014).

Interakce mezi antioxidační aktivitou a vybranými lipofilními vitaminy A a E v kozím mléce byly již publikovány v mnoha teoretických literárních zdrojích (Karmowski et al. 2015, Khan et al. 2019, Stobiecka et al. 2022). Nicméně konkrétní vědecké studie cíleně zaměřené na korelaci antioxidační aktivity a vitamin A a E v kozím mléce nebyly doposud publikovány. Kozí mléko obsahuje tyto antioxidační složky, ale jejich koncentrace nejsou pravděpodobně v porovnání s jinými komoditami považovány za dostatečně významné. Tuto informaci o nízkých hladinách vitaminů A a E ve vzorcích prokazuje i náš experiment. Námi provedená statistická korelační analýza potvrdila, že neexistují významné korelační závislosti mezi těmito parametry. Z těchto získaných výsledků je možné usuzovat, že vitamin A a E nepatří mezi hlavní antioxidační složky kozího mléka. Naměřené hodnoty antioxidační aktivity jsou pravděpodobně z velké části vysvětlovány přítomností hydrofilních vitaminů, vybraných enzymů a sirmých aminokyselin.

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši se zaměřením na kozí mléko a jeho složky, zejména ty s prokazatelným antioxidačním účinkem, dále pak antioxidační vlastnosti mléka, metody pro stanovení antioxidačních sloučenin a vybrané faktory ovlivňující přítomnost významných složek v mléce.

Cílem praktické části bylo stanovit celkovou antioxidační aktivitu a obsah vitamínu A a E v analyzovaných vzorcích kozího mléka. Tyto získané hodnoty byly následně podrobeny statistické korelační analýze.

Na závěr je třeba konstatovat, že antioxidační aktivita je dána přítomným obsahem antioxidačních složek v mléce. Za důležité bioaktivní látky jsou považovány bílkoviny s přítomností síry ve struktuře aminokyselin, antioxidační enzymy a peptidy, karotenoidy, lipofilní vitaminy A a E a hydrofilní vitamin C. Zastoupení těchto složek s antioxidačním potenciálem je možné cíleně navyšovat, a to prostřednictvím stravy různými přírodními obohacujícími složkami. Některé faktory mají naopak negativní dopad na cenné složky. Mezi tyto faktory lze zařadit krmivo, plemennou příslušnost, fázi a pořadí laktace, prostředí, roční období, hygienu a operace spojené s tepelným zpracováním, skladováním a následnou distribucí konečného výrobku.

Antioxidační aktivitu je možné stanovit několika různými metodami. V praxi jsou nejčastěji aplikovány metody DPPH, ABTS, ORAC a FRAP. Důležité je však zmínit, že výsledky antioxidační aktivity získané odlišnými metodami je obtížné při vyhodnocování porovnávat. Doposud nebyla vybrána žádná referenční metoda, s kterou by bylo možné výsledky antioxidační aktivity získané různými metodami srovnávat.

**Hypotéza 1** Antioxidační aktivita kozího mléka je rozdílná v závislosti na aktuálním zdravotním stavu zvířete, chovaného v prostředí stejné zootechnické praxe.

Při analýze vzorků kozího mléka byla očekávána rozdílná antioxidační aktivita v závislosti na aktuálním zdravotním stavu zvířete, chovaného v prostředí stejné zootechnické praxe. Tato hypotéza byla potvrzena v rozsahu celého souboru vzorků. V rámci experimentu byly stanoveny velmi variabilní hodnoty s širokým rozpětím. Variabilitu lze vysvětlit individuálním zastoupením jednotlivých antioxidačních složek ve vzorku.

**Hypotéza 2** Obsah vitaminů A a E v kozím mléce je rozdílný v závislosti na aktuálním zdravotním stavu zvířete, chovaného v prostředí stejné zootechnické praxe.

Očekávalo se, že budou zaznamenány rozdílné obsahy vitamínu A a E v kozím mléce v závislosti na aktuálním zdravotním stavu zvířete, chovaného v prostředí stejné zootechnické praxe. Tato hypotéza byla přijata. V individuálních vzorcích kozího mléka se objevily velmi proměnlivé koncentrace vitaminů A a E. Do vyhodnocení výsledků byly zapojeny pouze vybrané vzorky, u kterých se obsah vitaminů nepohyboval pod mezí detekce.

