

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie

Vliv počtu somatických buněk na kvalitu kozího mléka

.....
doktorská disertační práce

Autor: Ing. Klára Podhorecká

Školitel: prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc.

Konzultant: Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.

Praha 2023

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci „Vliv počtu somatických buněk na kvalitu kozího mléka“ vypracovala samostatně, že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Dále prohlašuji, že v souvislosti se sepsáním doktorské disertační práce, nebyla porušena autorská práva třetích osob.

V Praze dne

.....

Podpis autora

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala všem, kteří přispěli k úspěšnému dokončení této práce. Především děkuji mé školitelce doc. Ing. Aleně Hejtmánkové, CSc. (in memoriam) za informace a cenné připomínky v začátcích mé práce. Děkuji svému nynějšímu školiteli prof. Ing. Jaromíru Lachmanovi, CSc. za cenné rady, profesionální a vždy laskavý přístup a podporu k dokončení studia. Velké díky patří mé nejmilejší mentorce Ing. Markétě Borkové, Ph.D., které vděčím za obrovskou pomoc a mnoho času, který mi věnovala během řady odborných konzultací, zpracování výsledků a dokončení této práce, ale především děkuji za její trpělivý a empatický přístup.

Dále děkuji chemikům z naší skvělé katedry (s dovolením bez akademických titulů). V první řadě děkuji Matyáši Orsákovi, nejen za příjemné a klidné prostředí na pracovišti, praktické a nedocenitelné rady v laboratoři, slova pochopení a motivace, ale i za čas, který mi věnoval při četných diskuzích. Dále děkuji především Zorce Kotíkové, za její nekonečnou vstřícnost, cenné odborné rady a zkušenosti nejen v laboratoři. Děkuji Vladimíru Pivcovi za jeho neutuchající dobrou náladu, podporu a přípravu výborné kávy, která mě udržovala v bdělém stavu. Za obrovskou podporu a slova pochopení děkuji Luboši Paznochtovi, jehož odborné konzultace a praktické rady přispěly k úspěšnému dokončení této práce. Děkuji Petru Šmídovi za každodenní dávku humoru a výpomoc při drobných pracích v laboratoři. A nakonec Barče Burešové za nekonečně mnoho pozitivní energie a neutuchající důvěry, kterou ve mě vkládá nejen na půdě akademické, ale i v osobním životě.

V neposlední řadě děkuji mým nejbližším a rodině za podporu, trpělivost a tvorbu potřebného zázemí při práci na tomto tématu.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Literární přehled.....	7
2.1. Význam kozího mléka ve výživě člověka.....	7
2.2. Chemické složení mléka.....	8
2.2.1. Sacharidy.....	8
2.2.2. Tuky.....	9
2.2.3. Bílkoviny.....	9
2.2.3.1. Význam a rozdělení.....	9
2.2.3.2. Obecná charakteristika, struktura a význam kaseinových bílkovin.....	12
2.2.3.3. Obecná charakteristika a význam syrovátkových bílkovin.....	16
2.2.3.4. Minoritní bílkoviny.....	17
2.2.3.5. Dusíkaté látky nebílkovinného charakteru.....	18
2.2.4. Minerální látky.....	18
2.2.5. Vitaminy.....	19
2.3. Faktory ovlivňující kvalitu mléka.....	20
2.3.1. Somatické buňky.....	20
2.3.1.1. Limity týkající se somatických buněk v mléce.....	21
2.3.1.2. Charakteristika buněčných subpopulací.....	22
2.3.1.3. Somatické buňky pocházející z krve.....	22
2.3.1.4. Somatické buňky pocházející z epitelu mléčné žlázy.....	23
2.3.1.5. Enzymatická aktivita somatických buněk.....	24
2.3.1.6. Faktory ovlivňující PSB.....	25
2.3.2. Mastitida.....	25
2.3.2.1. Mastitida u koz.....	26
2.3.2.2. Legislativní požadavky na jakost syrového kozího mléka.....	27
3. Cíle a hypotézy.....	28

4.	Metodika práce.....	29
4.1.	Koza bílá krátkosrstá.....	29
4.2.	Vzorky mléka a jejich odběr	29
4.3.	Chemické analýzy	30
4.3.1.	Základní laboratorní přístroje.....	30
4.3.2.	Stanovení základního složení mléka	31
4.3.3.	Stanovení celkového počtu somatických buněk.....	31
4.3.4.	Stanovení diferenciálního počtu somatických buněk.....	31
4.3.4.1.	Princip metody	31
4.3.4.2.	Použité chemikálie	32
4.3.4.3.	Příprava vzorků	32
4.3.4.4.	Měření pomocí průtokové cytometrie.....	33
4.3.5.	Stanovení kaseinových bílkovin.....	33
4.3.6.	Stanovení minerálních látek	35
4.4.	Hodnocení mikrobiální kvality mléka.....	35
4.4.1.	Stanovení celkového počtu mikroorganismů.....	35
4.4.2.	Identifikace patogenních mikroorganismů.....	35
4.5.	Základní technologické zkoušky	36
4.6.	Statistické zhodnocení naměřených dat	36
5.	Výsledky a diskuze	37
5.1.	Zhodnocení mikrobiologické kvality kozího mléka.....	38
5.1.1.	Mikrobiologická kvalita v roce 2020	39
5.1.2.	Mikrobiologická kvalita v roce 2021	41
5.1.3.	Mikrobiologická kvalita v roce 2022	42
5.2.	Porovnání obsahu somatických buněk v kozím mléce.....	44
5.3.	Zhodnocení chemického složení kozího mléka.....	50
5.3.1.	Chemické složení a vybrané parametry kozího mléka v roce 2020.....	50

5.3.1.1.	Zastoupení kaseinových bílkovin	55
5.3.1.2.	Rozdíly v zastoupení minerálních látek	57
5.3.2.	Chemické složení a vybrané parametry kozího mléka v roce 2021	59
5.3.2.1.	Zastoupení kaseinových bílkovin	60
5.3.2.2.	Rozdíly v zastoupení minerálních látek	61
5.3.3.	Chemické složení a vybrané parametry kozího mléka v roce 2022	63
5.3.3.1.	Zastoupení kaseinových bílkovin	64
5.3.3.2.	Rozdíly v zastoupení minerálních látek	65
5.4.	Zastoupení diferenciálního počtu somatických buněk	69
6.	Závěr	78
7.	Seznam použité literatury	83
8.	Technické normy	96
9.	Seznam použitých zkratk	97
10.	Přílohy	99

1. Úvod

Se stále rostoucími nároky na kvalitní potraviny je kladen důraz, vyjma nutričního benefitu, i na hygienickou kvalitu mléka či výrobků z něj, tzn. kontroly, zavedení různých testů či norem kvality. V souvislosti s hygienickou kvalitou mléka nelze opomenout mikrobiologické standardy pro syrové kozí mléko, které musí splňovat, je-li určeno pro lidskou spotřebu. Dle legislativních limitů uvedených ve Vyhlášce č. 445/2017 Sb. a Nařízení EP a Rady (ES) č. 853/2004 musí syrové kozí mléko určené pro výrobu potravinářských výrobků splňovat limit celkového počtu mikroorganismů (CPM) 500×10^3 KTJ/ml a v případě bakterie *Staphylococcus aureus* limit 500 KTJ/ml (EU 2004; MZe 2017). Nicméně v porovnání s požadavky týkajícími se kravského mléka lze tyto podmínky považovat za vcelku benevolentní. Proto je vhodné se kromě mikrobiologických požadavků zabývat také dalšími ukazateli kvality kozího mléka.

Za významný indikátor vypovídající o kvalitativních změnách mléka by mohl být považován počet somatických buněk (PSB). Ačkoli jsou somatické buňky (SB) přirozenou složkou mléka mohou za určitých okolností způsobovat nežádoucí změny v chemickém složení, ale i vlastnostech, které by mohly zásadně ovlivňovat jeho technologickou zpracovatelnost. V současné době nepanuje shoda ohledně užitečnosti SB, tedy buňkách pocházejících z epitelu mléčné žlázy či leukocytech původem z krve, jakožto klíčového diagnostického kritéria pro hodnocení zdravotního stavu mléčné žlázy či jeho využití jakožto indikátoru kvality kozího mléka. Vzhledem k odlišnému typu sekrece mléka, tzv. sekreci apokrinní, dochází přirozeně k nárůstu epiteliálních buněk a cytoplazmatických částic, které navyšují jejich celkový počet. Je zřejmé, že nejen počet, ale i zastoupení jednotlivých somatických buněk, může výrazně ovlivňovat vlastnosti syrového kozího mléka, zejména v důsledku přítomnosti endogenních enzymů původem ze SB, především proteáz a lipáz. Ke změnám může docházet během skladování a následného technologického procesu zpracování. Problematika jednotlivých typů buněčných populací by mohla rovněž přinést informace o imunologické odpovědi mléčné žlázy a představovat účinný nástroj, kterým detekovat onemocnění zánětlivé i nezápětlivé povahy. Cílem této práce je prohloubení znalostí a zjištění souvislostí mezi somatickými buňkami a složením kozího mléka, zejména ve vztahu k vlastnostem, které souvisejí s výtěžností a další technologickou zpracovatelností mléka, která by mohla vést k lepší efektivnosti a ziskovosti v mléčném průmyslu.

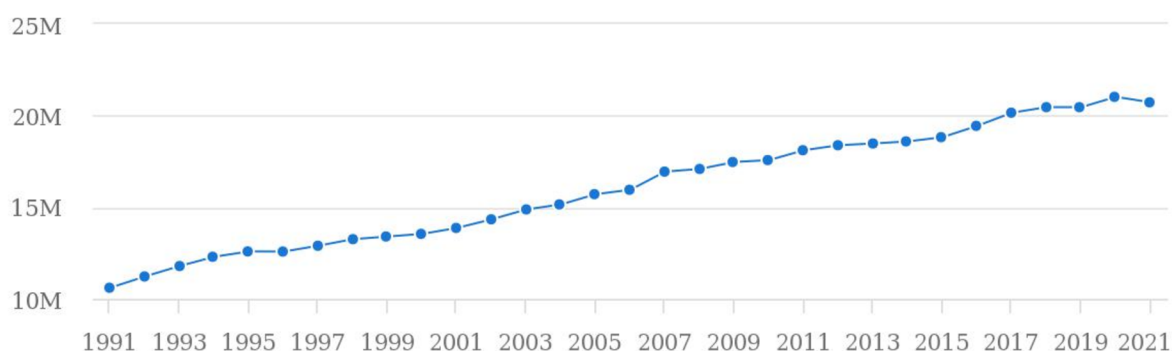
2. Literární přehled

2.1. Význam kozího mléka ve výživě člověka

Mléko a mléčné výrobky mají ve výživě člověka nezastupitelnou roli a jsou součástí jídelníčku téměř po celém světě již od počátků domestikace hospodářských zvířat (Albenzio et al. 2017). V celosvětové produkci kozího mléka, která v průměru představuje více než 20 mil. tun ročně, lze za posledních 30 let pozorovat více jak 30% nárůst produkce kozího mléka a toto číslo neustále narůstá viz Graf 1. Produkce syrového kozího mléka v rámci Evropské unie činila v roce 2020 v průměru 3,2 mil. tun (FAO 2023).

Mléko malých přežvýkavců je v Evropě využíváno především k výrobě sýrů, jogurtů, fermentovaných mlék a dalších mléčných výrobků (Recio et al. 2009; Tamime et al. 2011). Produkty z něj jsou navíc vnímány přínosně pro lidské zdraví i z důvodu ekologického, jelikož chov koz, případně ovcí je spjat se šetrnějším způsobem hospodaření (Albenzio et al. 2016).

Graf 1. Světová produkce syrového kozího mléka v období 1991–2021 v mil. tun (FAO 2023).



Kozí mléko je vhodnou alternativou k mléku kravskému, především díky lepší stravitelnosti a pravděpodobně i nižší alergicitě (Ribeiro & Ribeiro 2010; Hodgkinson et al. 2019). Tento fakt je dán především genetickým polymorfismem, typickým pro kozí mléko, kdy např. nižší hladina α_{S1} -kaseinu, vysvětluje rozdíly v trávení kozího a kravského mléka a následné využitelnosti nutričně cenných látek (Ceballos et al. 2009; Kalyankar et al. 2015).

Konzumace mléka a mléčných výrobků je často považována za důležitou součást zdravé a vyvážené stravy (Pereira 2014). Mléko lze považovat za cenný zdroj makro i mikroživin a rovněž obsahuje celou řadu účinných látek, které hrají významnou roli jak ve výživě, tak v ochraně zdraví (Ceballos et al. 2009). Zejména se jedná o kvalitní zdroj bílkovin, esenciálních aminokyselin, ale i minerálních látek, především vápníku a fosforu (Fox 2009).

2.2. Chemické složení mléka

Mléko je sekret mléčné žlázy, jehož složení a vlastnosti se liší dle druhu. Obecně lze tvrdit, že se jedná o tzv. emulzi „olej ve vodě“ obsahující tuk, bílkoviny, laktózu, minerální látky, enzymy, somatické buňky, hormony, imunoglobuliny a mléku další přirození složky (Selvaggi et al. 2014).

Park (2017) uvádí, že kozí mléko obsahuje průměrně 12,2 % sušiny, 3,8 % tuku, 3,5 % bílkovin, 4,1 % laktózy a 0,8 % popelovin. Rozdíly ve složení různých druhů mlék jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Základní chemické složení mléka různých přežvýkavců (Turkmen 2017).

druh mléka	sušina	tuk	bílkoviny	laktóza	popeloviny
bovinní (%)	12,6	3,7	3,4	4,7	0,7
kozí (%)	13,2	4,5	3,6	4,3	0,8
ovčí (%)	18,8	7,5	5,6	4,6	1,0

2.2.1. Sacharidy

Majoritním sacharidem mléka je laktóza, jejíž průměrný obsah v kozím mléce je oproti mléku kravskému mírně nižší (4,1 % vs 4,7 %) (Silanikove et al. 2010; Clark & Mora García 2017). Laktóza je syntetizována v mléčné žláze z glukózy a galaktózy, kde důležitou roli hraje jedna ze syrovátkových bílkovin – α -laktalbumin, představující klíčovou součást enzymatického systému katalyzující tento proces (Permyakov & Berliner 2000; Lad et al. 2017). Laktóza je zásadní pro udržení osmotické rovnováhy při syntéze mléka a dále z pohledu podpory vstřebávání vápníku, hořčíku, fosforu a vitamínu D během procesu trávení (Kalyankar et al. 2016).

Kozí mléko je bohaté také na oligosacharidy odvozené od laktózy, např. laktulózu, laktitol, laktobionovou kyselinu a galaktooligosacharidy (Ranadheera et al. 2019). Mezi další sacharidy nacházející se v menším množství v kozím mléce jsou obvykle řazeny glykopeptidy, glykoproteiny a nukleotidy (Lad et al. 2017). Mléčné oligosacharidy jsou považovány za prospěšné pro lidskou výživu především díky svým probiotickým a protiinfekčním vlastnostem (Ranadheera et al. 2019).

2.2.2. Tuky

Tuk je v mléce nejčastěji přítomen ve formě kapiček triglyceridů (Kalyankar et al. 2016). Vieitez et al. (2016) udává, že lipidy kozího mléka se skládají z triacylglycerolů tvořících 98 % celkových lipidů, fosfolipidů (1 %), volného cholesterolu a jeho esterů (1 %). Dle autorů Lad et al. (2017), je průměrná velikost tukových kuliček 1,5 až 2 μm , zatímco Ranadheera et al. (2019) uvádí průměrnou velikost 2,5 až 3 μm . Dle Silanikove et al. (2010) je velikost těchto kuliček stejná jako v mléce kravském, tedy 1–10 μm , ale počet tukových kuliček menších než 5 μm , tvoří v kozím mléce až 80 %, zatímco v mléce kravském pouze 60 %. Globule mléčného tuku jsou volně rozptýleny ve formě emulze (Lad et al. 2017). Tyto specifické odlišnosti napomáhají lepší stravitelnosti kozího mléka (Turkmen 2017; Verruck et al. 2019).

Mezi nejhojněji zastoupené mastné kyseliny je v kozím mléce řazena palmitová (C16:0), olejová (C18:1), stearová (C18:0), kaprinová (C10:0), laurová (C12:0) a myristová kyselina (C14:0), které představují přibližně 84 % celkového obsahu mastných kyselin (Kondyli et al. 2012). S tímto tvrzením souhlasí i Kalyankar et al. (2015), který uvádí, že obsah zmíněných mastných kyselin tvoří více než 75 % jejich celkového množství. Kozí mléko je oproti kravskému typické vyšším podílem mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem, tj. kapronové (C6:0), kaprylové (C8:0) a kaprinové (C10:0), které jsou částečně zodpovědné za typický „kozí“ zápach (Silanikove et al. 2010). Tyto kyseliny však mohou být i zdraví prospěšné, např. C8:0 a C10:0 kyseliny mohou vykazovat antivirové či antikarcinogenní účinky (Claeys et al. 2013). Kozí mléko je rovněž zajímavým zdrojem konjugované kyseliny linolové (CLA), kdy různé vědecké studie zdůrazňují její význam a popisují řadu účinků s ní spojených, např. účinky antikarcinogenní, antioxidační, vliv na snížení hladiny cholesterolu, redukci tělesné hmotnosti či podporu funkce imunitního systému (Vieitez et al. 2016). Kondyli et al. (2012) uvádí, že biologicky nejaktivnější formou této kyseliny je *cis*-9, *trans*-11, která tvoří více než 80 % izomerů CLA v mléčném tuku.

2.2.3. Bílkoviny

2.2.3.1. Význam a rozdělení

Hlavními dusíkatými látkami v mléce jsou mléčné bílkoviny, které jsou významné, jak z hlediska nutričního, tak i technologického (Selvaggi et al. 2014). Mléčné produkty jsou plnohodnotným zdrojem vysoce kvalitních bílkovin, které jsou vyvážené vzhledem ke skladbě aminokyselin (Raynal-Ljutovac et al. 2008) a ve výživě jsou nezbytné pro syntézu vlastních proteinů a dalších dusíkatých látek (Almaas et al. 2006).

V porovnání s mlékem kravským jsou v bílkovinách kozího mléka bohatě zastoupeny vybrané esenciální aminokyseliny, zejména threonin, lysin, izoleucin, cystein, tyrosin a valin (Ranadheera et al. 2019). Jedná se o bílkoviny s vysokou biologickou hodnotou, dobrou stravitelností dosahující 97 až 98 %, rychlou vstřebatelností a využitelností v lidském organismu (Rafiq et al. 2016).

Hlavní bílkoviny v kozím mléce jsou stejné jako v mléce kravském a dělí se do dvou základních kategorií – nerozpustné kaseiny a rozpustné syrovátkové bílkoviny (Pereira 2014). Mléka přežvýkavců jsou považována za tzv. mléka kaseinová, kde je průměrně 80 % celkových bílkovin tvořeno kaseiny a 20 % syrovátkovými bílkovinami (Selvaggi et al. 2014).