**Hypotéza 3** Existuje významná korelace mezi obsahem vitaminů A a E a antioxidační aktivitou v mléce jednotlivých zvířat.

Vitaminy A a E jsou považovány za silné lipofilní antioxidanty. Lze tedy předpokládat, že se podílí na celkové antioxidační aktivitě. Tato hypotéza byla zamítnuta, protože neexistuje významná korelace mezi obsahem vitaminů A a E a antioxidační aktivitou v mléce jednotlivých zvířat. Kozí mléko obsahuje tyto antioxidační složky, ale jejich koncentrace nejsou v porovnání s jinými komoditami považovány za dostatečně významné. Tuto informaci o nízkých hladinách vitaminů A a E ve vzorcích potvrdil i náš experiment.

Tržní síť nabízí široký sortiment potravin obsahující silné přírodní antioxidanty, ale některé komerčně známé doplňky stravy s antioxidačním účinkem dostupné na trhu zastiňují ty, které jsou senzorycký méně atraktivní pro spotřebitele. Na základě získaných výsledků může být na závěr konstatováno, že kozí mléko patří k potravinám, které jsou bohaté na antioxidační složky. Bylo zjištěno, že na antioxidačním účinku se pravděpodobně v této analýze částečně podílel vitamin A a E. Ve hře je ale mnoho dalších přítomných antioxidačních složek. Do budoucna by bylo dobré provést experiment zaměřený na identifikaci ostatních antioxidačních složek ve vzorcích. Vhodné by bylo porovnat i naměřený obsah těchto antioxidačních látek v čerstvých a lyofilizovaných vzorcích. Vědeckých publikací na danou problematiku není mnoho, proto je každá analýza pro mlékárenské odvětví velmi přínosná. Provedené korelační analýzy v této diplomové práci nebylo snadné porovnávat s jinými experimenty. Studie se často zaměřují na konkrétní faktory, které mohou modifikovat antioxidační účinky. Výsledky diplomové práce jsou přínosné nejen pro konzumenty kozího mléka, ale i pro farmáře, kteří mohou různými faktory zvýšit obsah vitaminů, a tím pádem i antioxidační aktivitu ve prospěch celkové kvality mléka.

## 8 Literatura

- Ahmed AS, El-Bassiony T, Elmalt LM, Ibrahim HR. 2015. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International* **74**:80-88.
- Alyaqoubi S, Abdullah A, Addai ZR. 2014. Antioxidant activity of goat's milk from three different locations in Malaysia. *AIP Conference Proceedings* **1614**:198-201.
- Alyaqoubi S, Abdullah A, Samudi M, Abdullah N, Addai ZR, Al-Ghazeli M. 2014. Effect of different factors on goat milk antioxidant activity. *International Journal of ChemTech Research* **6(5)**:3091-3196.
- Amigo L, Fontecha J. 2022. Goat Milk. 797-808in *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier.
- Ball GFM. 2004. Vitamins: their role in the human body. Blackwell Professional Pub., Ames, Iowa.
- Bayr H. 2005. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine* **33**:498-501.
- Belanger JD, Thomson Bredesen S. 2014. Chov dojných koz. Knižní klub, Praha.
- Benzie IFF, Choi S-W. 2014. Antioxidants in Food. 1-53in . Elsevier.
- Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, Ganie SA. 2015. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **74**:101-110.
- Bishop MacDonald H. 2010. The role of milk in the diet. 3-27in *Improving the Safety and Quality of Milk*. Elsevier.
- Blaner WS. 2020. Vitamin A and provitamin A carotenoids. 73-91in *Present Knowledge in Nutrition*. Elsevier.