Mezi hlavní kaseinové bílkoviny je řazen tzv. α_{S1} -kasein, α_{S2} -kasein, β -kasein a κ -kasein (Bramanti et al. 2002; Selvaggi et al. 2014; Vargas-Bello-Pérez et al. 2019). Syrovátkové bílkoviny jsou reprezentovány především β -laktoglobulinem A či B a α -laktalbuminem viz Tabulka 2 (Tarola et al. 2019; Vargas-Bello-Pérez et al. 2019).

Kozí mléko disponuje obvykle vyšším obsahem β -kaseinu, nižším množstvím α_S -kaseinu a srovnatelným množstvím κ -kaseinu oproti mléku kravskému (Clark & Mora García 2017; Ranadheera et al. 2019).

Tabulka 2. Zastoupení bílkovin v kozím mléce (upraveno dle Selvaggi et al. 2014).

Suma mléčných bílkovin (%)	3,72
kaseinové bílkoviny (% CN)	2,4
α_{S1} -kasein (% z celkového obsahu CN)	5,6
α_{S2} -kasein (% z celkového obsahu CN)	19,2
β -kasein (% z celkového obsahu CN)	54,8
κ -kasein (% z celkového obsahu CN)	20,4
Syrovátkové bílkoviny (% WP)	0,74
α -laktalbumin (% z celkového obsahu WP)	24
β -laktoglobulin (% z celkového obsahu WP)	53,7
minoritní WP (% z celkového obsahu WP)	22,3
nebílkovinné dusíkaté látky x 6,38 (% NPN)	0,58

CN – kaseinové bílkoviny, WP – syrovátkové bílkoviny, NPN – dusíkaté látky nebílkovinné povahy

Příznivá nutriční hodnota a vlastnosti mléčných bílkovin jako je rozpustnost, vaznost vody, tepelná stabilita, syření a pění, hrají klíčovou roli v mléčném průmyslu (Vargas-Bello-Pérez et al. 2019). Obsah bílkovin v mléce je jedním z kritických bodů určujících tržní, technologickou, ale i biologickou hodnotu mléka. Častá hypotéza autorů je, že čím vyšší je obsah bílkovin v syrovém mléce, tím vyšší je výtěžnost během technologického zpracování při výrobě sýrů či fermentovaných výrobků (Bara-Herczegh et al. 2009), nicméně obsah bílkovin může být ovlivněn např. nárůstem somatických buněk, s tím spojenou zvýšenou proteolytickou aktivitou a změnami v distribuci bílkovinných frakcí (Park et al. 2007). Polymorfismus mléčných bílkovin

Mléčné bílkoviny se vyznačují tzv. genetickým polymorfismem, který je spojován s celou řadou kvantitativních i kvalitativních parametrů mléka (Albenzio & Santillo 2011). Tento jev může nastat, pokud pro jednu vlastnost organismu existují v jeho genetické výbavě alespoň dvě varianty téhož genu, nazývané také alely (Marletta et al. 2007). U koziho mléka byl nalezen vysoký stupeň polymorfismu u čtyř kaseinových genů s několika alelami s nulovou nebo sníženou expresí příslušného proteinu (Selvaggi et al. 2014).

Uvádí se, že více než 95 % bílkovin obsažených v mléce přežvýkavců je syntetizováno ze šesti strukturálních genů, které kódují jak syrovátkové bílkoviny (β -laktoglobulin, α -laktalbumin), tak kaseiny (α_{S1} -, α_{S2} -, β , a κ -kasein) (Selvaggi et al. 2014). V mléce se každý kasein Základem všech typů kaseinů jsou minimálně dvě strukturální jednotky, které jsou geneticky podmíněné kodominantními alelami. Primární struktura se pak může lišit v důsledku bodových mutací, inserce, delece a diferenciálního sestřihu (Marletta et al. 2007). Heterogenita kaseinů je spojována s různou aktivitou syntetické dráhy kaseinu a různou hladinou fosforylace a glykosylace peptidového řetězce (Park et al. 2007).

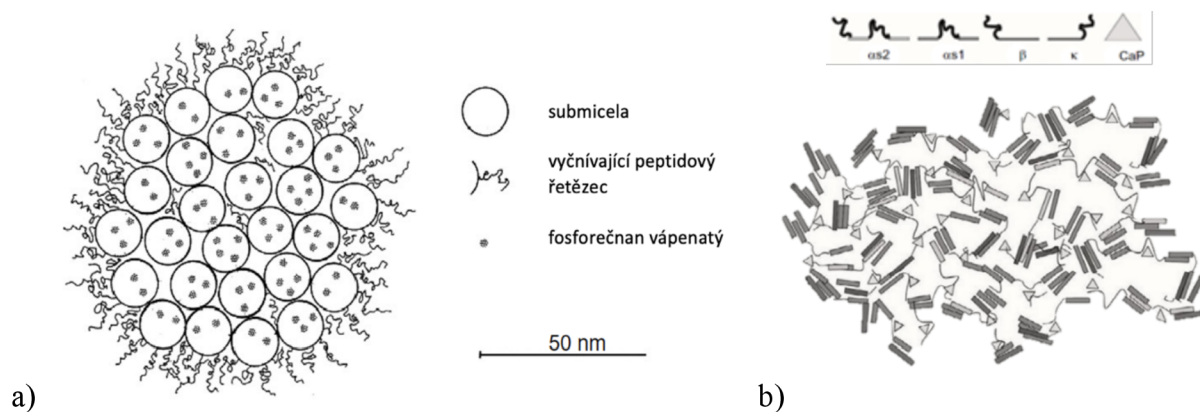
Polymorfismus mléčných bílkovin souvisí nejen s kvantitativními, ale i kvalitativními parametry mléka. Kvantitativní variabilita je obecně způsobena rozdílnou expresí proteinů, zatímco kvalitativní rozdíly jsou dány strukturálním polymorfismem kaseinových genů, např. posttranslačními úpravami (Montalbano et al. 2016). Rozdíly v jednotlivých genetických typech jsou vyvolány např. substitucemi aminokyselin v proteinech, které mohou způsobovat rozdíly ve stravitelnosti, technologických či sensorických vlastnostech kozích produktů. Zastoupení bílkovin ovlivňuje technologické vlastnosti mléka zejména u skotu a koz, zatímco u ovcí jsou výsledky nejednoznačné (Albenzio & Santillo 2011). Jedná se především o schopnost koagulace či sýrařskou výtěžnost (Montalbano et al. 2016). Kalyankar et al. (2016) uvádí, že informace o polymorfismu mléčných bílkovin je možné využít např. k detekci falšování koziho mléka mlékem kravským.

2.2.3.2. *Obecná charakteristika, struktura a význam kaseinových bílkovin*

Hlavní rolí kaseinů ve výživě je vazba a transport minerálních látek, zejména vápníku a fosforu, který je nezbytný pro tvorbu kostí a mimo to přispívají k zásobení organismu aminokyselinami (Selvaggi et al. 2014). Kaseinové bílkoviny navíc umožňují vznik různých bioaktivních peptidů, které mají prokazatelný přínos pro zdraví člověka (Pereira 2014).

Kaseiny představují hlavní bílkovinnou část v mnoha druzích mléka a jsou rozděleny do několika základních frakcí, a to α_{S1} - , α_{S2} -kasein, β -kasein a κ -kasein (Marletta et al. 2007; Selvaggi et al. 2014; Tarola et al. 2019). Kaseinové bílkoviny patří do skupiny fosfoproteinů a jsou syntetizovány v mléčné žláze v reakci na laktogenní hormony a některé další podněty (Selvaggi et al. 2014). Tyto látky jsou bohaté především na aminokyselinu prolin a v mléce tvoří tzv. micely vyskytující se ve formě koloidní suspenze stabilizované vápenatými ionty (Marletta et al. 2007). Vyjma prolinu je mezi neesenciálními aminokyselinami dominantní glutamová kyselina, která je obsažena ve vysokém množství jak v kaseinech, tak i syrovátkových bílkovinách. Kaseinové bílkoviny jsou navíc charakteristické vysokými koncentracemi některých esenciálních aminokyselin – isoleucinu, fenylalaninu a histidinu (Rafiq et al. 2016).

Micelární struktury kaseinů (Obrázek 1a) jsou zodpovědné za většinu jedinečných fyzikálních vlastností mléka (Selvaggi et al. 2014). Kaseinové micely jsou charakterizovány jako supramolekuly – větší molekuly, které jsou složeny z několika menších molekul, tzv. submicel, spojených pomocí nekovalentních intermolekulárních vazeb, například vodíkových můstků či elektrostatických sil (McMahon & Oommen 2008). Obrázek 1b demonstruje tzv. duální vazebný model kaseinové micely. Velikost micel se může mezi jednotlivými druhy výrazně lišit, přičemž micely v mléce kozím jsou v průměru větší než v mléce kravském či ovčím (Raynal-Ljutovac et al. 2008; Ingham et al. 2018). Silanikove et al. (2010) uvádí, že kaseinové micely v kravském mléce jsou menší (60-80 nm) ve srovnání s micelami kozího mléka, jejichž velikost se pohybuje mezi 100–200 nm. Oproti tomu Park et al. (2007) uvádí průměrnou velikost těchto struktur pouze 190 nm a Wang et al. (2017) dokonce až 260 nm. Ingham et al. (2018) dodává, že i v rámci jednoho druhu se mohou vyskytovat rozdíly v poměru kaseinu a celkové velikosti micel, která je nejvíce ovlivněna přítomností κ -kaseinu přítomného v micelách.



Obrázek 1. a) Submicelární model vycházející z práce Walstra & Jenness (1984) a upraveno dle práce Chen et al. (2019); b) duální vazební model kaseinové micely dle Horne (2002).

Kaseinové frakce α_{S1} -, α_{S2} - a β - směřují do středu micely a jsou méně rozpustné ve vodném prostředí, zatímco κ -kasein je hydrofilní a tvoří povrch kaseinové micely (Dalglish 2011; Zhuang et al. 2018). β -kasein interaguje především prostřednictvím hydrofobních vazeb a disociuje při nízké teplotě. Jednotlivé micely jsou spojeny především fosforečnanem vápenatým, který propojuje α_S -kaseinové frakce (Horne 2002; Zhuang et al. 2018), a malým množstvím hořčíku, sodíku, draslíku a citrátu (Park et al. 2007). Většina vápníku v mléce je obsažena ve formě koloidního fosforečnanu vápenatého, který je spojen s fosfoserinovými zbytky α - a β - kaseinových bílkovin (Ingham et al. 2018).

Struktura micely kaseinu v kozím či ovčím mléce je diametrálně odlišná oproti mléku kravskému (Park et al. 2007). Kaseinové micely kozího mléka jsou obecně bohatší na vápník a fosfor (Horne 2002; Yuksel et al. 2012), jsou méně rozpustné a stabilní vůči teplu, ale naopak ztrácí β -kasein mnohem snadněji než micela kravského mléka (Kalyankar et al. 2016). Specifita kaseinové micely u kozího mléka spočívá obecně ve vyšším stupni mineralizace a velikosti micely oproti mléku ovčímu či kravskému (Raynal-Ljutovac et al. 2008). Ranadheera et al. (2019) uvádí, že kozí mléko vykazuje větší míru disperze kaseinových micel, což má vliv na reologické vlastnosti mléčných výrobků.

2.2.3.2.1. α_{S1} -kasein

Jedná se o vysoce fosforylovaný protein, který představuje strukturální složku kaseinové micely, hrající klíčovou roli při tvorbě sýřeniny (Selvaggi et al. 2014). Masoodi & Shafi (2010) uvádějí, že α_{S1} -kasein je celkem tvořen 214 aminokyselinami.

V kravském mléce je hlavní kaseinovou frakcí právě α_{S1} -kasein. Zastoupení kaseinů je významně ovlivněno genetickým polymorfismem (Selvaggi et al., 2014). Výskyt α_{S1} -kaseinu byl v posledních letech hojně studován a bylo zjištěno, že má mnoho různých genetických typů,

např. A, B, C, D, E, F a 0 (Kalyankar et al. 2016). Je zřejmé, že „nulový typ“ nebo úplná nepřítomnost v kozím mléce naznačuje jistou odlišnost oproti mléku kravskému (Selvaggi et al. 2014). Za hlavní α -frakci v kozím mléce je často označován α_{S2} -kasein, který má rozdílnou vstřebatelnost, ale i vlastnosti hojně využívané v sýrařském průmyslu (Kalyankar et al. 2016). Obsah α_{S1} -kaseinu ovlivňuje zejména koagulační schopnosti mléka (Hodgkinson et al. 2019; Ranadheera et al. 2019). Kozí mléko je obecně typické nízkým obsahem α_{S1} -kaseinu a v důsledku toho dochází při výrobě sýrů k tvorbě jemnější sýřeniny (Lad et al. 2017; Ingham et al. 2018). Takové mléko vykazuje nižší výtěžnost sýřeniny, delší dobu srážení, ale zároveň větší tepelnou odolnost (Ballabio et al. 2011).

Pro mlékárenský průmysl je kritickým faktorem nejen množství α_{S1} -kaseinu (Clark & Sherbon 2000; Ingham et al. 2018), ale také celkový obsah kaseinových bílkovin (Wedholm et al. 2006) však dodává, že rozhodující vliv má celkový obsah kaseinů. Důležitá je velikost micel, přičemž mléko s menšími micelami má lepší koagulační vlastnosti a vytváří pevnější sýřeninu (Ingham et al. 2018).

2.2.3.2.2. α_{S2} -kasein

Frakce α_{S2} - představují relativně různorodou skupinu kaseinů oproti α_{S1} -frakcím a byly identifikovány u řady živočišných druhů jako jsou ovce, kozy či krávy. Vzhledem k obtížné izolaci a purifikaci je α_{S2} -kasein nejméně zkoumaným proteinem v mléce. Nicméně byl nalezen ve vyšších koncentracích právě v kozím mléce (Selvaggi et al. 2014). Kompletní aminokyselinová sekvence α_{S2} -kaseinu sestává u koz z 223 aminokyselinových zbytků (Masoodi & Shafi 2010) s velkým počtem pozitivně nabitých postranních řetězců, zejména v C-termálních segmentech (Selvaggi et al. 2014).

Z literatury je zřejmé, že se jedná o fosforylovaný peptid, jehož role nebyla ještě zcela objasněna (Selvaggi et al. 2014). Fox (2009) uvádí, že z kaseinů je α_{S2} - nejvíce hydrofilní a relativně bohatý na výskyt aminokyseliny lysinu, která je pro člověka esenciální.

2.2.3.2.3. β -kasein

Na rozdíl od mléka kravského, ve kterém převládá α_{S1} -kasein je v kozím mléce nejhojněji zastoupenou bílkovinou β -kasein (Selvaggi et al. 2014; Lad et al. 2017). Vyznačuje se vysokou citlivostí na přítomnost vápenatých iontů, kdy již při nižších koncentracích dochází k jeho vysrážení (Fox 2009) a zároveň je ze všech typů kaseinů jediný, jehož shlukování do micelárních struktur je ovlivňováno kromě teploty, i koncentrací dané bílkoviny v roztoku (Perinelli et al. 2019).

Při studiu polymorfismu β -kaseinu bylo nalezeno několik alel vyjadřujících různé úrovně této bílkovinné frakce. Původ této heterogenity je závislý na vícenásobné fosforylaci peptidového řetězce za vzniku forem 4P, 5P a 6P, přičemž některé vzorky koziho mléka nemusí tuto frakci vůbec obsahovat (Piredda Agenzia & Pirisi 2004). β -kasein je fosforylován, v porovnání s oběma α_s -kaseiny méně a je prokázáno, že ze všech kaseinů vykazuje největší hydrofobicitu (Fox 2009) a může ovlivňovat vlastnosti mléka při výrobě sýrů, např. prodloužení doby potřebné ke srážení nebo pevnost sýřeniny (Selvaggi et al. 2014). Perinelli et al. (2019) uvádí, že samovolná schopnost vyvolat imunitní odpověď byla objasněna u bovinního β -kaseinu, avšak představuje zajímavou oblast výzkumu i u mlék dalších živočišných druhů.

Potenciál pro využití tohoto kaseinu je podložen celou řadou studií, např. práce zabývající se využitím β -kaseinových micel představující vhodnou alternativu pro syntetické kopolymery využívané k výrobě léků a enkapsulaci účinných látek (Perinelli et al. 2019). Dále je zvažováno využití β -kaseinových micel jako přírodních nanonosičů pro orální podání hydrofobních nutraceutik, např. vitaminů, antioxidantů, mastných kyselin, probiotik (Kimpel & Schmitt 2015), včetně některých chemoterapeutik, a tím by mohlo dojít ke zvýšení jejich biologické dostupnosti (Turovsky et al. 2015). Tyto bioaktivní molekuly jsou obvykle velmi náchylné k degradaci, ale jakmile jsou zapouzdřeny, mohou zvýšit jejich stabilitu a biologickou dostupnost (Kimpel & Schmitt 2015).

2.2.3.2.4. κ -kasein

Jedná se o bílkovinnou frakci, nacházející se především na povrchu kaseinových micel, která se podílí na jejich celkové stabilitě a zároveň je v přítomnosti vápenatých iontů tento kasein jako jediný rozpustný (Selvaggi et al. 2014). Z hlediska polymorfismu κ -kaseinu jde o stupeň glykosylace a fosforylace ovlivňující citlivost koziho mléka vůči srážecím enzymům, což má významný technologický dopad na koagulaci a syřitelnost (Amigo et al. 2000).

Molekula této bílkoviny je složena z 171 aminokyselin a je obecně známo, že 105. aminokyselinou je fenylalanin, 106. je methionin. Rozštěpením peptidové vazby mezi zmíněnými aminokyselinami dochází k vzniku *para*- κ -kaseinu z 1.–105. aminokyseliny a kaseinomakropeptidu (CMP) ze 106.–171. aminokyseliny (Park et al. 2017).

CMP se uvolňuje do syrovátky a je vedle β -laktoglobulinu a α -laktalbuminu její nejrozšířenější bílkovinnou složkou, zatímco *para*- κ -kasein je součástí sýřeniny. Kromě zajímavé aminokyselinové skladby vykazuje CMP celou řadu zdraví prospěšných účinků, jmenovitě např. antibakteriální, antivirové, imunomodulační, protizánětlivé, probiotické účinky apod. (Thomä-Worringer et al. 2006).

2.2.3.3. *Obecná charakteristika a význam syrovátkových bílkovin*

Syrovátkové bílkoviny představují skupinu mléčných bílkovin, které zůstávají v roztoku (syrovátce) po vysrážení kaseinu při pH 4,6 a 20 °C (Ofstedal 2012). Mezi hlavní syrovátkové bílkoviny je obvykle řazen β -laktoglobulin a α -laktalbumin, sérový albumin a imunoglobuliny IgG, IgA, IgM (Buffoni et al. 2011; Pereira 2014) viz. Tabulka 2.

Syrovátkové bílkoviny přináší obecně zajímavý profil aminokyselin, který je velice podobný složení aminokyselin v mateřském mléce (Selvaggi et al. 2014). Přestože syrovátkové bílkoviny mohou zhoršovat výrobu sýrů, způsobovat nižší výtěžnost či narušovat oddělování syrovátky, a to zejména v případě tepelně ošetřeného mléka, jsou zvláště bohaté na výskyt tzv. esenciálních aminokyselin, např. tryptofanu či lysinu (Raynal-Ljutovac et al. 2008). Na rozdíl od kaseinu neobsahují syrovátkové bílkoviny fosfor, ale zato se vyznačují vysokým obsahem aminokyselin obsahujících síru (Ofstedal 2012; Selvaggi et al. 2014), dále aminokyselin s rozvětveným řetězcem, tj. leucin, izoleucin, valin, a také již obsahem zmíněného lysinu, zatímco kasein obsahuje vyšší podíl histidinu, methioninu a fenylalaninu (Pereira 2014).

Syrovátka představuje vhodnou náhradu v umělé kojenecké výživě (Selvaggi et al. 2014), ale je využívána i jako krmivo pro zvířata, dále pro výrobu laktózy či sušené syrovátky a jednotlivých syrovátkových proteinů (El-Sayed & Chase 2011).

Za hlavní biologické účinky syrovátkových bílkovin jsou považovány antibakteriální, antivirové, antimykotické, antioxidační, antihypertenzní, antimikrobiální, antitrombotické, opioidní a imunomodulační účinky, které navíc zlepšují vstřebávání dalších živin (Pereira 2014). Jedinečné terapeutické a funkční vlastnosti syrovátkových proteinů jsou však často do značné míry ovlivněny interakcemi mezi ostatními složkami a degradací bílkovin během zpracování (El-Sayed & Chase 2011).

2.2.3.3.1. *β -laktoglobulin*

β -laktoglobulin je nejběžnější syrovátkovou bílkovinou a tvoří přibližně 10 % celkových mléčných bílkovin a asi 58 % syrovátkových proteinů. Uvádí se, že existují dvě genetické varianty A a B, které se liší substitucí glycinu (ve variantě B) a asparágovou kyselinou (ve variantě A). Molekula β -laktoglobulinu obsahuje dvě disulfidové a jednu volnou sulfhydrylovou skupinu a žádný fosfor (Kilara & Vaghela 2017).

Předpokládá se, že β -laktoglobulin, stejně jako ostatní bílkovinné frakce plní určité biologické funkce, ovšem žádná z nich nebyla dosud jednoznačně přijata (Petrotos et al. 2014). Dle struktury molekuly lze usuzovat, že vzhledem k hydrofobní části v molekule může docházet k vazbě retinolu. Někteří odborníci spekulují, že vazba vitamínu (Kilara & Vaghela 2017).

Pereira (2014) potvrzuje, že β -laktoglobulin je důležitým nosičem retinolu a rovněž vykazuje antioxidační účinky. Z hlediska technologického vykazuje mléko s vyšším obsahem laktoglobulinu lepší koagulační vlastnosti (Ingham et al. 2018).

2.2.3.3.2. α -laktalbumin

Druhým nejčastějším proteinem v syrovátce je α -laktalbumin tvořící přibližně 2 % z mléčných bílkovin a 13 % ze syrovátkových proteinů. Molekula obsahuje čtyři disulfidové vazby a na rozdíl od kaseinových bílkovin neobsahuje fosfátové skupiny (Kilara & Vaghela, 2017). Kromě vysoké nutriční hodnoty sehrává α -laktalbumin významnou roli při syntéze laktózy v mléčné žláze, kdy představuje jednu ze dvou složek laktózosyntázy, která katalyzuje konečný krok biosyntézy laktózy (Permyakov & Berliner 2000). Bylo prokázáno, že α -laktalbumin ovlivňuje aktivitu enzymu galaktosyltransferázy, který v procesu tvorby laktózy hraje důležitou roli, protože katalyzuje přenos galaktosylových skupin z UDP-galaktózy na glukózu, respektive glykoproteiny obsahující N-acetylglukosamin (Martin et al. 2002; Permyakov & Berliner 2000; Selvaggi et al. 2014).

Molekula α -laktalbuminu je složena ze 123 aminokyselin (Kilara & Vaghela 2017) a patří mezi tzv. metaloproteiny, což znamená, že ve své struktuře obsahují vázané ionty kovů, především vápníku (Selvaggi et al. 2014; Petrotos et al. 2014). Fox et al. (2009) uvádí, že α -laktalbumin je bohatý na aminokyselinu tryptofan a dále síru, která je zastoupena především ve formě cysteinu a methioninu. Autor dále zmiňuje, že α -laktalbumin v rámci syrovátkových bílkovin vykazuje nejvyšší tepelnou stabilitu.

2.2.3.4. *Minoritní bílkoviny*

Mléko rovněž obsahuje další minoritní, ale přesto důležité syrovátkové proteiny, jako je např. sérový albumin, laktoferin, lysozym (Biadała & Konieczny 2018), imunoglobuliny, transferin, laktoperoxidáza (Pereira 2014), vápník-vázající protein či folát-vázající protein a proteozopeptony (Park et al. 2007). Do této skupiny je v neposlední řadě zařazován též prolaktin, který podporuje růst mléčné žlázy a tvorbu mléka (Selvaggi et al. 2014).

Mezi další minoritní, ale přesto nezbytné bílkoviny patří např. feritin, glykomakropeptidy, kalmodulin a různé růstové faktory (Selvaggi et al. 2014). Obvykle jsou řazeny mezi tyto látky i proteiny, které jsou součástí tzv. fosfolipidové dvojvrstvy buněčné membrány (El-Sayed & Chase 2011).

2.2.3.5. Dusíkaté látky nebilkovinného charakteru

Kromě výše zmíněných složek obsahuje mléko i tzv. dusíkaté látky nebilkovinné povahy vyskytující se obvykle ve velmi nízké koncentraci, jedná se např. o močovinu, kratší peptidy, volné aminokyseliny, kreatin, kreatinin, močovou a orotovou kyselinu, amoniak rovněž také nukleosidy, nukleotidy a polyaminy (Alichanidis et al. 2016). Dle autorů Park et al. (2007) představuje poměr dusíkatých látek nebilkovinné povahy ku celkovému obsahu bílkovin 3 až 13 %.

2.2.4. Minerální látky

Minerální látky obsažené v kozím mléce (Tabulka 3) vykazují vyšší biologickou využitelnost než v mléce kravském (Tarola et al. 2019) a tvoří přibližně 0,8 g/100 g mléka (Lad et al. 2017). Kozí mléko obsahuje více vápníku, fosforu, draslíku a chlóru a nižší obsah sodíku a síry než mléko kravské (Turkmen 2017).

Tabulka 3. Obsah minerálních látek v kozím a kravském mléce v mg/100 g mléka (upraveno dle Park et al. 2007; Turkmen 2017).

minerální látky	kozí mléko	kravské mléko
vápník	134	119
chlór	150	100
hořčík	14	13
fosfor	111	93
draslík	204	151
sodík	50	49
síra	28	32
měď	0,05	0,06
jód	0,022	0,021
železo	0,05	0,05
mangan	0,032	0,020
selen	1,33	0,96
zinek	0,30	0,38

Významný je zejména obsah vápníku, který je často studován především ve spojitosti se zlepšením růstu a mineralizace kostry u dětí (Tarola et al. 2019). Z Tabulky 3 je patrné, že kozí mléko je ve srovnání s mlékem kravským charakteristické vyšším obsahem vápníku, fosforu

(Park et al. 2007) a představuje také bohatý zdroj hořčíku, zinku, mědi a selenu (Pereira et al. 2014).

Biologická využitelnost železa je v kozím mléce rovněž vyšší. Tento jev je vysvětlován vyšším obsahem nukleotidů, které přispívají k lepšímu vstřebávání ve střevě (Kalyankar et al. 2016).

2.2.5. Vitaminy

Kozí mléko obsahuje některé lipofilních, ale i hydrofilní vitaminů (Pereira 2014). Je bohatým zdrojem thiaminu (B1), riboflavinu (B2) a pantothenové kyseliny (B5), nicméně disponuje nižším množstvím listové kyseliny (B9) a kobalaminu (B12) (Kalyankar et al. 2016; Turkmen 2017). Kozí mléko, stejně jako mléko kravské vykazuje poměrně nízké zastoupení pyridoxinu (B6) a vitaminů E, D a C (Clark & Mora García 2017; Kalyankar et al. 2016).

Oproti mléku kravskému je v kozím mléce koncentrace vitaminu A relativně vysoká. Tento jev je vysvětlen faktem, že kozy jsou schopny přeměňovat veškerý β -karoten z potravy na vitamin A, což je příčinou i relativně bělejší barvy kozího mléka (Kalyankar et al. 2016; Verruck et al. 2019).

2.3. Faktory ovlivňující kvalitu mléka

Společným cílem producentů i zpracovatelů mléka je dosáhnout co nejvyšší nutriční i hygienické jakosti vstupní suroviny i finálních výrobků. Legislativa stanovující požadavky se zabývá zejména bezpečností, tj. zdravotní nezávadností mléka a mléčných produktů. Legislativní požadavky na kravské a kozí mléko se však diametrálně liší. Detaily legislativních opatření týkající se mikrobiologické kvality kozího mléka jsou uvedeny v kapitole 2.3.2.2.

Dle řady autorů (Leitner et al. 2004; Bagnicka et al. 2011; Rupp et al. 2019) je počet somatických buněk (PSB) spolu s mikrobiologickou kvalitou považován za parametr vypovídající o hygienické kvalitě mléka koz. Nicméně problematika somatických buněk v kozím mléce není legislativně pevně stanovena, na rozdíl od kravského mléka (kapitola 2.3.1.1.).

I přes splnění všech legislativních požadavků týkajících se hygienické kvality kozího mléka, existuje mnoho faktorů majících vliv na jeho kvalitu. Chemické složení mléka je ovlivněno mnoha faktory, např. vlivem plemene, parity, období, krmení, prostředí, stádia laktace či zdravotním stavem samotného vemene (Aganga et al. 2002; Park et al. 2007; Moradi et al. 2021). Chemická kompozice mléka je ovlivněna rovněž živočišným druhem či genetickým faktorem (Pereira 2014). Studie uvádí, že mezi hlavní neindividuální faktory, které ovlivňují nutriční složení, zejména variabilitu obsahu bílkovin, je řazena fáze laktace, období, věk a způsob krmení (Raynal-Ljutovac et al. 2008).

Mezi nejvýznamnější faktory mající vliv na kvalitu kozího mléka lze prokazatelně zařadit výskyt subklinické mastitidy (Leitner et al. 2004; Gelasakis et al. 2018) a dle vznesené hypotézy také problematika somatických buněk (SB), jejichž počet a zastoupení úzce souvisí s výskytem infekce mléčné žlázy (Ribeiro & Ribeiro 2010; Bagnicka et al. 2011). Proto bude v následujících kapitolách věnována pozornost SB a mastitidám.

2.3.1. Somatické buňky

Somatické buňky (SB) jsou tvořeny dvěma skupinami buněk. První z nich představují tzv. epiteliální buňky, pocházející z výstelky mléčné žlázy a druhá skupina je zastoupena bílými krvinkami (leukocyty), které přecházejí do mléka z krevního řečiště v reakci na poranění či infekci (Sharma et al. 2011).

Somatické buňky jsou součástí vrozeného imunitního systému mléčné žlázy (Malik et al. 2018) a je obecně známo, že reprezentují jednu z hlavních obranných linií proti intramamárním infekcím (Sharma et al. 2011). Z hlediska obrany proti patogenním mikroorganismům je v mléčné žláze důležitý nejen celkový počet somatických buněk, ale i zastoupení jednotlivých

buněčných subpopulací (Schwarz et al. 2011). Stanovení diferenciálu somatických buněk a analýza jejich životaschopnosti je vnímána velmi přínosně zejména z důvodu studia jejich enzymatického aparátu, kterým jednotlivé typy buněk disponují (Li et al. 2014).

Dále se předpokládá, že somatické buňky plní kromě obranné funkce v mléčné žláze také funkci ochrannou přímo v mléce (Malik et al. 2018). Somatické buňky jsou důležitým zdrojem enzymů, především lipáz a proteáz, a mohou ovlivňovat jak počáteční kvalitu mléka, tak i kvalitu finálních výrobků (Kelly et al. 2006).

Počet somatických buněk (PSB) je celosvětově považován za ukazatel zdravotního stavu mléčné žlázy dojníc a je hojně využíván k nepřímému hodnocení kvality mléka. Zvýšené počty SB jsou v kravském mléce považovány za indikátor subklinické mastitidy (Stocco et al. 2020), což způsobuje zhoršení kvality mléka (Li et al. 2014), včetně snížení mléčné užitkovosti (Seydlová & Dragounová 2017) a vlivu na technologické vlastnosti mléka, např. schopnost koagulace (Stocco et al. 2019).

2.3.1.1. Limity týkající se somatických buněk v mléce

V rámci Evropské unie jsou v současnosti legislativní požadavky týkající se limitu PSB pro mléko kravské, a to 400 000 v 1 ml mléka dle požadavků Nařízení č. 853/2004 Sb. (EU 2004), zatímco v USA je současný limit dokonce 750 000 buněk v 1 ml mléka, přičemž řada mlékárenských organizací a producentů pravidelně navrhuje snížení limitu dle evropského vzoru (Norman et al. 2021). Z hlediska výrazné variability PSB z důvodu nejen odlišného typu sekrece (Jimenez-Granado et al. 2014), ale i v závislosti na paritě, fázi laktace a různých patogenech (Bagnicka et al. 2011) není norma pro mléko malých přežvýkavců v mnoha zemích legislativně určena, což vznáší dle některých autorů (Paape et al. 2007; Seydlová & Dragounová 2017) otázku regulace PSB a následného vytvoření zdravotních mezí pro jistotu kvality a bezpečnosti suroviny a její následnou utilizaci konzumenty.

Nicméně je důležité zmínit, že somatické buňky jsou přirozenou součástí mléka (Li et al. 2014; Alhussien & Dang 2018) a kozy jsou charakteristické odlišným typem sekrece mléka, tzv. apokrinním, na rozdíl od krav s merokrinním typem sekrece, což zapříčiňuje to, že syrové kozí mléko je typické vyššími hodnotami PSB než mléko kravské (Jimenez-Granado et al. 2014; Moradi et al. 2021). Z tohoto důvodu nemůže být PSB považován za spolehlivý indikátor hygienické kvality kozího mléka, na rozdíl od mléka kravského, ale i přes to může být potenciální příčinou změn různých fyzikálně-chemických vlastností kozího mléka (Albenzio et al. 2015a), které mohou mít negativní dopad na výtěžnost, složení a technologickou zpracovatelnost mléka (Barrón-Bravo et al. 2013; Ribeiro et al. 2015).

2.3.1.2. *Charakteristika buněčných subpopulací*

Somatické buňky (SB) se dělí na epiteliální buňky a buňky pocházející z krve – leukocyty, mezi něž jsou řazeny makrofágy, polymorfonukleární neutrofilny (PMN) a lymfocyty (Boutinaud & Jammes 2002; Li et al. 2014; Malik et al. 2018).

Lymfocyty, makrofágy a PMN hrají důležitou roli v zánětlivé odpovědi v mléčné žláze (Schwarz et al. 2011). Vyjma celkového počtu somatických buněk (PSB) je dle řady autorů (Schwarz et al. 2011; Li et al. 2014; Stocco et al. 2020) zastoupení jednotlivých typů buněk velmi přínosné z hlediska popisu zdravotního stavu mléčné žlázy. Na základě variability PMN, lymfocytů a makrofágů lze v případě krav stanovit rozsah zánětlivé reakce (Stocco et al. 2020). U krav a ovcí představují makrofágy převažující typ buněk v mléce ze zdravé mléčné žlázy (35–79 %) a působí jako ochrana proti napadení patogeny vyvolaným mastitidou (Boutinaud & Jammes 2002). Zatímco u koz se dominance jednotlivých typů buněk významně neliší v závislosti na výskytu infekce a PMN představují majoritní skupinu leukocytů, v kravském mléce z infikované mléčné žlázy, převažují PMN buňky oproti mléku ze zdravé mléčné žlázy, kde dominují makrofágy společně s lymfocyty (Alhussien & Dang 2018). Li et al. (2014) ve své studii uvádí, že v kravském mléce zatíženém mastitidou mohou makrofágy tvořit až 92 % z celkových leukocytů.

Je zřejmé, že různé podíly těchto buněčných populací ve spojitosti s různými limitními hodnotami PSB mohou ovlivňovat konečnou charakteristiku mléčných výrobků (Albenzio et al. 2009), podobně jako různé druhy environmentálních mikroorganismů, které sice nejsou patogeny, ale rovněž mohou nepříznivě ovlivňují tyto procesy (Stocco et al. 2020).

Kromě spojitostí s výskytem mastitidy by bylo možné uvažovat nad neporušenými životaschopnými somatickými buňkami jako o enzymovém rezervoáru a následném využití izolovaných enzymů v mlékárenském průmyslu (Li et al. 2014).

2.3.1.3. *Somatické buňky pocházející z krve*

2.3.1.3.1. *Makrofágy*

Makrofágy vykazují schopnost aktivně pohlcovat bakterie, buněčné zbytky a nahromaděné složky mléka (Damm et al. 2017) a představují predominantní typ somatických buněk ve zdravém kravském mléce (Li et al. 2014; Malik et al. 2018). V případě výskytu infekce uvolňují tzv. chemoatraktanty či jiné chemické signály, díky kterým dojde k aktivaci PMN buněk (Li et al. 2014), které jsou rovněž schopné pohlcovat mikrobiální buňky procesem fagocytózy. Makrofágy, stejně jako lymfocyty, mohou iniciovat imunitní odpověď, rozpoznávat napadající

patogeny a celkově se podílet na specifické imunitě (Li et al. 2014; Damm et al. 2017; Malik et al. 2018).

2.3.1.3.2. *Polymorfonukleární neutrofily (PMN)*

Mezi leukocyty jsou v kozím mléce predominantní právě PMN buňky (Boutinaud & Jammes 2002). Stejně jako makrofágy se podílejí na nespecifické imunitní odpovědi a na počátku akutního zánětlivého procesu vytváří obranu proti invazivním bakteriím (Paape et al. 2002; Damm et al. 2017). Během pokračující infekce dochází k nárůstu PMN, které rovněž fagocytují mikroorganismy a usmrcují je pomocí kombinace oxidativních i neoxidativních mechanismů (Pham 2006). Malik et al. (2018) doplňuje, že PMN mohou likvidovat napadené bakterie uvolňováním enzymů a reaktivních forem kyslíku (ROS) (Paape et al. 2002).