- Boland M, Hill J. 2020. World supply of food and the role of dairy protein. 1-19in Milk Proteins. Elsevier.
- Bučević-Popović V, Delaš I, Međugorac S, Pavela-Vrančić M, Kulišić-Bilušić T. 2014. Oxidative stability and antioxidant activity of bovine, caprine, ovine and asinine milk. *International Journal of Dairy Technology* **67**:394-401.
- Burešová B, Paznocht L, Kotíková Z, Giampaglia B, Martinek P, Lachman J. 2021. Changes in carotenoids and tocopherols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation. *Journal of Food Composition and Analysis* **103**.
- Combs GF, McClung JP. 2017. Vitamin A. 109-159in *The Vitamins*. Elsevier.
- Combs GF, McClung JP. 2017. Vitamin E. 207-242in *The Vitamins*. Elsevier.
- Cömert ED, Gökmen V. 2020. Physiological relevance of food antioxidants. 205-250in . Elsevier.
- Cusick SE, Tielsch JM, Ramsan M, Jape JK, Sazawal S, Black RE, Stoltzfus RJ. 2005. Short-term effects of vitamin A and antimalarial treatment on erythropoiesis in severely anemic Zanzibari preschool children. *The American Journal of Clinical Nutrition* **82**:406-412.
- Cyrilla L, Purwanto BP, Atabany A, Astuti DA, Sukmawati A. 2015. Improving Milk Quality for Dairy Goat Farm Development. *Media Peternakan* **38**:204-211.
- Daniloski D, Petkoska AT, Lee NA, Bekhit AE-D, Carne A, Vaskoska R, Vasiljevic T. 2021. Active edible packaging based on milk proteins: A route to carry and deliver nutraceuticals. *Trends in Food Science & Technology* **111**:688-705.
- De Camargo AC, Franchin M, Shahidi F. 2019. Tocopherols and Tocotrienols: Sources, Analytical Methods, and Effects in Food and Biological Systems. 561-570in *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier.



- De Gobba C, Espejo-Carpio FJ, Skibsted LH, Otte J. 2014. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. *International Dairy Journal* **39**:28-40.
- De Vrese M, Pfeuffer M, Roos N, Scholz-Ahrens K, Schrezenmeir J. 2010. The health aspects of milk. 28-73in *Improving the Safety and Quality of Milk*. Elsevier.
- Debier C, Pottier J, Goffe C, Larondelle Y. 2005. Present knowledge and unexpected behaviours of vitamins A and E in colostrum and milk. *Livestock Production Science* **98**:135-147.
- Domínguez L, Sosa-Peinado A, Hansberg W. 2010. Catalase evolved to concentrate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at its active site. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **500**:82-91.
- Ehizuelen Ebhohimen I, Stephen Okanlawon T, Ododo Osagie A, Norma Izevbigie O. 2021. *Vitamin E in Human Health and Oxidative Stres related Diseases*. IntechOpen.
- El-Fattah AA, Azzam M, Elkashef H, Elhadydy A. 2019. Antioxidant Properties of Milk: Effect of Milk Species, Milk Fractions and Heat Treatments. *International Journal of Dairy Science* **15**:1-9.
- Fairulnizal Md Noh M, Devi Nair Gunasegavan R, Mustar S. 2019. *Vitamin A in Health and Disease*. IntechOpen.
- Fang Y-Z, Yang S, Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**:872-879.
- Fantová M. 2015. *Chov koz*. 4. vydání. Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz, z.s. vydalo nakladatelství Brázda, Praha.
- Fox PF, Kelly AL. 2006. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2. *International Dairy Journal* **16**:517-532.

- Fox PF, Kelly AL. 2012. Chemistry and Biochemistry of Milk Constituents. Pages 442-464 in Simpson BK, editor. Food Biochemistry and Food Processing. Wiley-Blackwell, Oxford UK.
- Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O'Mahony JA. 2015. Vitamins in Milk and Dairy Products. 271-297 in Dairy Chemistry and Biochemistry. Springer International Publishing, Cham.
- Gajdůšek S. 2003. Laktologie. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno.
- Ghosh N, Das A, Khanna S. 2020. Vitamin E: Tocopherols and tocotrienol and their role in health and disease. 283-293 in Essential and Toxic Trace Elements and Vitamins in Human Health. Elsevier.
- Goetsch AL, Zeng SS, Gipson TA. 2011. Factors affecting goat milk production and quality. Small Ruminant Research **101**:55-63.
- Gökdağ A, Sakarya E, Contiero B, Gottardo F. 2020. Milking characteristics, hygiene and management practices in Saanen goat farms: a case of Canakkale province, Turkey. Italian Journal of Animal Science **19**:213-221.
- Graulet B. 2010. Improving the level of vitamins in milk. 229-251 in Improving the Safety and Quality of Milk. Elsevier.
- Gutierrez-Mazariegos J, Theodosiou M, Campo-Paysaa F, Schubert M. 2011. Vitamin A: A multifunctional tool for development. Seminars in Cell & Developmental Biology **22**:603-610.
- Hernández-Ledesma B, Ramos M, Gómez-Ruiz JÁ. 2011. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. Small Ruminant Research **101**:196-204.
- Higdon J. 2000. Vitamin A. Dostupné z: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-A>, citováno 17. 10. 2021.