Rozsah a degradační aktivita se mění v závislosti na zastoupení určité buněčné populace. PMN disponují odlišným enzymatickým aparátem, zejména v případě degradace proteinů disponují velmi aktivními proteázami, oproti makrofágům, pohlcujícím patogeny a uvolňujícím 5–6krát více proteáz (Stocco et al. 2020).

2.3.1.3.3. *Lymfocyty*

Lymfocyty zastávají důležitou úlohu ve specifické imunitní odpovědi (Li et al. 2014), konkrétně regulují vznik a potlačení imunitních reakcí (Damm et al. 2017). Lymfocyty lze rozdělit na B-lymfocyty, jejichž hlavní předností je schopnost rozpoznávat antigeny napadajících patogenů prostřednictvím specifických membránových receptorů (Sordillo et al. 1997; Malik et al. 2018) a T lymfocyty, které zahrnují jak CD4+ buňky, které se podílí pomocí cytokinů na aktivaci B-lymfocytů, makrofágů a dalších buněk, které jsou součástí imunitní odpovědi, tak CD8+ buňky odstraňují pozměněné, staré či poškozené buňky (Sordillo et al. 1997).

2.3.1.4. *Somatické buňky pocházející z epitelu mléčné žlázy*

2.3.1.4.1. *Epiteliální buňky a cytoplazmatické částice*

Buňky mléčného epitelu jsou považovány za sekreční buňky vylučující mléko, které jsou během procesu laktace v rámci regenerace vylučovány do mléka jejich postupným odlupováním (Boutinaud & Jammes 2002), ale při výskytu infekce dochází k navýšení jejich počtu (Sharma et al. 2011). Mimo to, rozdíly v typu sekrece mléka, apokrinní u koz oproti merokrinnímu u krav, vedou ke zvýšenému počtu exfoliovaných buněk epitelu a zároveň

odloučení jejich buněčných úlomků, tzv. cytoplazmatických částic (Boutinaud & Jammes, 2002).

Tyto cytoplazmatické částice obvykle neobsahují jádro, ale bylo prokázáno, že některé z nich mohou obsahovat jaderné fragmenty, nicméně nevykazují potenciální patogenitu (Boutinaud & Jammes 2002; Jimenez-Granado et al. 2014). Pirisi et al. (2007) dokonce považuje tyto částice za samostatný zdroj somatických buněk v kozím mléce. Nicméně Souza et al. (2012) uvádí, že ačkoli jsou tyto částice normální součástí mléka, tak je nelze klasifikovat jako buňky, jelikož neobsahují jádra ani DNA.

Epiteliální buňky rovněž reprezentují první obrannou linii mléčné žlázy a mohou se podílet na imunitní reakci (Boutinaud & Jammes 2002) zejména prostřednictvím fagocytózy (Sharma et al. 2011). Tyto buňky jsou schopny produkovat zánětlivé mediátory, jako jsou cytokiny, chemokiny nebo metabolity arachidonové kyseliny (Sharma et al. 2011).

2.3.1.5. *Enzymatická aktivita somatických buněk*

Endogenní enzymy původem ze somatických buněk hrají v mléce důležitou ochrannou roli (Malik et al. 2018). Po rozpadu somatických buněk se do mléka uvolňuje velké množství enzymů, mezi nimiž se nachází lipázy (např. lipoproteinová lipáza), oxidázy (kataláza, a laktoperoxidáza), glykosidázy (lysozym) a proteázy (katepsiny, elastáza, kolagenáza apod.) (Li et al. 2014).

Nedávné studie ukazují, že každá subpopulace somatických buněk mléka je schopna poskytnout vlastní profil endogenních enzymů z hlediska typu, množství, specifity a aktivity enzymu, čímž vypovídají o potenciálním vlivu při uvolnění do mléka (Li et al. 2014).

PMN buňky tvořící dominantní složku leukocytů jak ve zdravém, tak mastitidou zatíženém kozím mléce (Alhussien & Dang 2018; Bagnicka et al. 2011), jsou zdrojem celé řady enzymů, jako je plazmin (Silanikove et al. 2016), skupina katepsinů typu B, C, D, L, G a S, elastázy, lipázy a kolagenázy (Moradi et al. 2021).

Nejdůležitějším proteolytickým enzymem mléka s převážně vyššími hodnotami PSB je již zmíněný plazmin, avšak s rostoucí mírou zánětu nabývají na významu i další typy proteáz (Silanikove et al. 2016). Plazmin hraje významnou roli v regulaci sekrece mléka a jeho aktivita narůstá zejména během klinické mastitidy, ale významný nárůst byl pozorován i v případě mastitidy subklinické (Silanikove et al. 2014). Albenzio et al. (2015) uvádí, že makrofágy jsou zdrojem aktivátorů plazminogenu způsobující jeho přeměnu na aktivní formu plazminu.

Dalším, velmi studovaným enzymem je katepsin D, který je schopen hydrolyzovat všechny typy kaseinů (α_1 -, α_2 -, β -a κ -kaseiny), přičemž vyšší aktivita byla pozorována ve spojitosti

s α_1 -kaseiny, než na ostatních kaseinech se širokým spektrem štěpných míst. Dále bylo potvrzeno, že za hydrolýzu α_1 - a β -kaseinů jsou zodpovědné endogenní proteázy ze SB, konkrétně katepsiny typu B, G a elastáza (Li et al. 2014). Tyto kaseinové frakce mohou významně ovlivňovat technologické vlastnosti mléka, např. při jejich navýšení dochází často k prodloužení doby koagulace a zvýšení pevnosti vzniklé sýřeniny (Clark & Sherbon 2000). Nicméně vzniklé produkty štěpení – volné peptidy, mohou tyto vlastnosti výrazně zhoršovat (Leitner et al. 2004; Silanikove et al. 2014).

Některé další proteinázy vylučované PMN, např. elastáza a proteináza 3, vykazují antimikrobiální účinky (Sharma et al. 2011) během procesu fagocytózy invazivních mikroorganismů (Pham 2006; Sharma et al. 2011). Bylo zjištěno, že elastáza má vyšší enzymatickou aktivitu, pokud PMN během zánětu přechází do mléka (Li et al. 2014). Kataláza, jeden z hlavních antioxidantních enzymů v mléce, představuje další endogenní enzym původem z PMN, který je charakteristický změnami redoxního potenciálu, čímž dochází k omezení schopnosti mikroorganismů přežít (Hamed et al. 2008).

Nežádoucí dopady přítomnosti somatických buněk v důsledku jejich enzymatické aktivity jsou navíc často spojeny s kratší trvanlivostí, ovlivněním sensorických vlastností mléka i mléčných výrobků (Sharma et al. 2011).

2.3.1.6. Faktory ovlivňující PSB

Počet, ale i zastoupení jednotlivých typů somatických buněk v mléce je ovlivněno celou řadou faktorů. Hlavním faktorem ovlivňujícím PSB je zdravotní stav zvířete (Sharma et al. 2011). Mezi zásadní vlivy je řazeno stádium laktace (Pirisi et al. 2007), parita (Boutinaud & Jammes 2002), druh zvířete (Rupp et al. 2019). Sharma et al. (2011) a Malik et al. (2018) doplňují dále věk zvířete, plemeno či stres a rovněž dodává, že technologie zpracování a dodržování hygieny během dojení má také významný vliv na PSB (Ribeiro et al. 2015).

Vzhledem k výše vyjmenovaným faktorům, lze usuzovat, že faktory neinfekční povahy zásadně navyšují počty somatických buněk v kozím mléce, oproti tomu např. ovce vykazují vyšší vnímavost spíše vůči infekčním faktorům, které zapříčiňují zejména klinickou mastitidu (Paape et al. 2007; Seydlová & Dragounová 2017).

2.3.2. Mastitida

Mastitida neboli zánětlivé onemocnění mléčné žlázy je definováno fyzikálními, chemickými, ale i bakteriologickými změnami v mléce, které jsou často doprovázeny i změnami patologickými (Malik et al. 2018). V případě zánětu mléčné žlázy, který má za následek

obvykle nárůst PSB, lze mluvit jako o tzv. multifaktoriálním onemocnění (Stuhr & Aulrich 2010), přesto však dané onemocnění nejčastěji vzniká v důsledku bakteriální infekce (Sharma et al. 2011).

Zánětlivá reakce je obvykle zahájena tak, že bakterie proniknou strukovým kanálkem do mléčné žlázy a zahájí proces množení. Ačkoli bakteriální toxiny, enzymy a složky buněčné stěny mají přímý vliv zejména na funkci mléčného epitelu, tak mohou rovněž stimulovat produkci četných mediátorů zánětu, především neutrofilů (Sharma et al. 2011).

Původce mastitidy lze rozdělit na dvě hlavní skupiny, a to kontagiózní a environmentální patogeny. Mezi kontagiózní patogeny, způsobující největší nárůst PSB, je obvykle řazen *Staphylococcus aureus* či *Streptococcus agalactiae* (Sharma et al. 2011). Dle Contreras et al. (2007) je *Staphylococcus aureus* zodpovědný jak za akutní klinickou, tak za subklinickou mastitidu. Infekce způsobená environmentálními patogeny, např. *Corynebacterium* spp. či koaguláza negativní stafylokoky (CNS), obvykle vyvolává podstatně menší nárůst PSB (Sharma et al. 2011).

Ve studii Bagnicka et al. (2011) je uvedeno, že dominantními patogeny v kozím mléce jsou již zmíněné koaguláza negativní stafylokoky, dále pak *S. aureus*, *S. agalactiae* či *S. intermedius*, dále pak *Corynebacterium* spp. a *Enterococcus* spp.

Ostatní patogeny, u malých přežvýkavců typické nižší mírou výskytu, jsou také např. Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* a *Manheimia haemolytica* (Contreras et al. 2007) Přítomnost somatických buněk v mléce je jedním z důležitých ochranných mechanismů mléčné žlázy (Sharma et al. 2011). Contreras et al. (2007) uvádí, že nejčastěji diagnostikovanými mikroorganismy způsobujícími intramamární infekci (IMI) tedy zánět mléčné žlázy, u koz i ovcí jsou stafylokoky. Hussein et al. (2020) upřesňuje, že převládajícím patogenem u koz jsou právě koaguláza negativní stafylokoky (CNS).

U krav předchází výskytu mastitidy navýšení počtu somatických buněk a tento faktor lze obecně považovat za ukazatel přítomnosti infekce (Boutinaud & Jammes 2002). V případě infekce mléčné žlázy je tento jev dán zejména zvýšeným prostupem leukocytů z krve do mléka (Jimenez-Granado et al. 2014). Stupeň a povaha buněčné odpovědi jsou poté úměrné fázi infekce (Malik et al. 2018).

2.3.2.1. Mastitida u koz

Velká část intramamárních infekcí (IMI) u koz je přisuzována právě subklinické mastitidě, a to 15–40krát častěji než mastitidě klinické (Contreras et al. 2007). Oproti tomu roční výskyt klinických mastitid je u malých přežvýkavců obecně nižší než 5 % (Contreras et al. 2003).

Nediagnostikovaná subklinická mastitida může vést k narušení zdravotního stavu mléčné žlázy a představuje tak stálé riziko infekce pro celé stádo v důsledku přenosu patogenů prostřednictvím vemene (Hussein et al. 2020). Subklinická mastitida je spojována se ztrátami dojivosti, zhoršením kvality a hygieny mléka jakožto vstupní suroviny pro další zpracování (Sharma et al. 2011; Silanikove et al. 2014; Hussein et al. 2020).

2.3.2.2. *Legislativní požadavky na jakost syrového kozího mléka*

Legislativní požadavky pro kozí mléko, jakožto surovinu pro zpracování na potravinářské výrobky jsou uvedeny v Nařízení EU a Rady (ES) č. 853/2004 (oddíl IX: Syrové mléko, mlezivo, mléčné výrobky a výrobky z mleziva) a Vyhláše č. 445/2017 Sb. musí syrové mléko a mlezivo pocházet od zvířat:

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

Kozí mléko určené pro výrobu výrobků ze syrového nepasterovaného mléka nesmí pro celkový počet mikroorganismů (CPM) překročit limit 500 000 KTJ/ml a pro *Staphylococcus aureus* hodnotu 500 KTJ/ml. Limit CPM v případě mléka pro výrobu výrobků z pasterovaného mléka pak nesmí přesáhnout 1 500 000 KTJ/ml (EU 2004; MZe 2017).

3. Cíle a hypotézy

Cíle:

- 1) Stanovit počet somatických buněk (PSB), mikrobiologickou kvalitu a základní složení jednotlivých vzorků mléka širokého souboru pokusných zvířat (koz) a dle vzájemných interakcí určit limitní hodnoty PSB pro splnění ostatních kvalitativních parametrů ovlivňujících úspěšnost technologického zpracování suroviny.
- 2) Stanovit zastoupení minerálních látek, zejména sodných, draselných, vápenatých a chloridových iontů ve vztahu k hygienické kvalitě mléka.
- 3) Navrhnout a optimalizovat přípravu vzorku a instrumentální analytickou metodu stanovení diferenciálního počtu jednotlivých typů somatických buněk v kozím mléce.

Hypotézy:

- 1) Zastoupení základních složek a dalších kvalitativních parametrů kozího mléka z mléčné žlázy bez významného nálezu bakteriálních patogenů, je značně ovlivněno počtem somatických buněk.
- 2) Změnami v hygienické kvalitě kozího mléka jsou ovlivňovány koncentrace minerálních látek.
- 3) Vyvinutá metoda je vhodná pro analýzu diferenciálního počtu somatických buněk v kozím mléce.

4. Metodika práce

4.1. Koza bílá krátkosrstá

Koza bílá krátkosrstá je řazena mezi tradiční česká plemena. Toto plemeno vzniklo křížením místních koz z Čech a Slovenska s kozly sánského plemene (Fantová 2015). Vyznačuje se zejména vysokou mléčnou užitkovostí a dále je toto plemeno považováno za vysoce odolné a plodné (Vostrá-Vydrová et al. 2020). Roční dojivost se pohybuje v rozmezí 8000–10000 kg mléka. (Fantová 2015).

Srst koz je krátká, typicky zbarvená do bíla, bez přítomných pigmentů. Živá hmotnost představuje u koz rozmezí 50–70 kg, zatímco u kozlů až 70–90 kg. Kohoutková výška dosahuje u koz 70–80 cm, u kozlů 75–85 cm (Fantová 2015).

4.2. Vzorky mléka a jejich odběr

V průběhu let 2020 až 2022 byly odebrány individuální vzorky mléka z večerního nádoje od zvířat plemene Koza bílá krátkosrstá z jedné farmy v ČR. Farma je vedena v ekologickém režimu a počet koz na farmě se pohybuje mezi 500–700.

Uplatňován je velkovýrobní systém dojení, kde nejsou aplikována opatření proti přenosu a rozšiřování patogenů. Struky nejsou nijak ošetřovány dezinfekčním prostředkem. Prováděna je pouze sanitace dojírny po ukončení dojení. Skladba krmné dávky byla jednotná a krmný režim byl složen zejména ze sena, senáže, granulovaného koncentrovaného krmiva a možnosti pastvy.

Individuální vzorky mléka od koz bílých krátkosrstých byly odebírány *lege artis*. Odběr individuálních vzorků mléka uskutečnil proškolený personál ve sterilních jednorázových rukavicích. Nejdříve bylo realizováno omytí mléčné žlázy, včetně otření struků jednorázovou utěrkou napuštěnou dezinfekčním roztokem. První odstříky mléka byly separovány a následovala dezinfekce hrotu struku lihovou utěrkou. Odběr prvních stříků mléka pro vyšetření přítomnosti mastitidních bakterií, počtu stafylokoků a CPM probíhal do sterilních vzorkovnic. Dále byl proveden celkový nádoj a vzorek mléka byl homogenně promíchán. Následně byly stanoveny celkové počty somatických buněk (PSB) s využitím měřiče somatických buněk (DeLaval Cell Counter, Švédsko). Po odběru byly vzorky zchlazeny na teplotu 4 až 6 °C a neprodleně předány k analýze. Vzorky na stanovení mikrobiologické kvality mléka byly dopraveny do mikrobiologické laboratoře VÚM (Výzkumný ústav mlékárenský) a do veterinární laboratoře VEDIA s.r.o. ve Strakonících.

Další části vzorků určené pro stanovení ostatních sledovaných parametrů, homogenně získané z celého nádoje koziho mléka, byly předány do chemické laboratoře VÚM a laboratoří Katedry chemie, Katedry chovu hospodářských zvířat a Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze.

Během roku 2020 bylo na jedné farmě v průběhu 4 odběrů celkem odebráno 120 individuálních vzorků koziho mléka. Do těchto odběrů byla zařazena zvířata na 2. a 5. laktaci, a to v červnu, červenci a dvou po sobě jdoucích odběrech v srpnu. Více než polovina těchto vzorků (68) pocházela od zvířat na 2. a 3. laktaci. Celkem 34 vzorků individuálního koziho mléka bylo získáno v termínu 18. až 25. 8. 2020. Jednalo se o mléka z ručního nádoje. Všechna zvířata zařazená do experimentu měla termín porodu mezi 7. 3. a 27. 3. 2020 a byla na 2. případně 3. laktaci.

V roce 2021 bylo v rámci dvou odběrů (28. 6. a 30. 6.) získáno 58 vzorků individuálního koziho mléka od zvířat na 2. laktaci s porody v březnu v krátkém časovém intervalu (od 8. 2. do 21. 2. 2021). Z důvodu minimalizace vlivu fáze a pořadí laktace na studované parametry bylo důkladnější analýze bylo podrobena 34 vzorků.

Za rok 2022 bylo získáno 58 individuálních vzorků mléka ve dvou po sobě následujících odběrech (20. 6. a 22. 6. 2022), od zvířat na 2. laktaci s porody v březnu v krátkém časovém intervalu (od 11. 3. do 30. 3. 2022), z nichž bylo vybráno 39 vzorků z důvodu odstranění vlivu fáze a pořadí laktace na studované parametry.

V rámci navrhnutého konceptu výzkumu byl kladen důraz na minimalizaci nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících PSB, mezi něž v případě koziho mléka patří zejména faktory neinfekční povahy jako je fáze a pořadí laktace, doba mezi dojeními, způsob dojení, hygiena mléčné žlázy, vliv plemenné příslušnosti apod.