- Chávez-Servín JL, Andrade-Montemayor HM, Velázquez Vázquez C, Aguilera Barreyro A, García-Gasca T, Ferríz Martínez RA, Olvera Ramírez AM, de la Torre-Carbot K. 2018. Effects of feeding system, heat treatment and season on phenolic compounds and antioxidant capacity in goat milk, whey and cheese. *Small Ruminant Research* **160**:54-58.
- Ianni A, Innosa D, Oliva E, Bennato F, Grotta L, Saletti MA, Pomilio F, Sergi M, Martino G. 2021. Effect of olive leaves feeding on phenolic composition and lipolytic volatile profile in goat milk. *Journal of Dairy Science* **104**:8835-8845.
- Idamokoro E, Muchenje V, Masika P. 2017. Yield and Milk Composition at Different Stages of Lactation from a Small Herd of Nguni, Boer, and Non-Descript Goats Raised in an Extensive Production System. *Sustainability* **9**.
- Jiang Q. 2014. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine* **72**:76-90.
- Kalyan S, Meena S, Kapila S, Yadav R, Deshwal GK. 2021. In vitro assessment of antioxidative potential of goat milk, casein and its hydrolysates: Comparison of goat milk with bovine and buffalo milk. *Indian Journal of Dairy Science* **74**(5):1-19.
- Kalyankar SD, Khedkar CD, Patil AM. 2016. Goat: Milk. 256-260 in *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier.
- Karadag A, Ozcelik B, Saner S. 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods* **2**:41-60.
- Karmowski J, Hintze V, Kschonsek J, Killenberg M, Böhm V. 2015. Antioxidant activities of tocopherols/tocotrienols and lipophilic antioxidant capacity of wheat, vegetable oils, milk and milk cream by using photochemiluminescence. *Food Chemistry* **175**:593-600.
- Káš J, Kodíček M, Valentová O. 2005. *Laboratorní techniky biochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha.

- Khan IT, Bule M, Ullah R, Nadeem M, Asif S, Niaz K. 2019. The antioxidant components of milk and their role in processing, ripening, and storage: Functional food. *Veterinary World* **12**:12-33.
- Khan IT, Nadeem M, Imran M, Ullah R, Ajmal M, Jaspal MH. 2019. Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease* **18**.
- Kim Y-E, Kim JW, Cheon S, Nam MS, Kim KK. 2019. Alpha-Casein and Beta-Lactoglobulin from Cow Milk Exhibit Antioxidant Activity: A Plausible Link to Antiaging Effects. *Journal of Food Science* **84**:3083-3090.
- Klimeš J. 2015. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. 2. vydání. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- Klouda P. 2016. Moderní analytické metody. Třetí, upravené vydání. Nakladatelství Pavko, Ostrava.
- Kumar A, Kamboj M, Virender. 2021. A review on photometric methods for the quantitation of vitamin A. *Microchemical Journal* **171**.
- Lad SS, Aparnathi KD, Mehta B, Velpula S. 2017. Goat Milk in Human Nutrition and Health – A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6**:1781-1792.
- Li W, Beta T. 2011. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of anthograin liqueur. *Food Chemistry* **127**:968-975.
- Li Z, Jiang A, Yue T, Wang J, Wang Y, Su J. 2013. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *Journal of Dairy Science* **96**:4242-4251.