4.3. Chemické analýzy

4.3.1. Základní laboratorní přístroje

- Analytická digitální váha (Kern 770, 4 desetinná místa)
- Analytická digitální váha (Ohaus, Explorer semi-micro balances, USA)
- Centrifuga (Univerzal 320 R, typ 1406, Hettich, Německo)
- Centrifuga (Univerzal, typ 1420, Hettich, Německo)
- Centrifuga Eppendorf 5810 R (Merci s. r. o., Německo)
- Magnetické míchadlo (IKA, Německo)
- Mikrovlnný rozkladný systém (Multiwave Reaction System, Multiwave PRO, USA)

- Millipore zásobník na demineralizovanou vodu (18 $\mu\Omega$, Merck Millipore, Německo)
- pH metr (Schott, Německo)
- Ultrazvuková lázeň PS 04000 (Notus-Powersonic s. r. o. VRABLE; SK)
- Vortex (BioCote, UK)
- běžné laboratorní sklo a spotřební materiál

4.3.2. Stanovení základního složení mléka

Stanovení obsahu tuku, bílkovin, laktózy, kaseinu, tukuprosté a celkové sušiny bylo uskutečněno s využitím přístroje DairySpec FT (Bentley Instruments, Inc.), který byl kalibrován na vzorky kozího mléka pomocí ověřených referenčních metod (tuk - ČSN EN ISO 1211, bílkoviny - ČSN EN ISO 8968-1, kasein ČSN ISO 17997-1, laktóza - IDF 79-2, tukuprostá a celková sušina - ČSN ISO 6731).

4.3.3. Stanovení celkového počtu somatických buněk

Celkový počet somatických buněk byl u jednotlivých vzorků mléka stanoven neprodleně po odběru syrového mléka pomocí přístroje DeLaval Cell Counter (DeLaval, Švédsko). Tento přístup byl rovněž ověřen průtokovým cytometrem.

4.3.4. Stanovení diferenciálního počtu somatických buněk

4.3.4.1. Princip metody

Metoda průtokové cytometrie je považována za fluorescenční nepřímou metodu k analýze somatických buněk (Malik et al. 2018) a získávání informací o jejich fyziologickém stavu (Albenzio & Caroprese 2011). Barvením a aplikací specifických protilátek lze rozlišit jednotlivé typy somatických buněk (Li et al. 2014), mezi nimiž jsou sledovány zejména makrofágy, PMN a různé podtypy lymfocytů (Albenzio & Caroprese 2011; Schwarz et al. 2011). Některé studie navíc charakterizují lymfocyty pomocí určitých parametrů tzv. FSC (forward Scatter), jakožto přední rozptyl a SSC (Side Scatter), tedy boční rozptyl, díky čemuž je možné měřit záznam intenzity signálu (Li et al. 2015; Schwarz et al. 2011). Intenzita paprsků FSC je přímo úměrná velikosti buňky, intenzita paprsků SSC odráží vnitřní komplexitu buněk a je úměrná granularitě buňky (Mehne et al. 2010). Lymfocyty vykazují typické chování, proto je snadné je velmi dobře odlišit, např. nemají jádro (Li et al. 2015).

4.3.4.2. *Použité chemikálie*

- Fosfátový pufr (PSB), pH 7,4 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Barvivo Zombie NIR (BioLegend, USA)
- Barvivo Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Protilátka anti CD 18 (BIO-RAD spol. s.r.o., USA)
- Protilátka anti CD 11b (BioLegend, USA)
- Protilátka anti CD 14 (BioLegend, USA)
- Sekundární protilátka (BIO-RAD spol. s.r.o., USA)

4.3.4.3. *Příprava vzorků*

Izolace somatických buněk z mléka a základní příprava vzorku, včetně barvení a aplikace protilátek, vychází z publikace (Li et al. 2015), jež byla upravena a vhodně optimalizována pro kozí mléko.

Vzorek mléka (100 ml) byl promíchán a převeden do centrifugačních zkumavek. Pro získání samostatné pelety buněk je nutné vzorek mléka podrobit centrifugaci (200 rpm, 20 min, 4 °C, bez centrifugační brzdy). Po odstředění mléka byl manuálně oddělen tuk i supernatant a ze dna zkumavky opatrně odebrán pelet buněk. Poté byla suspenze buněk dvakrát odstředěna, tj. promyta s 30 ml fyziologického roztoku, pro zajištění co největší čistoty vzorku (450 rpm, 10 min, 4 °C, s centrifugační brzdou). Část suspenze buněk byla odebrána do zkumavek a následně proběhla aplikace barviv a specifických protilátek viz níže.

4.3.4.3.1. *Schéma aplikace specifických barviv a protilátek:*

- Vyloučit částice nebuněčného původu pomocí Hoechst 33342 barviva, protože buňky obsahující DNA budou Hoechst 33342+ (pozitivní),
- Vyloučit mrtvé buňky pomocí Zombie barviva, živé jsou Zombie- (negativní),
- pomocí kombinace Hoechst+/Zombie-/CD18-, stanovit živé epiteliální buňky,
- Hoechst+/Zombie-/CD18+ pro mrtvé epiteliální buňky,
- Hoechst+/Zombie-/CD18+ /SSC and FSC „typické parametry rozptylu“ určující veškeré živé lymfocyty,
- Hoechst+/Zombie-/CD18+/CD14+ slabě pozitivní/CD11b+ stanovující PMN a
- Hoechst+/Zombie-/CD18+/CD14+ vysoce pozitivní/CD11b+ značí přítomnost makrofágů.

4.3.4.4. Měření pomocí průtokové cytometrie

Po uplynutí doby inkubace byl vzorek důkladně promyt a suspenze přenesena na vzorkovací destičku (Gama Group a.s., Česká republika) průtokového cytometru (NovoCyt, model iQue, IntelliCyt Corporation, USA) a poté byla za použití softwaru (NovoExpress 1.3.0) provedena samotná analýza.

Identifikace subpopulací byla upravena a převzata dle protokolu uvedeném v práci (Schwarz et al., 2011).

4.3.5. Stanovení kaseinových bílkovin

a. Příprava vzorků

Přibližně 10 ml syrového mléka bylo odstředěno na centrifuze Eppendorf 5810R (12 000 rpm, 10 min, 4 °C). Poté bylo odstředěné mléko ponecháno 5 minut v mrazicím boxu (-20 °C) a následně odebráno mléčné sérum, tzv. supernatant. K 0,5 ml mléčného séra byly přidány 2 ml pufru (6M guanidin-HCl, 20mM dithiothreitol a 5mM citran sodný) a 7,5 ml deionizované vody.

Dále byly vzorky krátce promíchány na vířivé míchačce a ponechány 1 hodinu inkubovat.

Následně byly vzorky přefiltrovány přes membránový mikrofiltr (acetát celulózy; 0,45 μm) do skleněných HPLC vialek a analyzovány pomocí HPLC (Waters e2695, Waters Corporation, USA) s DAD (996, Waters Corporation, USA) dle metodiky Bordina et al. (2001), která byla pro tuto práci vhodně modifikována.

b. Chemikálie

- Kyselina trifluoroctová (≥ 99 % ReagentPlus®, Merck, Německo)
- Citran sodný (≥ 99 %, Sigma-Aldrich, USA)
- Dithiotreitol (BioUltra, p.a, Lach-Ner, s. r. o., ČR)
- Guanidin hydrochlorid (≥ 99,5 %, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Acetonitril (HPLC grade, Lach-Ner, s. r. o., ČR)
- Methanol (HPLC grade, Lach-Ner, s. r. o., ČR)

c. Standardy

- α-CN (lyof. prášek, ≥ 70 %, Sigma-Aldrich, USA)
- β-CN (lyof. prášek, BioUltra, ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, USA)
- κ-CN (lyof. prášek, ≥ 70 %, Sigma-Aldrich, USA)

d. Chromatografické podmínky stanovení

- Mobilní fáze B: H₂O: acetonitril (90:10), (v/v) s 0,1 % TFA
- Mobilní fáze C: H₂O: acetonitril (10:90), (v/v) s 0,1 % TFA
- Typ eluce: gradient
- Průtok: 0,25 ml. min⁻¹
- Teplota kolony: 40 °C
- Objem nástřiku: 20 µl
- Doba analýzy: 71 min
- Detekce: DAD, 218 nm
- Kolona: bioZenTM C4, 3,6 µm, 150 x 4,6 mm (Phenomenex, USA)

Pro zvolenou metodu analýzy kaseinových bílkovin byly pro vybrané kaseinové bílkoviny stanoveny validační parametry, které jsou uvedeny v Tabulce 4. Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly vypočítány dle metodiky Q2B (International Conference on Harmonization 1996).

Tabulka 4. Validační údaje.

	α _{S1} -kasein	α _{S1} -kasein	β-kasein	κ-kasein
LOD (µg/ml)	2,2	20,8	160,5	3,1
LOQ (µg/ml)	8,6	64,9	526,8	9,8
Kalibrační body	6	6	7	6
Kalibrační typ	lineární	lineární	lineární	lineární
Rovnice regrese	$y = 8,43 \times 10^4 x$	$y = 1,65 \times 10^4 x$	$y = 3,61 \times 10^4 x$	$y = 3,49 \times 10^4 x$
Koeficient determinace R ²	0,994	0,993	0,998	0,993
Pracovní rozsah	8,6–245	64,9–540,8	526,8–2633,8	9,8–280
Výtěžnost (%; n = 6)	90	86	95	92
Opakovatelnost (%; n = 6)	5	6	3	4

LOD – limit detekce; LOQ – limit kvantifikace

4.3.6. Stanovení minerálních látek

Chloridové ionty v mléce byly stanoveny pomocí titrační argentometrické metody popsané v ČSN 57 0530. Metodou ICP-OES/MS byl stanoven obsah vybraných minerálních látek (zejména Na, K a Ca) dle postupu popsáno níže.

a. Příprava vzorků

Pro stanovení minerálních látek je třeba provést mikrovlnný rozklad vzorku. Přibližně 0,25 g lyofilizovaného a homogenizovaného vzorku bylo naváženo přímo do teflonových váženek. K navážkám byla přidána směs dusičné a chloristé kyseliny (7:1). Vzorek byl po mikrovlnném rozkladu (Multiwave PRO, USA) zředěn dusičnou kyselinou (2 %) a analyzován pomocí ICP-OES (Agilent 720, Agilent Technologies Inc., USA/ DUO iCap 7000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

b. Použité chemikálie:

- Kyselina dusičná (p.a., Lach-Ner, s. r. o., ČR)
- Kyselina chloristá (p.a., Lach-Ner, s. r. o., ČR)
- Referenční materiál (Skim milk powder, Merck, Německo)

4.4. Hodnocení mikrobiální kvality mléka

4.4.1. Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Celkové počty mikroorganismů (CPM) byly stanoveny dle ČSN EN ISO 4833-1 (rozdělení na alkaligenní a kyselinotvorné mikroorganismy bylo uskutečněno na agarové živné půdě GTK-AB). Stanovení celkového počtu stafylokoků bylo realizováno na agaru *Staphylococcus* (Sigma-Aldrich).

4.4.2. Identifikace patogenních mikroorganismů

Identifikace základních patogenních bakterií je popsána v práci (Podhorecká et al. 2021). V posledním roce výzkumu (2022) byla mikrobiologická sekce rozšířena o spolupráci s KMVD (ČZU), kde proběhly další testy týkající se identifikace potenciálních patogenů. Pro analýzy vzorků byla použita 3 kulturační média, a to TBX agar (37 °C, aerobní podmínky) pro stanovení *E. Coli* a dalších koliformních bakterií.

Dále MacConkey agar (37 °C, aerobní podmínky) vhodný pro stanovení gramnegativních tyčinek, zejména z čeledi Enterobacteriaceae a *Pseudomonas* spp. a TSA (30 °C, anaerobně) pro detekci potenciálně přítomných spor ve vzorku.

Dále byla ze všech narostlých kolonií, zejména stafylokoků provedena identifikace metodou EDT pomocí MALDI-TOF/MS. Metodika vychází z publikace (Modráčková et al. 2021). Pro identifikace stafylokoků byly použity čerstvě narostlé izolované kolonie bakterií (na základě variability kultivačních znaků) na Baird-Parker agaru (Oxoid, United Kingdom) a Staphylococcus agaru (Sigma-Aldrich, USA). Po přenosu biomasy na Maldi destičku byla pro extrakci použita 70% mravenčí kyselina. Po jejím zaschnutí byl vzorek překryt HCCA matricí. Takto připravené vzorky byly následně měřeny pomocí Maldi-TOF/MS (Bruker Biotyper) s využitím Bruker Biotyper software.

4.5. Základní technologické zkoušky

Syřitelnost lze stanovit jako časový interval od přidání syřidla do objevení prvních vloček srážejícího se kaseinu podle postupu popsaného ve studii Desobry-Banon et al. (1994). Termostabilita byla prověřena podle modifikovaného postupu Robitaille & Ayers (1995) detailně uvedeného v publikaci (Podhorecká et al. 2021). K provedení kysací zkoušky bylo vzato 50 ml pasterovaného mléka (85 °C, 5 min) a sledováno prokysání přidáním 2 % jogurtové kultury (CCDM22) při 42 °C po dobu 3,5 hodiny. Titrační kyselost prokysaného vzorku mléka dle Soxhlet-Henkela (SH) je vyjádřena v ml hydroxidu sodného (0,25 M) spotřebovaného při titraci 100 ml mléka s indikátorem fenolftaleinem (dle ČSN 57 0530). Pomocí kalibrovaného pH metru (sensION+ pH1, Hach, Česká republika) je stanoveno pH jednotlivých vzorků.

4.6. Statistické zhodnocení naměřených dat

Statistická analýza byla provedena v programu Statistica verze 13.1 (14) (Statsoft). Z důvodu charakteru dat, byla zvolena ke stanovení významnosti rozdílů středních hodnot Kruskal-Wallisova ANOVA pro nezávislá měření, případně neparametrický Mann-Whitney U test. Podrobnější vyhodnocení dat bylo potvrzeno vícerozměrným srovnávacím testem (Dunn's Multiple Comparison Test). K popisu jednotlivých parametrů této studie byly většinou zhodnoceny rozdíly pomocí mediánů, avšak pro lepší porovnání dat jsou v tabulkách uvedeny spíše průměry a směrodatné odchylky (SD). Použita byla hladina významnosti ($p < 0,05$), vyjma korelačních závislostí.

Pro vyhodnocení rozdílů mezi skupinami byla v případě splnění normality dat použita jednofaktorová ANOVA (Tuckey's Post-hoc Unequal N HSD test).

5. Výsledky a diskuze

Složení a kvalita koziho mléka je ovlivňována celou řadou vlivů působících během laktačního období, proto byl v rámci navrhnutého konceptu výzkumu kladen důraz na minimalizaci nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících počet somatických buněk (PSB), mezi něž v případě koziho mléka patří zejména faktory neinfekční povahy jako je fáze a pořadí laktace, doba mezi dojeními, způsob dojení, hygiena mléčné žlázy, vliv plemenné příslušnosti apod. Z těchto důvodů bylo pro daný výzkum zvoleno pouze jedno plemeno, a to tradiční mléčné plemeno Kozy bílé krátkosrsté chované ve stejném chovatelském prostředí na území České republiky. Jedinečnost celého výzkumu je postavena zejména na analýzách individuálních vzorků mléka oproti odběrům směsných (tankových) vzorků mlék či datům pocházejícím z kontroly užítkovosti, čímž bylo ošetřeno podchycení dalších rizikových faktorů, které by mohly získané výsledky zkreslovat.

V rámci let 2020–2022 bylo provedeno několik odběrů mléka za účelem získání širokého souboru individuálních vzorků dle postupu uvedeného v kapitole ce které byly podrobeny jednotlivým analýzám. Kromě základního chemického složení mléka, zahrnujícího např. obsah tuku, bílkovin, kaseinů, laktózy, sušiny aj., byla u všech odebraných vzorků zhodnocena mikrobiologická kvalita mléka, především celkový počet mikroorganismů (CPM), počet stafylokoků, příp. detekce mastitidních mikroorganismů. Tyto základní parametry byly dále rozšířeny o stanovení minerálních látek a jednotlivých bílkovinných frakcí a rovněž provedení vybraných technologických zkoušek.

Hlavním sledovaným parametrem, který propojuje celý výzkum jsou somatické buňky. V rámci každého odběru byl stanoven počet somatických buněk (PSB) u individuálních vzorků mléka a následně zhodnocen vliv těchto hodnot na zkoumané parametry. Ačkoli nepanuje v odborných studiích shoda ohledně jednoznačného využití tohoto parametru jakožto diagnostického kritéria, stejně jako u krav, je ze získaných výsledků zřejmé, že se může jednat o klíčový indikátor kvality mléka.

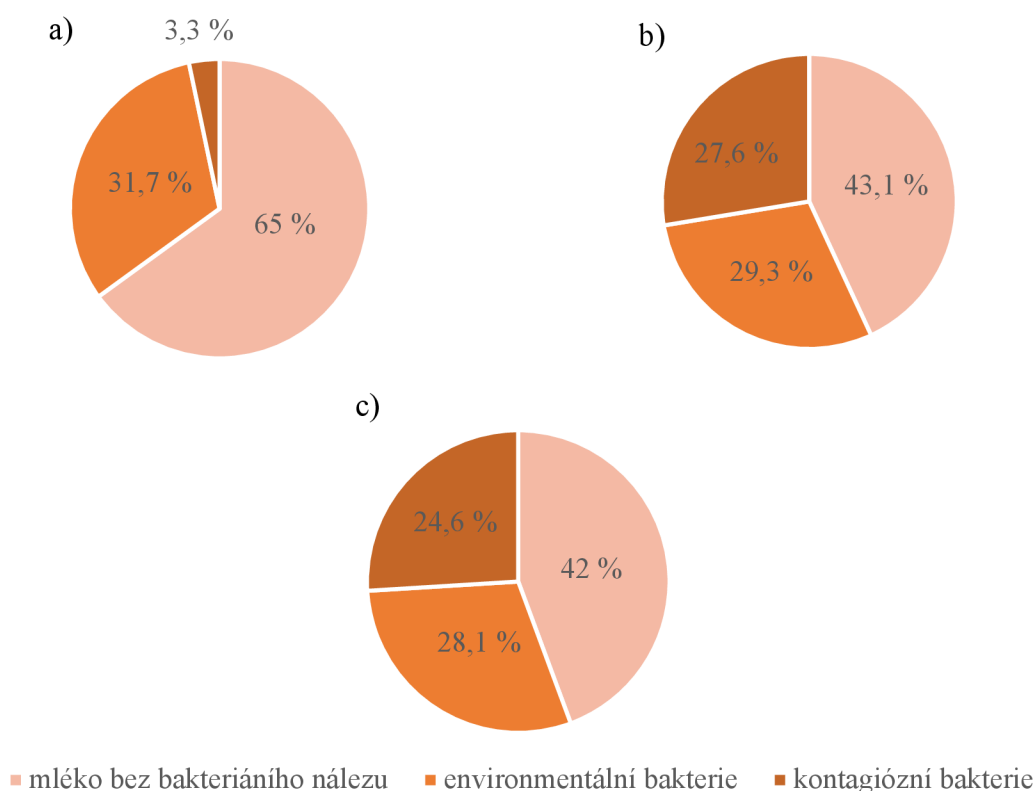
V roce 2022 se podařilo posunout studium somatických buněk a objasnit zastoupení individuálních buněčných populací, které mohou pomoci lepšímu porozumění imunitní reakce mléčné žlázy a souvislostí se změnami kvalitativních parametrů mléka. Byla zavedena a optimalizována metoda pro stanovení diferenciálního počtu somatických buněk pomocí průtokové cytometrie.

5.1. Zhodnocení mikrobiologické kvality kozího mléka

Získané individuální vzorky mléka, případně vzorky bazénové, byly podrobeny mikrobiologickým rozborům. V první řadě byly zhodnoceny rozdíly v celkových počtech mikroorganismů (CPM), se zaměřením na přítomnost stafylokoků. Dále byla provedena detekce základních mastitidních mikroorganismů.

V rámci získaného souboru vzorků v roce 2020 ($n = 120$) byl vyhodnocen výskyt mastitidních bakterií během celého sledovaného období. Potvrdilo se, že v roce 2020 bylo 65 % vzorků bez nálezu mastitidních bakterií, zatímco environmentální bakterie byly diagnostikovány v 31,7 % a kontagiózní v 3,3 % případech viz Graf 2a. Oproti předchozímu roku byl v roce 2021 ($n = 58$) pozorován celkový pokles vzorků mlék bez bakteriálního nálezu, a to téměř o 32,2 %, zatímco nárůst kontagiózních bakterií byl velmi výrazný a představoval 27,6 % (Graf 2b). Graf 2c znázorňuje údaje získané v roce 2022 ($n = 57$), kde vzorky bez bakteriálního nálezu představovaly 42 % z celkového počtu odebraných vzorků. Dominantní skupinou bakterií v rámci celého sledovaného období byly jednoznačně bakterie environmentální, jejichž přítomnost byla detekována v rozmezí 28,1 až 31,7 % případů. Tento výsledek je v souladu s celou řadou studií (Bagnicka et al. 2011; Contreras et al. 2007; Sharma et al. 2011).

Graf 2. Přítomnost bakterií ve všech individuálních vzorcích mléka za celé sledované období: a) 2020, b) 2021, c) 2022.



Kvalitu a složení koziho mléka může ovlivňovat mnoho faktorů, např. vliv plemenné příslušnosti, krmení, stádia a pořadí laktace i celkový zdravotní stav (Ceballos et al. 2009; Goetsch et al. 2011). Výrazné rozdíly v kvalitě může zapříčinit i přítomnost patogenních mikroorganismů (Leitner et al. 2004).

Bakteriologické vyšetření spolu s mikrobiální identifikací je považováno za zlatý standard diagnostiky intramamárních infekcí (IMI) u koz (Paterna et al. 2014), avšak tento způsob vykazuje jak finanční, tak časovou náročnost při samotné léčbě mastitidy a není tak relevantní pro praktické využití (Hussein et al. 2020).

5.1.1. Mikrobiologická kvalita v roce 2020

Vzhledem k uvedeným faktorům byla mikrobiologická kvalita mléka zhodnocena u vybraných zvířat dle podobné fáze a pořadí laktace, čímž byl minimalizován vliv těchto faktorů. Jelikož v roce 2020 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl pro sledované parametry mezi individuálními vzorky mlék získaných od koz na 2. a 3. laktaci (termín porodů byl březen 2020), byla data vyhodnocována společně. Stejně tak (Zamuner et al. 2020) neshledával rozdílné výsledky ve sledovaných parametrech u zvířat na 2. a 3. laktaci. Ve sledovaném stádu byla mapována situace s výskytem nálezů mastitidních bakterií ve sterilně odebraném mléce k posouzení stavu mléčné žlázy. Při studiu souvislostí mezi PSB a kvalitou koziho mléka je tento faktor většinou úplně opomíjen. Tabulka 5 znázorňuje míru bakteriální zátěže jednotlivých mlék zařazených dle odběru vzorku ($n = 68$) v roce 2020. Je zřejmé, že fáze laktace má v tomto případě minimální vliv na přítomnost patogenů. V průběhu čtyř uskutečněných odběrů byly pozorovány pouze minimální rozdíly v počtu vzorků bez bakteriálního nálezu (58,8–62,5 %). Podobného výsledku dosáhla i studie (Bagnicka et al. 2011), která prezentuje, že v 64,9 % případů nebyl potvrzen záchyt patogenních mikroorganismů.

Tabulka 5. Mikrobiologická kvalita vzorků mléka od koz na 2. a 3. laktaci v roce 2020.

datum odběru	bez bakteriálního nálezu		environmentální bakterie		kontagiozní bakterie	
	n	%	n	%	n	%
16. 6.	10	62,5	5	31,3	1	6,25
14. 7.	11	61,1	6	33,3	1	5,55
18. 8.	10	58,8	6	35,3	1	5,88
25. 8.	10	58,8	6	35,3	1	5,88
($n = 68$)	41	60,3 ^x	23	33,8 ^x	4	5,89 ^x

n – počet případů výběrového souboru dat; x – průměr

Oproti tomu Hussein et al. (2020) uváděl pouze 26,41 % negativních případů. V rámci jednotlivých odběrů vzorků dominovaly jednoznačně bakterie pocházející z prostředí, tedy environmentální (33,8 %). Tento výsledek je opět v souladu s výše uvedenými autory (Contreras et al. 2007; Bagnicka et al. 2011; Sharma et al. 2011)

Záchyt kontagiózních bakterií byl ve vybraném souboru dat o 44 % vyšší oproti průměrné hodnotě celého základního souboru (3,3 %), přesto představovaly maximálně 6,25 % jak znázorňuje Tabulka 5.

Mikrobiologická kvalita bazénových vzorků mléka byla stanovena v rámci srpnových odběrů. Byl potvrzen nález stejných patogenů jako v případě individuálních vzorků mléka, tj. *Staphylococcus* PK- (hemolyzin negativní i pozitivní) a *Staphylococcus aureus*, a vyjma toho byl navíc detekován *Streptococcus uberis*.

Celkový počet mikroorganismů (CPM) byl v bazénových vzorcích $1,3 \times 10^3$, resp. $1,1 \times 10^3$ KTJ/ml, z čehož počet stafylokoků představoval $3,6 \times 10^3$ resp. $1,0 \times 10^3$ KTJ/ml. Přesto analyzované vzorky mléka splňovaly legislativní požadavky stanovené Vyhláškou č. 445/2017 Sb. V rámci souhrnné studie (Verraes et al. 2014) lze pozorovat, že CPM v kozím mléce se běžně pohybuje v rozmezí $1,58 \times 10^2$ – $3,98 \times 10^7$ KTJ/ml mléka. Například ve studii Vacca et al. (2018) je uvedena průměrná hodnota 5×10^4 KTJ/ml. Z uvedených výsledků lze konstatovat, že legislativní požadavky pro mikrobiologickou kvalitu mléka jsou relativně benevolentní. Přípustná limitní hodnota daná legislativou je pro CPM $1,5 \times 10^7$ KTJ/ml v případě tepelně ošetřeného mléka, pro syrové kozí mléko je tato hodnota pouze 5×10^5 KTJ/ml (Vyhláška 447/2017 Sb.).

Nejčastěji diagnostikovaným bakteriálním patogenem byl ve sledované skupině vzorků *Staphylococcus* PK- (delta hemolyzin-), ojediněle pak *Staphylococcus* PK- (delta hemolyzin+) a *Staphylococcus aureus*. Dle studií (Leitner et al. 2007; Bagnicka et al. 2011) je zřejmé, že přítomnost koaguláza negativních stafylokoků (CNS) neboli PK-, nemusí vždy znamenat nárůst počtu somatických buněk (PSB), nicméně jiná situace nastává v případě výskytu bakterie *Staphylococcus aureus* patřící mezi *Staphylococcus* PK+, jejíž přítomnost v mléce je typická zvýšenými hodnotami PSB. U zvířat na vyšší než 2. a 3. laktaci byly navíc detekovány koliformní bakterie a streptokoky. Koess & Hamann (2008) uvádějí, že v rámci studie zabývající se kozím mlékem rovněž identifikovali koaguláza negativní stafylokoky (CNS), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* a *uberis* nebo *Corynebacterium* spp.

Hussein et al. (2020) dále potvrzuje, že nejvíce dominujícími patogeny byly opět CNS, představující 58,75 % všech stanovených patogenů, dále *Staphylococcus aureus*, a to až v 24,38 % případech a v nižším počtu byly detekovány rovněž zástupci rodu *Streptococcus* spp.

Nicméně ve většině případů s pozitivním nálezem mastitidních bakterií byl přítomen vždy pouze jeden patogen. Vzhledem k vysokým teplotám a zvýšené vlhkosti vzduchu v tomto roce (2020) je pozitivním zjištěním závěr, že v průběhu letního období prakticky nedošlo k navýšení záhytu mastitidních bakterií, vzhledem k podmínkám prostředí. Z výsledků je patrné, že nebyla zjištěna závažná bakteriální kolonizace mléčné žlázy a jednalo se o mléka velmi dobré hygienické kvality.

5.1.2. Mikrobiologická kvalita v roce 2021

V průběhu dvou po sobě následujících odběrů (28. 6. a 30. 6. 2021), bylo získáno celkem 58 vzorků individuálního koziho mléka od zvířat na 2. laktaci s porody v krátkém časovém intervalu (od 8. 2. do 21. 2. 2021). Důvodem bylo odstranění vlivu fáze a pořadí laktace na studované parametry.

Pro posouzení hygienické kvality koziho mléka sledovaného stáda byla vyhodnocena celá skupina získaných vzorků. Tabulka 6 shrnuje získané hodnoty CPM za tento rok (2021). Stanovené hodnoty se pohybovaly v rozmezí od limitu detekce (<4 KTJ/ml) do 93×10^3 KTJ/ml. Hodnota CPM představovala v průměru pouze 2×10^3 KTJ/ml ($m = 100$ KTJ/ml), což je plně v souladu s legislativními předpisy a vypovídá to o velmi dobré hygienické úrovni ve stádě. Bogdanovičová et al. (2016) se zabývala mikrobiologickou kvalitou syrového mléka v ČR a uvádí průměrnou hodnotu CPM pro kozi mléko $5,7 \times 10^5$ KTJ/ml v rozmezí hodnot $9,3 \times 10^2$ – $1,2 \times 10^9$ KTJ/ml. CPM je běžně využívaným parametrem ke sledování hygieny ve stádech dojných koz a kvality mléka jakožto vstupní suroviny pro výrobu sýrů (Pirisi et al. 2007).

Tabulka 6. Mikrobiologická kvalita individuálních vzorků koziho mléka v roce 2021.

KTJ/ml	n	\bar{x}	m	min	max	SD
kyselintvorné MO	58	1406	86	<1,0	56×10^3	$7,4 \times 10^3$
alkaligenní MO	58	735	20	<1,0	37×10^3	$4,9 \times 10^3$
CPM	58	2135	100	<4,0	93×10^3	$12,2 \times 10^3$
stafylokoky	58	189	17	<4,0	$6,4 \times 10^3$	$0,8 \times 10^3$

n – počet případů souboru dat; \bar{x} – průměr; m – medián; SD – směrodatná odchylka; MO – mikroorganismy; CPM – celkový počet mikroorganismů; KTJ – kolonie tvořící jednotky; min – minimum, max – maximum

V roce 2021 byl u vzorků mléka detekován *Staphylococcus* PK- (delta hemolyzin-), *Staphylococcus* PK- (delta hemolyzin+), *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* sp., *Corynebacterium* spp., *Streptococcus parauberis*, *Enterococcus* sp. a *Aerococcus viridans*. Tyto patogeny byly potvrzeny i v dalších studiích zaměřených na kvalitu koziho mléka (Bagnicka et al. 2011; Bogdanovičová et al. 2016).

5.1.3. Mikrobiologická kvalita v roce 2022

V roce 2022 byla vybrána individuální zvířata v podobné fázi a pořadí laktace, bez zjevných zdravotních obtíží. Byl proveden základní mikrobiologický rozbor, podobně jako v předchozích letech. Přesto, že průměrné hodnoty CPM (znázorněno v Tabulce 7) jsou velmi nízké ($3,9 \times 10^3$ KTJ/ml) s mediánem 160 KTJ/ml, byla detekována celá řada patogenních mikroorganismů se zaměřením na stafylokoky.

Tabulka 7. Mikrobiologická kvalita individuálních vzorků kozího mléka v roce 2022.

KTJ/ml	n	\bar{x}	m	min	max	SD
kyselinotvorné MO	49	1725	80	4	30×10^3	$6,1 \times 10^3$
alkaligenní MO	51	2486	82	40	120×10^3	$16,8 \times 10^3$
CPM	54	3859	160	10	150×10^3	$20,8 \times 10^3$
stafylokoky	54	308	18	1	$8,4 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$

n – počet případů souboru dat, \bar{x} – průměr; m – medián; SD – směrodatná odchylka, MO – mikroorganismy, CPM – celkový počet mikroorganismů, KTJ – kolonie tvořící jednotky, min – minimum, max – maximum

Nejrozšířenějším detekovaným patogenem byl opět *Staphylococcus* PK- (delta hemolyzin-), *Staphylococcus* PK- (delta hemolyzin+), dále byl potvrzen záchyt rodu *Corynebacterium* spp. V několika případech byl potvrzen výskyt *Escherichia coli* a *Enterococcus* spp. Bogdanovičová et al. (2016) dospěli k závěru, že výskyt *E. Coli* byl v mléce malých přežvýkavců dvojnásobně vyšší (1×10^1 – $1,6 \times 10^6$ KTJ/ml) než v mléce kravském (1×10^1 – 2×10^3 KTJ/ml). Studie dále uvádí, že v současné době neexistují legislativní limity pro čeledi Enterobacteriaceae a enterokoky, přičemž obě skupiny bakterií lze považovat za indikátory hygienické kvality během prvovýroby mléka. Nicméně tato možnost by byla pravděpodobně časově i finančně relativně náročná. Předchozí výsledky, stejně jako některé studie potvrzují (Contreras et al. 2007; Hussein et al. 2020; Sharma et al. 2011), že nejrozšířenější skupinou patogenů u koz jsou různé druhy rodu *Staphylococcus* spp.

V roce 2022 se podařilo identifikovat jednotlivé druhy stafylokoků pomocí Maldi-TOF/MS (Autoflex Speed Bruker, USA), např. *Staphylococcus equorum*, *haemolyticus*, *caprae*, *xylosus*, *capitis*, *epidermis* aj. Ve dvou případech byl dokonce stanoven i *Staphylococcus aureus*. Silva Júnior et al. (2021) potvrzují podobné zastoupené jednotlivých druhů stafylokoků v kozím mléce a uvádí, že vysoká diverzita pozorovaná u rodu *Staphylococcus* spp. vykazuje fenotypovou rezistenci vůči různým antimikrobiálním látkám a vybízí k dalšímu zkoumání dopadu těchto bakterií jako rezervoárů genů antimikrobiální rezistence pro spotřebitele.

Lze konstatovat, že hodnoty CPM v průběhu let 2020–2022 splňovaly legislativní požadavky. Na druhou stranu bylo stanoveno relativně velké procento vzorků s výskytem bakterií v mléčné

žláze. Přesto byly rozdíly v zastoupení vzorků bez a s bakteriálním nálezem v rámci let relativně odlišné. Zejména v roce 2020 byl stanoven nejvyšší počet vzorků bez bakteriálního nálezu oproti následujícím rokům. Nicméně je nutné vzít v úvahu fakt, že odběry v roce 2021 i 2022 proběhly během měsíce června oproti širšímu intervalu odběrů v roce 2020 (červen až srpen) kdy bylo chladněji. Ovšem i přes nižší bakteriální nálezy v celé skupině, bylo detekováno poměrně dost případů. Jedná se tedy o důležitou problematiku chovatelského prostředí, kterému by měla být věnována dostatečná pozornost.

Nicméně vždy existuje riziko jejich pomnožení např. během procesu skladování, proto je třeba se tímto tématem zabývat, a to i s ohledem na vliv PSB. V rámci celého období se prokázal nejvýznamnější výskyt stafylokoků. Proto proběhla v roce 2022 jejich důkladnější identifikace.

5.2. Porovnání obsahu somatických buněk v kozím mléce

Pro zjednodušení interpretace výsledků a minimalizaci již zmíněných faktorů, které by mohly zkreslovat dané výstupy, byly k dalšímu vyhodnocení vybrány pouze kozy splňující námi stanovená kritéria, jako je podobné pořadí a fáze laktace, porody v úzkém termínu, stejné chovatelské prostředí aj. V řadě studií se autoři (Mahmoud et al. 2014; Zamuner et al. 2020) shodují, že tyto faktory významně ovlivňují kvalitu mléka.

V této kapitole bude implementován vliv mikrobiologického nálezu a společně s limitní hodnotou PSB zhodnocen vliv na chemické složení a technologické zkoušky mléka v průběhu daného výzkumu (2020–2022).

Průměrná hodnota PSB ve vzorcích kozího mléka získaných od koz na 2. a 3. laktaci s porody v březnu ($n = 68$) dosáhla v roce 2020 relativně vysokých hodnot, konkrétně $1322 \times 10^3/\text{ml}$. V rámci čtyř odběrů během probíhající laktace došlo rovněž ke stanovení průměrných hodnot PSB, a to $1255 \times 10^3/\text{ml}$ (1. odběr), $1273 \times 10^3/\text{ml}$ (2. odběr), 1250×10^3 (3. odběr) a $1509 \times 10^3/\text{ml}$ (4. odběr). Bogdanovičová et al. (2016) uvádí průměrné hodnoty PSB v kozím mléce $1,1 \times 10^6/\text{ml}$ s maximem až $6,8 \times 10^6/\text{ml}$, zatímco v mléce kravském se hodnoty pohybují v rozmezí $1,6 \times 10^4$ až $9,9 \times 10^5/\text{ml}$. Dle studie Bagnicka et al. (2011) lze očekávat hodnoty PSB vyšší než $1000 \times 10^3/\text{ml}$ v téměř 49 % případů vzorků zdravého kozího mléka, které nejsou zatíženy patogeny. Další studie vykazuje dle autorů 6,35 % vzorků bez přítomnosti patogenů blízcí se hodnotě PSB $1500 \times 10^3/\text{ml}$, 1,84 % $1500\text{--}2000 \times 10^3/\text{ml}$ a PSB vyššímu než $2000 \times 10^3/\text{ml}$ odpovídá téměř 7,79 % vzorků ze zdravé mléčné žlázy Hussein et al. (2020).