- Lima MJR, Teixeira-Lemos E, Oliveira J, Teixeira-Lemos LP, Monteiro AMC, Costa JM. 2018. Nutritional and Health Profile of Goat Products: Focus on Health Benefits of Goat Milk. in Goat Science. InTech.
- Mal G, Singh B, G. Mane B, Sharma V, Sharma R, Bhar R, Dhar JB. 2018. Milk composition, antioxidant activities and protein profile of Gaddi goat milk. Journal of Food Biochemistry **42**.
- Mangialasche F, Westman E, Kivipelto M, Muehlboeck JS, Cecchetti R, Baglioni M, Tarducci R, Gobbi G, Floridi P, Soininen H, Kłoszewska I, Tsolaki M, Vellas B, Spenger C, Lovestone S, Wahlund LO, Simmons A, Mecocci P. 2013. Classification and prediction of clinical diagnosis of Alzheimer's disease based on MRI and plasma measures of  $\alpha$ -/ $\gamma$ -tocotrienols and  $\gamma$ -tocopherol. Journal of Internal Medicine **273**:602-621.
- Martínez MC, Andriantsitohaina R. 2009. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. Antioxidants & Redox Signaling **11**:669-702.
- Michlová T, Dragounová H, Horníčková Š, Hejtmánková A. 2016. Factors influencing the content of vitamins A and E in sheep and goat milk. Czech Journal of Food Sciences **33**:58-65.
- Ministerstvo zemědělství. 2016. Vyhláška o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-397#cast1>, citováno 30.1.2022.
- Ministerstvo zemědělství. 2020. Komoditní karta – mléko a mlékárenské výrobky. Dostupné z: [https://eagri.cz/public/web/file/657147/Komoditni\\_karta\\_Mleko\\_srpen\\_2020.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/657147/Komoditni_karta_Mleko_srpen_2020.pdf), citováno 30.1.2022.
- Ministerstvo zemědělství. 2020. Situační a výhledová zpráva – mléko. Dostupné z: [https://eagri.cz/public/web/file/670746/Mleko\\_2020\\_WEB.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/670746/Mleko_2020_WEB.pdf), citováno 30.1.2022.

- Mitsiopoulou C, Sotirakoglou K, Labrou NE, Tsiplakou E. 2021. The effect of whole sesame seeds on milk chemical composition, fatty acid profile and antioxidant status in goats. *Livestock Science* **245**.
- Mohanty DP, Mohapatra S, Misra S, Sahu PS. 2016. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences* **23**:577-583.
- Mohsin AZ, Sukor R, Selamat J, Hussin ASM, Ismail IH. 2019. Chemical and mineral composition of raw goat milk as affected by breed varieties available in Malaysia. *International Journal of Food Properties* **22**:815-824.
- Moldoveanu SC, David V. 2013. Basic Information about HPLC. 1-51 in *Essentials in Modern HPLC Separations*. Elsevier.
- Nandhini B, Angayarkanni J, Palaniswamy M. 2012. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity and antioxidant properties of goat milk hydrolysates. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**:367-370.
- National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements. 2021. Vitamin A. Dostupné z: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminA-HealthProfessional/>, citováno 17. 10. 2021.
- Navrátilová P. 2012. *Hygiena produkce mléka*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno.
- Nozière P, Graulet B, Lucas A, Martin B, Grolier P, Doreau M. 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology* **131**:418-450.
- Olechnowicz J, Jaskowski JM. 2014. Mastitis in small ruminants. *Medycyna Wetererynaryjna* **70**:2.
- Omar S, Mat-Kamir NF. 2018. Isolation and identification of common bacteria causing subclinical mastitis in dairy goats. *International Food Research Journal* **25**(4):1668-1674.