Bez ohledu na mikrobiologický nález je zřejmé, že s postupující laktací narůstá hodnota PSB. Zejména dva po sobě jdoucí srpnové odběry (3. a 4.) vykazovaly průměrně 1400×10^3 PSB v ml mléka. Tento nárůst PSB může být vysvětlen blízcím se koncem laktace, kdy dochází k přirozenému poklesu nádoje. Tuto domněnku potvrzuje celá řada autorů, jak u mléka kravského (Hagnestam-Nielsen et al. 2009; Hamed et al. 2012), kozího (Jimenez-Granado et al. 2014; Olechnowicz & Sobek 2008) tak i ovčího (Raynal-Ljutovac et al. 2007). Nicméně neinfekční faktory, jako je počet a stádium laktace, měly dle autorů (Paape et al. 2007; Mehdid et al. 2019) minimální vliv na PSB u krav a ovcí, ale oproti tomu zásadní vliv na PSB v případě koz.

Vzorky získané během jednotlivých odběrů byly rozděleny dle limitní hodnoty (PSB). V tomto případě byla nastavena hodnota PSB $1000 \times 10^3/\text{ml}$ (skupina $N < 1000 \times 10^3/\text{ml}$, skupina $V > 1000 \times 10^3/\text{ml}$). Tato hodnota se dle dostupné literatury (Alhussien & Dang 2018; Li et al. 2014) často označuje jako limit, značící zhoršující se kvalitu mléka a jeho technologickou

zpracovatelnost (Li et al. 2014). Oproti tomu v kravském mléce, kde je legislativní limit pevně stanoven, v zemích Evropské unie je tato hranice dána Nařízením (EP) a Rady (EU) č. 853/2004 a Vyhlášky č. 445/2017 Sb. a povoluje maximální hodnotu PSB $400 \times 10^3/\text{ml}$, nepanuje v současné době jednoznačný názor týkající se limitních hranic PSB v kozím mléce.

Přesto existují země, které mají tento limit legislativně nastaven nebo je součástí regulace v rámci různých dotačních programů či jen jako doporučující hodnoty pro farmáře i zpracovatele mléka.

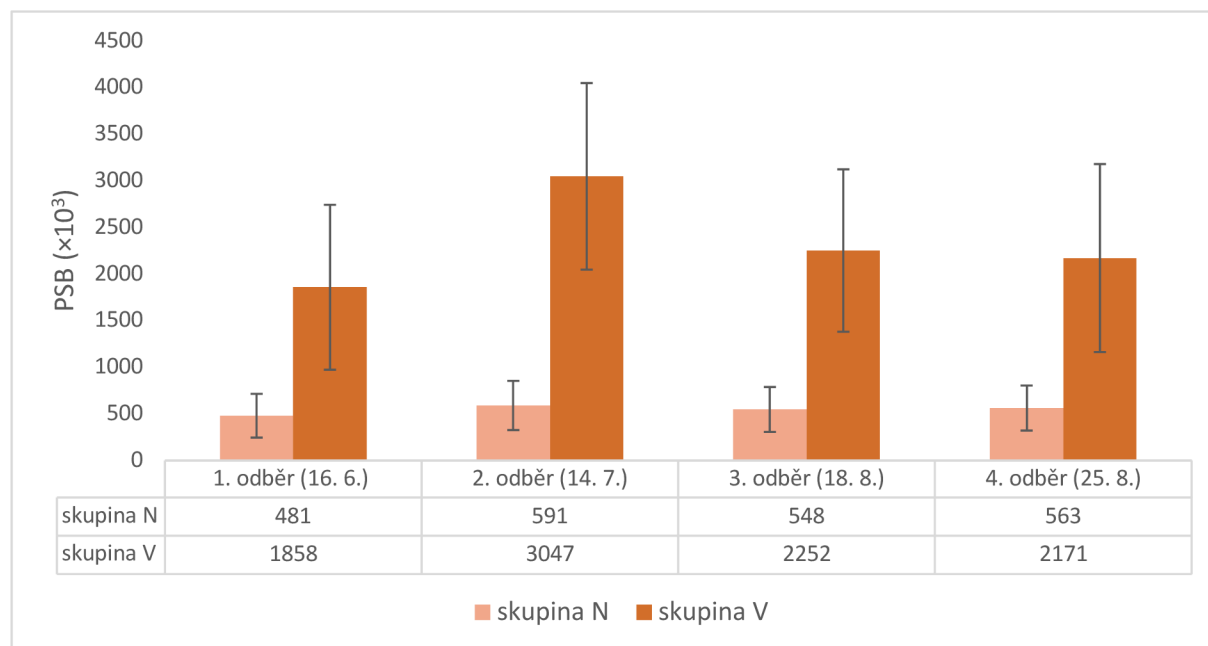
Například v USA byl limit PSB pro kozí mléko dokonce navýšen z původního limitu $1000 \times 10^3/\text{ml}$ na benevolentnější hodnotu $1500 \times 10^3/\text{ml}$ (FDA 2015). V rámci Evropské unie nebyly dosud nastavené žádné legislativní limity (Lianou et al. 2021; Moradi et al. 2021). Rozdílné hodnoty PSB, může mimo vyjma vlivu jiných faktorů, vysvětlovat zejména odlišný mechanismus laktogeneze a fyziologie mléčné žlázy koz, v porovnání s kravským mlékem, což znesnadňuje jednoznačně určit tyto limitní hodnoty (Novac & Andrei 2020).

Graf 3 znázorňuje rozdíly ve vzorcích mléka rozdělených dle limitní meze 1000×10^3 PSB v ml mléka při jednotlivých odběrech 2020. Vzorky 1. odběru byly z celkového počtu odebraných vzorků tvořeny z 43,8 % vzorky s hodnotami PSB pod stanovenou limitní hodnotu. U vzorků získaných v rámci 2. odběru došlo k výraznému nárůstu vzorků (72,2 %) ve skupině N ($< 1000 \times 10^3/\text{ml}$), oproti tomu během 3. a 4. odběru byl pozorován nárůst vzorků (41,2 % resp. 59 %) zařazených do skupiny V ($> 1000 \times 10^3/\text{ml}$).

Průměrné hodnoty PSB v jednotlivých skupinách (N a V) jsou uvedeny v Tabulce 8, z těchto hodnot vyplývá, že vzorky zařazené do skupiny N vykazovaly průměrné hodnoty PSB v rozmezí 481×10^3 – $591 \times 10^3/\text{ml}$, s maximem v případě 2. odběru, přičemž během stejného odběru byl oproti tomu jednoznačně stanoven nejvyšší průměr ve skupině V ($3047 \times 10^3/\text{ml}$), což je pravděpodobně dáno nižším počtem vzorků v porovnání s ostatními odběry s vyššími hodnotami PSB. Nejnižší průměrné hodnoty PSB ve skupině V ($1858 \times 10^3/\text{ml}$) byly stanoveny ve vzorcích z 1. odběru, kde skupina V dominovala z 56,2 %.

I přes minimální bakteriální nález je vysoký nejen průměr PSB za celé sledované období laktace, ale i počet vzorků zastoupených ve skupině nad limitní hodnotu PSB $1000 \times 10^3/\text{ml}$. Tento výstup byl považován za velmi důležitý, proto i další vývoj této práce směřoval k bližšímu zkoumání problematiky PSB.

Graf 3. Průměrné hodnoty PSB ($\times 10^3/\text{ml}$) ve vzorcích mléka rozdělených dle limitní hodnoty PSB (skupina N $< 1000 \times 10^3/\text{ml}$, skupina V $> 1000 \times 10^3/\text{ml}$) při jednotlivých odběrech.



Z Tabulky 8 je patrné, že nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v zastoupení CPM (log CPM) a stafylokoků (log stafyl.) mezi skupinami (N a V), průkazný rozdíl nebyl potvrzen dokonce ani mezi jednotlivými odběry. Zvýšené hodnoty PSB v mléce jsou prokazatelně způsobeny i dalšími faktory než jen přítomností sledovaných patogenních mikroorganismů, zejména těch mastitidních. Tento názor se slučuje s autory (Hussein et al. 2020), kde byly vzorky rovněž rozděleny dle limitu PSB $1000 \times 10^3/\text{ml}$. Nicméně v uvedené studii nebyl stanoven výrazný rozdíl v počtu vzorků mlék s bakteriálním nálezem (75,68 % ve skupině $\leq 1000 \times 10^3/\text{ml}$ a 65,85 % $\geq 1000 \times 10^3/\text{ml}$).

Z výsledků uvedených v Tabulce 8 je patrné, že nebyl prokázán rozdíl v CPM a počtu stafylokoků mezi skupinami. Oproti tomu v kravském mléce, na rozdíl od mléka kozího, způsobuje přítomnost patogenních bakterií prokazatelně zvýšené hodnoty PSB a tento parametr lze považovat za jednoznačný indikátor zdravotního stavu mléčné žlázy dojníc (Raynal-Ljutovac et al. 2007; Alhussien & Dang 2018; Gonçalves et al. 2018; Stocco et al. 2020). Někteří autoři se shodují, že v případě kravského mléka již hodnota PSB $200 \times 10^3/\text{ml}$ značí přítomnost infekce (Alhussien & Dang 2018; Mehdid et al. 2019). Zhoršená kvalita mléka byla zaznamenána dokonce ve vzorcích mléka obsahujících méně než 100×10^3 PSB v ml a lze předpokládat, že v mléce s přítomností PSB $400 \times 10^3/\text{ml}$ bude přibližně 40 % krav s potvrzeným zánětem mléčné žlázy (Musayeva et al. 2016).

Tabulka 8. Průměrné hodnoty PSB ($\times 10^3/\text{ml}$) ve vzorcích mléka rozdělených dle limitní hodnoty PSB při jednotlivých odběrech.

parametr	odběr	16. 6.		14. 7.		18. 8.		25. 8.	
		skupina	<i>x</i>	SD	<i>x</i>	SD	<i>x</i>	SD	<i>x</i>
PSB ($\times 10^3/\text{ml}$)	N	481	235	591	264	548	240	563	241
	V	1858	884	3047	1000	2252	871	2171	1008
log CPM (KTJ/ml)	N	2,35	1,16	2,39	0,92	2,06	1,08	1,92	0,76
	V	1,80	1,76	2,26	0,70	1,93	1,41	2,12	0,99
log stafyl. (KTJ/ml)	N	2,03	0,46	1,97	0,92	2,07	0,57	1,03	0,46
	V	2,05	0,99	1,45	0,77	1,78	0,90	1,64	0,75
n	N	7		13		10		7	
	V	9		5		7		10	

Hodnoty označené různými horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru dat; *x* – průměr; SD – směrodatná odchylka; PSB – počet somatických buněk; CPM – celkový počet mikroorganismů; KTJ – kolonie tvořící jednotky; log – logaritmus; N (PSB $< 1000 \times 10^3/\text{ml}$); V ($> 1000 \times 10^3/\text{ml}$);

Během let 2021–2022 byla rovněž provedena analýza počtu somatických buněk, výsledky jsou uvedeny jako průměr za celý odběr daného roku (Tabulka 9). Průměrný obsah PSB v rámci celého souboru dosahoval hodnoty $677 \times 10^3/\text{ml}$ s maximem $2754 \times 10^3/\text{ml}$ v případě roku 2021. V následujícím roce byl stanoven průměr dokonce $869 \times 10^3/\text{ml}$ s nejvyšší hodnotou $3728 \times 10^3/\text{ml}$, což se shoduje s rozsahem výsledků autorů, jejichž stanovené hodnoty PSB se pohybují v rozmezí 165×10^3 – 6452×10^3 PSB/ml s průměrem $2080 \times 10^3/\text{ml}$ kozího mléka (Leitner et al. 2016).

Hodnota PSB bazénového vzorku mléka v roce 2020 během srpnových odběrů odpovídala $986 \times 10^3/\text{ml}$ resp. $1230 \times 10^3/\text{ml}$. Stanovené hodnoty bazénového vzorku v roce 2021 a 2022 byly oproti tomu pouze $320 \times 10^3/\text{ml}$ resp. $183 \times 10^3/\text{ml}$. Nižší hodnoty PSB lze přičítat termínům odběrů (tedy červnu), kdy lze usuzovat, že se jedná o nižší hodnoty PSB z hlediska fáze laktace (uprostřed) oproti roku 2020, kdy vzorky pocházely spíše z období končící laktace (srpen).

Tabulka 9. Průměrné hodnoty PSB celého souboru roku 2021 a 2022.

rok		n	<i>x</i>	<i>m</i>	min	max	SD
2021	PSB	58	677	538	107	2754	563
2022	($\times 10^3/\text{ml}$)	57	869	644	91	3728	759

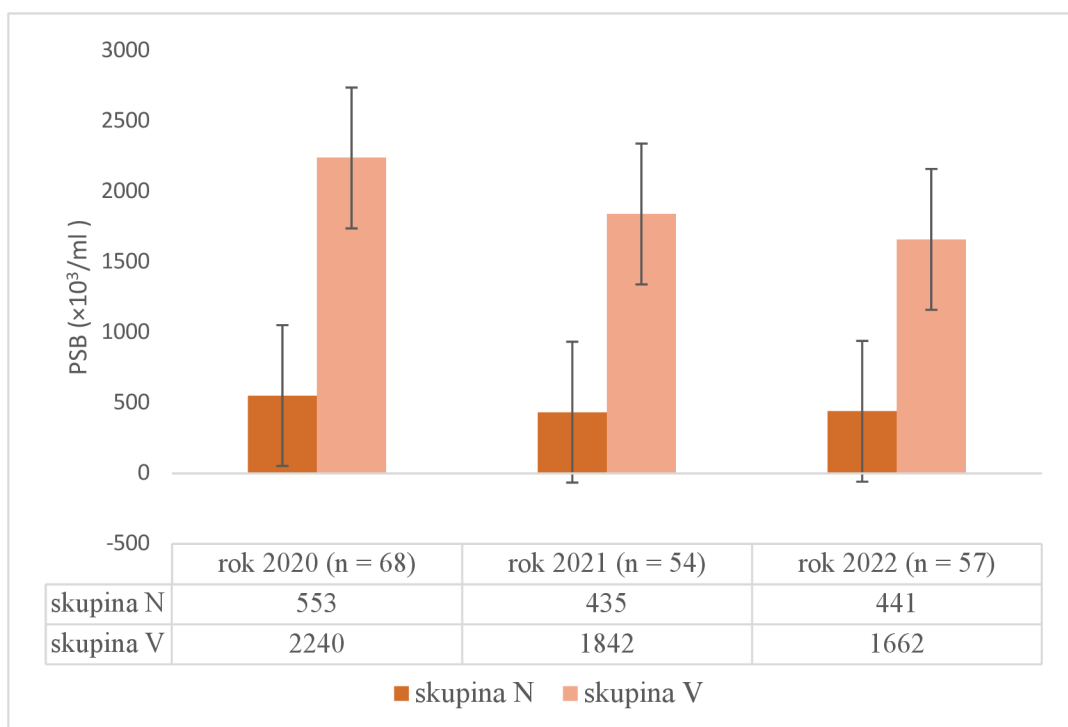
n – počet případů souboru dat; *x* – průměr; *m* = medián; SD – směrodatná odchylka; min – minimum; max – maximum; PSB – počet somatických buněk

Zajímavé zjištění přineslo hodnocení PSB v průběhu let 2020 až 2022, kdy zejména v prvním roce tvořily většinou skupinu vzorky mléka s PSB vyšším než $1000 \times 10^3/\text{ml}$ (Graf 4) oproti tomu byla skupina V během roku 2021 tvořena 15 % a v roce 2020 dokonce 35 % vzorků

zařazených do skupiny $1000 \times 10^3/\text{ml}$. Průměrná hodnota PSB v rámci let činila ve skupině V $1957 \times 10^3/\text{ml}$ oproti tomu ve skupině N ($\text{PSB} \leq 1000 \times 10^3/\text{ml}$) byl stanoven průměr $476 \times 10^3/\text{ml}$.

Rozdíly v průběhu let lze vysvětlit rozebráním průměrné hodnoty PSB za rok 2020, kde zejména v měsíci červenci a srpnu bylo celkové procento vzorků, ale i průměr PSB ve skupině V vyšší, a zároveň rok 2021, resp. měsíc červen vykazoval nadprůměrné teploty, což se projevilo i poklesem individuálních nádojů.

Graf 4. Průměrné hodnoty PSB ($\times 10^3/\text{ml}$) ve vzorcích mléka rozdělených dle limitní hodnoty PSB ($\text{N} \leq 1000 \times 10^3/\text{ml}$); $\text{V} \geq 1000 \times 10^3/\text{ml}$) při jednotlivých odběrech.



Leitner et al. (2016) vysvětluje nárůst PSB nejen v důsledku bakteriální zátěže, byť se může jednat o bakterie, které nepředstavují významné riziko pro lidské zdraví, ale i odlišnou fyziologií koz, kdy je navýšení somatických buněk ke konci laktace přirozeným procesem. Raynal-Ljutovac et al. (2007) uvádí, že PSB se během laktace přirozeně zvyšuje v rozmezí od $200 \times 10^3/\text{ml}$ až do $1000 \times 10^3/\text{ml}$, přičemž vyšší hodnota může být pozorována na počátku a v konečné fázi laktace.

Autoři (Alhussien & Dang 2018) uvádí, že nevhodné podmínky či způsob chovu, stejně tak stresová zátěž mohou výrazně navyšovat výskyt SB v mléce. Vlivem stresu na kvalitu koziho mléka se zabývali autoři ve studii (Mehdid et al. 2019). Získané výsledky potvrzují, že stres u koz může narušovat použití PSB jako nepřímé metody pro detekci intramamární infekce

(IMI) či jako komerčního parametru kvalitu mléka. Bylo potvrzeno, že stresová zátěž se projevila zvýšením somatických buněk u koz na 3 a vyšší laktaci. Kozy vystavené stresu na 1. a 2. laktaci nevykazovaly žádné změny v PSB, mléčné užitkovosti ani složení.

Studie (Zamuner et al. 2020) dospěla k podobnému závěru, že kozy na 2. a 3. laktaci nevykazovaly rozdíl v průměrném nádoji, oproti nižšímu nádoji u koz na 1. laktaci. Omezený vliv stresu na mléčnou užitkovost a složení mléka by mohla vysvětlovat skutečnost, že kozy mají velkou schopnost přizpůsobit se nepříznivým podmínkám (Silanikove et al. 2010; Alichanidis et al. 2016; Simões & Gutiérrez 2018).

5.3. Zhodnocení chemického složení kozího mléka

5.3.1. Chemické složení a vybrané parametry kozího mléka v roce 2020

Posouzena byla souvislost mezi počty somatických buněk (PSB) individuálních kozích mlék bez významného bakteriálního nálezu, chemickým složením a technologickými vlastnostmi mléka. K tomuto účelu se podařilo získat skupinu zvířat, která rodila v podobném termínu (březen 2020) a současně byla na 2. příp. 3. laktaci.

Získané individuální vzorky mléka byly rozděleny na ty, které splňovaly limit PSB do $1000 \times 10^3/\text{ml}$ mléka (skupina N) a ty, které vykazovaly hodnotu PSB vyšší než $1000 \times 10^3/\text{ml}$ mléka (skupina V). Tabulka 10 prezentuje rozdíly v základních složkách mléka a obsahu chloridů ve vztahu k PSB. Postupný nárůst tukuprosté sušiny (SNF) lze pozorovat v rámci všech odběrů roku 2020, kdy byl během 3. odběru sledován významný trend nárůstu a ve 4. odběru byl rozdíl mezi skupinami N a V dokonce statisticky průkazný (8,53 vs. 8,89 g/100 g).