- Oruch R, Pryme I. 2012. The biological significance of vitamin A in humans: A review of nutritional aspects and clinical considerations. *ScienceJet* **1**(19):1-13.
- Park YW. 2010. Improving goat milk. 304-346in *Improving the Safety and Quality of Milk*. Elsevier.
- Park YW, Guo M. 2006. Goat Milk Products: Types of Products, Manufacturing Technology, Chemical Composition, and Marketing. 59-106in *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA.
- Park YW, Haenlein GFW, Wendorff WL. 2017. Goat Milk - Chemistry and Nutrition. 42-83in *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. John Wiley, Oxford, UK.
- Park YW, Haenlein GFW. 2010. Milk production. 275-292 in *Goat science and production*. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Park YW, Nam MS. 2015. Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **35**:831-840.
- Paulová H, Bochořiková H, Táborská E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. 2004. *Chemické listy* **98**:174-179.
- Pereira PC. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* **30**:619-627.
- Podda M, Weber C, Traber MG, Packer L. 1996. Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinols, and ubiquinones. *Journal of Lipid Research* **37**:893-901.
- Poppitt SD. 2020. Milk proteins and human health. 651-669in *Milk Proteins*. Elsevier.
- Prosser CG. 2021. Compositional and functional characteristics of goat milk and relevance as a base for infant formula. *Journal of Food Science* **86**:257-265.

- Ranadheera CS, Evans CA, Baines SK, Balthazar Celso F, Cruz Adriano G, Esmerino Erick A, Freitas Mônica Q, Pimentel Tatiana C, Wittwer AE, Naumovski N, Graça Juliana S, Sant'Ana Anderson S, Ajlouni S, Vasiljevic T. 2019. Probiotics in Goat Milk Products: Delivery Capacity and Ability to Improve Sensory Attributes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **18**:867-882.
- 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.
- Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. 2014. The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal* **14**(2):157-165.
- 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.
- Sharifi-Rad M et al. 2020. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology* **11**.
- Sharma V, Singh B, Sharma R, Dhar JB, Sharma N, Mal G. 2019. Antioxidative activity and protein profile of skim milk of Gaddi goats and hill cattle of North West Himalayan region. *Veterinary World* **12**:1535-1539.
- Shu G, Mei S, Zhang Q, Xin N, Chen H. 2015. Application of the Plackett-Burman design to determine the main factors affecting the anti-oxidative activity of goat's milk casein hydrolyzed by Alcalase and papain. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* **17**:257-266.
- Silva SV, Pihlanto A, Malcata FX. 2006. Bioactive Peptides in Ovine and Caprine Cheeselike Systems Prepared with Proteases from *Cynara cardunculus*. *Journal of Dairy Science* **89**:3336-3344.



- Souza FN, Blagitz MG, Penna CFAM, Della Libera AMMP, Heinemann MB, Cerqueira MMOP. 2012. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Ruminant Research* **107**:65-75.
- Stobiecka M, Król J, Brodziak A. 2022. Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals* **12**.
- Stuhr T, Aulrich K, Barth K, Knappstein K, Larsen T. 2013. Influence of udder infection status on milk enzyme activities and somatic cell count throughout early lactation in goats. *Small Ruminant Research* **111**:139-146.
- Sunaric S, Zivkovic J, Pavlovic R, Kocic G, Trutic N, Zivanovic S. 2012. Assessment of  $\alpha$ -tocopherol content in cow and goat milk from the Serbian market. *Hemijska industrija* **66**:559-566.
- Šulc M, Lachman J, Hamouz K, Orsák M, Dvořák P, Horáčková V. 2007. Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy* **101**:584-591.
- Šustová K, Poláčková M, Kuchtík J. 2015. Možnosti detekce mastitid měřením enzymatické aktivity. *Mlékařské listy* **149**:1-7.
- Tee ES, Khor S. 1995. Simultaneous determination of retinol, carotenoids and tocopherols in human serum by high pressure liquid chromatography. *Malaysian Journal of Nutrition* **1**:151-170.
- Tien C, Vachon C, Mateescu M-A, Lacroix M. 2001. Milk Protein Coatings Prevent Oxidative Browning of Apples and Potatoes. *Journal of Food Science* **66**:512-516.
- Turkmen N. 2017. The Nutritional Value and Health Benefits of Goat Milk Components. 441-449 in *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease*. Elsevier.

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**:44-84.
- Vargas-Bello-Pérez E, Márquez-Hernández RI, Hernández-Castellano LE. 2019. Bioaktivní peptidy z mléka: zvířecí determinanty a jejich důsledky pro lidské zdraví. *Journal of Dairy Research* **86**:136-144.
- Velišek J, Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin. Rozšíř. a přeprac 3. vyd.* OSSIS, Tábor.
- Verruck S, Dantas A, Prudencio ES. 2019. Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. *Journal of Functional Foods* **52**:243-257.
- Wright WW. 2010. New Insights into the Regulation of Gametogenesis by Retinoic Acid. *Biology of Reproduction* **83**:890-892.
- Young IS. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* **54**:176-186.
- Zhao Y, Wang C, Lu W, Sun C, Zhu X, Fang Y. 2021. Evolution of physicochemical and antioxidant properties of whey protein isolate during fibrillization process. *Food Chemistry* **357**.
- Zhu X, Wen J, Wang J. 2020. Effect of environmental temperature and humidity on milk production and milk composition of Guanzhong dairy goats. *Veterinary and Animal Science* **9**.

## 9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Hlavní činitelé příznivých účinků kozího mléka .....	8
Obrázek 2: Chemická struktura all-trans-retinolu .....	19
Obrázek 3: Chemická struktura skupiny vitaminů E .....	24
Obrázek 4: Schéma faktorů ovlivňující kvalitu kozího mléka .....	30

## 10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Základní složení kozího, kravského, mateřského a ovčího mléka .....	10
Tabulka 2: Reaktivní formy kyslíku .....	15
Tabulka 3: Reaktivní formy dusíku .....	16
Tabulka 4: Doporučené denní dávky retinolu pro specifické skupiny .....	20
Tabulka 5: Doporučené denní dávky $\alpha$ -tokoferolu pro specifické skupiny .....	25
Tabulka 6: Vybrané bioaktivní peptidy v mléce .....	26
Tabulka 7: Extinkční koeficienty vybraných standardů .....	39
Tabulka 8: Příprava kalibračních roztoků standardů .....	40

## 11 Seznam grafů

Graf 1: Devítibodová kalibrace provedena na látku TROLOX v rozsahu 25 - 200 ug/ml .....	43
Graf 2: Stanovení průměrných obsahů antioxidační aktivity ve vzorcích .....	45
Graf 3: Průměrný podíl vybraných vitaminů na celkovém obsahu vzorku kozího mléka .....	46
Graf 4: Korelační analýza antioxidační aktivity a obsahu $\alpha$ -tokoferolu .....	47
Graf 5: Korelační analýza antioxidační aktivity a obsahu $\alpha$ -tokotrienolu .....	48
Graf 6: Korelační analýza antioxidační aktivity a obsahu $\gamma$ -tokoferolu .....	48
Graf 7: Korelační analýza antioxidační aktivity a obsahu retinolu .....	49

## 12 Seznam použitých zkratk a symbolů

AAPH	2,2'-azo-bis (2-amidinopropan) dihydrochlorid
ABTS	2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
CPM	celkový počet mikroorganismů
DPPH	difenylpikrylhydrazyl
DPPH-H	difenylpikrylhydrazin
FAO	organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)
Fe <sup>2+</sup> -TPTZ	železnatý komplex modré barvy
Fe <sup>3+</sup> -TPTZ	železitý komplex žluté barvy
FRAP	antioxidační metoda (Ferric Reducting Antioxidant Potential)
GSH	glutathion peroxidáza (Glutathione Peroxidase)
GSHPO <sub>x</sub>	glutathion peroxidáza (Glutathione Peroxidase)
GS-SG	dimer glutathionu
IS	vnitřní standard (Internal Standard)
IU	mezinárodní jednotka (International Unit)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
ORAC	antioxidační metoda (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
pH	vodíkový exponent
PSB	počet somatických buněk
RNS	reaktivní formy dusíku (Reactive Nitrogen Species)
ROOH	organický hydroperoxid
ROS	reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
SOD	superoxid dismutáza (Superoxide Dismutase)
TAA	celková antioxidační aktivita (Total Antioxidant Activity)
TEAC	antioxidační metoda (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
t <sub>m</sub>	mrtvý retenční čas
UHT	vysokoteplotní úprava (Ultra High Temperature)
UV-VIS	oblast ultrafialového záření a viditelného světla
α-T	α-tokoferol
γ-T	γ-tokoferol
α-T-3	α-tokotrienol
α-TT	α-tokotrienol