Tyto výsledky jsou pravděpodobně způsobeny nárůstem obsahu bílkovin během všech odběrů zejména ve skupině V (3,13–3,48 g/100 g). Oproti tomu ve skupině N byl obsah bílkovin zaznamenán v rozsahu 2,83–3,09 g/100 g mléka. Statisticky průkazné rozdíly byly stanoveny během 3. a 4. odběru nejen v obsahu celkových bílkovin, ale i obsahu kaseinů mezi skupinami N a V (2,33 vs 2,74 g; 2,47 vs 2,84 g/100 g), což odpovídá výsledkům odborné literatury. Například (Park et al. 2007) uvádí, že obsah kaseinu v kozím mléce se pohybuje v rozmezí 1,6 až 2,6 g/100 g. Dle Stocco et al. (2018) je průměrný obsah kaseinů v kozím mléce 2,86 g/100 g.

Celkový obsah kaseinů představoval v průběhu všech odběrů ve skupině N 79,5–79,9 %, zatímco ve skupině V 80,2–81,6 %. Dle autorů Park & Haenlein (2008) kozí mléko obsahuje spíše nižší množství kaseinů ve prospěch celkových bílkovin. Naopak (Bramanti et al. 2002) uvádí, že kasein představuje dokonce 80 až 85 % mléčných bílkovin podobně jako ve studii (Ceballos et al. 2009), kde byl stanoven průměrný obsah kaseinových 82,7 % a 17,3 % syrovátkových bílkovin.

Z Tabulky 10 lze rovněž vyčíst, že v případě laktózy byl stanoven vždy nižší obsah ve skupině V než ve skupině N. Ovšem tento trend nebyl statisticky potvrzen. Pokles laktózy je dle literatury většinou spjat s pozitivním nálezem mastitidního patogenu, který vykazuje schopnost narušovat žláznatý epitel mléčné žlázy v důsledku zánětlivého procesu. Nicméně z Tabulky 8 vyplývá, že nebyl potvrzen statisticky průkazný rozdíl ve výskytu stafylokoků – nejčastějších mastitidních patogenů v kozím mléce.

Tabulka 10. Průměrné hodnoty základního složení v individuálních vzorcích kozího mléka rozdělených dle limitní hodnoty PSB (skupina N $\leq 1000 \times 10^3$ /ml, skupina V $\geq 1000 \times 10^3$ /ml) při jednotlivých odběrech.

analyt (g/100 g)	1. odběr		2. odběr		3. odběr		4. odběr		
	Sk.	<i>x</i>	SD	<i>x</i>	SD	<i>x</i>	SD	<i>x</i>	SD
tuk	N	4,27	0,60	4,24	1,07	5,37	1,35	5,35	0,63
	V	4,78	1,07	4,33	0,42	4,87	0,74	6,03	1,31
bílkoviny	N	2,83	0,41	2,99	0,33	2,95 ^a	0,31	3,09 ^a	0,21
	V	3,13	0,26	3,26	0,38	3,36 ^b	0,26	3,48 ^b	0,34
kasein	N	2,25	0,35	2,42	0,30	2,33 ^a	0,31	2,47 ^a	0,17
	V	2,51	0,21	2,69	0,33	2,74 ^b	0,26	2,84 ^b	0,34
laktóza	N	4,65	0,11	4,78	0,16	4,52	0,15	4,71	0,16
	V	4,60	0,16	4,72	0,07	4,40	0,13	4,61	0,11
SNF	N	8,31	0,37	8,56	0,34	8,27	0,27	8,53 ^a	0,17
	V	8,53	0,35	8,79	0,39	8,56	0,31	8,89 ^b	0,37
SF	N	12,5	0,70	12,8	1,20	13,6	1,30	13,8	0,60
	V	13,3	1,00	13,1	0,70	13,4	0,50	14,8	1,30
močovina	N	241,7	15,7	252,5	36,3	296,1	50,2	307,6	34,2
	V	243,0	23,5	263,9	18,1	272,1	33,4	330,8	45,3
počet (n)	N	7		13		10		7	
	V	9		5		7		10	

Hodnoty označené horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru; *x* – průměrná hodnota; SD – směrodatná odchylka; Sk. – skupina; SNF – tukuprostá sušina; SF – sušina; skupina N $\leq 1000 \times 10^3$ /ml, skupina V $\geq 1000 \times 10^3$ /ml)

Sledovaný soubor dat ($n = 34$) byl získán od koz pocházejících ze stejného chovatelského prostředí, v jednotném krmném režimu a bez zjevných zdravotních obtíží. Vybrány byly kozy s porody v podobném období (březen 2020) a zároveň na 2. a 3. laktaci (nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl). Tím byly minimalizovány nejvýznamnější faktory, které mají na kvalitu mléka zásadní vliv, jako je plemeno, výživa, fáze a pořadí laktace či zdravotní stav (Ceballos et al. 2009; Goetsch et al. 2011).

Tabulka 11 znázorňuje rozdíly ve sledovaných parametrech, včetně technologických vlastností mléka ve vztahu k přísnějším limitním hodnotám PSB (600, 700, 800 a 1000×10^3 /ml) a vlivu bakteriálního nálezu. Z 34 vzorků byla u 32,4 % ($n = 11$) potvrzena přítomnost stafylokoků nad limit 100 KTJ/ml v rozsahu 120–1600 KTJ/ml. Skupina Z ($n = 23$) byla zařazena do výběru vzorků bez významného zachytu stafylokoků (pod 100 KTJ/ml). Skupina vzorků bez významného bakteriálního nálezu byla rozdělena dle výše zmíněných limitních hodnot PSB.

Zajímavým zjištěním je, že již pro limitní hodnotu $600 \times 10^3/\text{ml}$ byl prokázán statisticky významný pokles nádoje ve skupině VZ ($< 600 \times 10^3/\text{ml}$) oproti NZ ($> 600 \times 10^3/\text{ml}$) ve vzorcích bez bakteriálního zánětu, konkrétně 510 vs 669 ml. Při rozdělení vzorků dle vyšších limitních hodnot PSB nebyl tento rozdíl statisticky potvrzen, nicméně byl pozorován trend nižší hodnoty ve skupině VZ oproti NZ). Nádoj je dle autorů (Zamuner et al. 2020) ovlivněn především obdobím porodů, pořadím a fází laktace. Nicméně tyto faktory byly v případě daného zhodnocení eliminovány.

S rostoucí limitní hodnotou PSB ($700\text{--}1000 \times 10^3/\text{ml}$) byly zaznamenány stěžejní rozdíly, zejména v obsahu bílkovin, jejichž nárůst byl zaznamenán ve skupině VZ (3,29–3,41 g/100 g). Pozitivní vztah mezi počtem somatických buněk a obsahem bílkovin pro kozí mléko popisují také další autoři (Bernacka, 2007; Barrón-Bravo et al. 2013; Musayeva et al. 2016), kde je většinou popisován nárůst syrovátkových bílkovin ve prospěch celkových bílkovin.

Dále došlo ve stejné skupině vzorků k prokazatelnému nižšímu obsahu laktózy (při limitu PSB $700 \times 10^3/\text{ml}$) mezi skupinami VZ a NZ (4,55 vs. 4,69 g/100 g). Stanovené hodnoty byly ve shodě s výsledky autorů 4,4 % (Ferro et al. 2017), 4,63 % (Stocco et al. 2018) či 4,8 % (Zamuner et al. 2020). Velmi podobná situace nastala při nastavení limitu PSB ($800 \times 10^3/\text{ml}$), kdy byl opět pozorován nárůst bílkovin ve skupině VZ, zároveň klesá obsah laktózy, a navíc se zhoršuje termostabilita, což je v souladu s autory (Sharma et al. 2011). Stocco et al. (2019) uvádí, že hladina laktózy, která je v negativní korelaci s PSB může ovlivňovat proces srážení. Syřitelnost byla sledována ve vztahu k mezním hodnotám PSB. Z dosažených výsledků lze vyvodit, že ve skupině VZ bylo pozorováno prodloužení doby potřebné k vysrážení kaseinů oproti skupině NZ, a to při všech limitních hodnotách PSB.

Ovšem nejmarkantnější rozdíly byly jednoznačně potvrzeny mez skupinami NZ a VZ při limitní hodnotě PSB $1000 \times 10^3/\text{ml}$. Ve skupině VZ jsou zařazeny vzorky se statisticky významně vyšším obsahem tukuprosté sušiny, což souvisí s prokazatelným nárůstem bílkovin i kaseinů. Tyto závěry odpovídají také výsledkům jednotlivých odběrů roku 2020, kdy ve 3. a 4. odběru došlo rovněž ke statistickému prokázání. V případě 1. a 2. odběru byl sledován podobný vývoj, nicméně z důvodu nižšího počtu vzorků ve skupině nebyl tento trend statisticky potvrzen.

Vztah mezi PSB a složením kozího mléka je dle literatury stále kontroverzní. Udávané jsou často protichůdné trendy (Raynal-Ljutovac et al. 2007; Stocco et al. 2019; Moradi et al. 2021), což by mohlo v některých případech být způsobeno nedostatečným odstraněním některých faktorů majících vliv na složení kozího mléka.

Tabulka 11. Rozdíly v složení, nádoji a technologických vlastnostech vzorků koziho mléka bez bakteriálního nálezu rozdělených dle limitní hodnoty PSB (rok 2020).

PSB/ml	600×10 ³				700×10 ³				800×10 ³ *				1000×10 ³			
	NZ		VZ		NZ		VZ		NZ		VZ		NZ		VZ	
n	8		15		9		14		10		13		12		11	
parametr	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD
tuk (g/100 g)	5,39	0,59	5,23	0,58	5,41	0,55	5,21	0,59	5,40	0,52	5,20	0,61	5,37	0,48	5,20	0,67
bílkoviny (g/100 g)	3,09	0,17	3,29	0,42	3,05 ^b	0,19	3,32 ^a	0,41	3,08 ^b	0,20	3,32 ^a	0,42	3,04 ^b	0,28	3,41 ^a	0,35
kasein (g/100 g)	2,46	0,14	2,69	0,40	2,45	0,14	2,71	0,40	2,49	0,18	2,70	0,41	2,44 ^b	0,23	2,80 ^a	0,36
laktóza (g/100 g)	4,68	0,18	4,56	0,13	4,69 ^a	0,17	4,55 ^b	0,13	4,67	0,17	4,55	0,13	4,64	0,17	4,56	0,14
SNF (g/100 g)	8,56	0,16	8,64	0,47	8,53	0,17	8,66	0,48	8,53	0,16	8,67	0,50	8,45 ^b	0,28	8,79 ^a	0,43
SF (g/100 g)	13,9	0,56	13,8	0,59	13,9	0,52	13,8	0,62	13,9	0,49	13,8	0,64	13,8	0,51	13,9	0,65
močovina (g/l)	312	32,7	303	37,6	311	30,8	303	39,0	308	30,2	304	40,2	304	29,3	308	42,6
nádoj (ml)	669 ^a	136	510 ^b	168	639	156	518	172	635	147	512	177	588	175	541	176
syřitelnost (s)	129	29,0	159	54,2	131	28,0	160	56,2	131	26,4	163	57,7	129	25,4	171	59,0
termostabilita (s)	177	60,1	172	128	195	79,1	160	123	232 ^a	137	129 ^b	45,9	217 ^a	129	126 ^b	49,1
pH	6,79	0,08	6,82	0,12	6,81	0,09	6,81	0,12	6,80	0,09	6,82	0,12	6,78	0,09	6,84	0,12

Hodnoty označené odlišnými horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru dat; x – průměr; SD – směrodatná odchylka; PSB – počet somatických buněk; SNF – tukuprostá sušina; SF - sušina

Skupina NZ – vzorky mléka s PSB nižším než limitní hodnota PSB bez významného záchytu bakterií

Skupina VZ – vzorky mléka s PSB rovným a vyšším než limitní hodnota PSB bez významného záchytu bakterií

*Ve skupinách NZ a VZ s limitní hodnotou PSB 800×10³/ml jsou zařazeny stejné vzorky jako pro limitní hodnotu 900×10³/ml, proto nejsou stejné výsledky pro toto rozdělení uváděn.

Ze získaných výsledků vyplývá, že zvýšené hodnoty PSB nad hranici $1000 \times 10^3/\text{ml}$ prokazatelně ovlivňují základní složky mléka a dále z technologických vlastností termostabilitu.

Přestože rozdíly v syřitelnosti nebyly prokázány, lze konstatovat, že nižší průměr byl stanoven vždy ve skupině NZ (tedy nižší než stanovený limit PSB $600\text{--}1000 \times 10^3/\text{ml}$), což pravděpodobně může souviset s nižším obsahem kaseinů. Dalším vysvětlením by mohla být příliš vysoká hranice 100 KTJ/ml pro stafylokoky, dle které byly vzorky rozděleny, přičemž jejich enzymatická činnost může pravděpodobně také ovlivňovat syřitelnost mléka.

Z primárních výsledků týkajících se změn v chemickém složení a souvislosti s technologickými vlastnostmi mléka vyplývá, že je třeba se danou problematikou zabývat i nadále. Je zřejmé, že pro další odběry bylo třeba zaměřit se na vzorky odebrané ve stejné fázi a pořadí laktace. V souvislosti s prvními výsledky je nutné rovněž konstatovat, že reálné vzorky nelze namodelovat, jak by bylo žádoucí, a proto i vyhodnocení vždy závisí na získaném souboru vzorků.

Dále byly vyhodnoceny odlišnosti mezi skupinami vzorků Z (bez významného bakteriálního záchytu) a B (s významným záchytem bakterií > 100 KTJ/ml). Ačkoli nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v PSB, tak byl jednoznačně prokázán významný rozdíl v obsahu laktózy ($p = 0,022$). Tyto výsledky potvrdily, že nejen vliv PSB, ale i výskyt relativně nízkého počtu bakterií ovlivňují kvalitu mléka.

Proto byl zvolen jiný pohled na danou problematiku, kdy byly vzorky rozděleny na skupinu NZ, tj. bez přítomnosti bakterií a zároveň spadající pod limit PSB $1000 \times 10^3/\text{ml}$ (vycházející z Tabulky 11) a vzorky ostatní bez ohledu na PSB či mikrobiologický nálezn. Tabulka 12 znázorňuje, že existuje statistický rozdíl v nárůstu bílkovin a chloridových iontů, a zároveň poklesu laktózy.

Trend byl sledován i v nárůstu kaseinů a statisticky prokázaným vyšším pH ve skupině Z + B. Je zřejmé, že tato skupina je charakteristická zhoršením technologických vlastností, tj. prodloužením doby potřebné ke koagulaci, tak zkrácením termostability. Stocco et al. (2019) uvádí, že vyšší pH je spojováno se zhoršováním koagulačních schopností.

Tabulka 12 potvrzuje jednoznačné rozdíly ve sledovaných skupinách. Výsledky ukazují, že i vzorky mléka zařazené pod limitní hodnotu PSB $1000 \times 10^3/\text{ml}$ či vzorky s relativně nízkým výskytem bakterií potvrzují zásadní rozdíly v kvalitě sledovaných mlék.

Tabulka 12. Rozdíly ve vybraných parametrech mléka mezi skupinami NZ a Z + B.

skupina	NZ (PSB $\leq 1000 \times 10^3/\text{ml}$)		Z + B*		p
	n	12	22		
parametr	x	SD	x	SD	
nádoj (ml)	588	175	577	160	0,857
syřitelnost (s)	129 ^b	25,4	160 ^a	48,6	0,047
termostabilita (s)	217 ^a	129	137 ^b	72,9	0,031
pH	6,78 ^b	0,09	6,84 ^a	0,09	0,045
tuk (g/100 g)	5,37	0,48	5,50	1,39	0,857
bílkoviny (g/100 g)	3,04 ^b	0,28	3,31 ^a	0,37	0,031
CN (g/100 g)	2,44	0,23	2,68	0,38	0,066
laktóza (g/100 g)	4,64 ^a	0,17	4,52 ^b	0,15	0,050
chloridy (mg/100 ml)	147 ^b	11,6	160 ^a	10,4	0,002
SNF (g/100 g)	8,45	0,28	8,63	0,40	0,296
SF (g/100 g)	13,8	0,51	14,0	1,40	0,719

Hodnoty označené odlišnými horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru; x – průměr; SD – směrodatná odchylka; SNF – tukuprostá sušina; SF - sušina
Skupina NZ: kozi mléka s PSB nižším než $1000 \times 10^3/\text{ml}$ bez významného záchytu bakterií; Skupina Z + B; *bez ohledu na PSB a se záchytem bakterií > 100 KTJ.

5.3.1.1. Zastoupení kaseinových bílkovin

Speciální pozornost byla věnována obsahu kaseinů, respektive vybraných kaseinových frakcí. Z předchozích výsledků vyplývá, že statisticky průkazné změny celkového obsahu bílkovin ($p = 0,017$) byly stanoveny již při mezní hodnotě PSB $700 \times 10^3/\text{ml}$ (Tabulka 11). Ve všech případech byl stanoven vyšší obsah ve skupině V (vyšší než stanovená limitní hodnota) oproti skupině N (nižší než limitní hodnota PSB).

V případě vybraných kaseinových bílkovin došlo k prokazatelnému rozdílu při limitní hodnotě PSB $1000 \times 10^3/\text{ml}$ ($p = 0,034$). Proto byla pro následné zhodnocení zvolena mez PSB právě $1000 \times 10^3/\text{ml}$ (skupina N $\leq 1000 \times 10^3/\text{ml}$ a skupina V $\geq 1000 \times 10^3/\text{ml}$). Pro experiment byly zvoleny vzorky bez významného bakteriálního záchytu (> 100 KTJ/ml).

Tabulka 13 znázorňuje nejvýraznější změny právě v zastoupení frakce β -kaseinu, kdy byl pozorován statistický rozdíl mezi skupinami N a V (1,66 vs. 1,95 g/100 g). Dále je možné sledovat trend v nárůstu obsahu α_{S1} - a κ -kaseinu ve skupině V při všech odběrech.

Nejvíce zastoupenou kaseinovou bílkovinou byl jednoznačně β -kasein, jehož průměrný obsah za rok 2020 představoval ve skupině N (1,78 g/100 g) a ve skupině V (2,03 g/100 g). Ve skupině N představuje β -kasein 69 %, zatímco ve skupině V odpovídá jeho průměrný obsah 73 % z celkových kaseinových bílkovin. Tyto hodnoty se téměř shodují s literaturou.

Tabulka 13. Zastoupení kaseinových frakcí ve vzorcích mléka rozdělených dle limitní hodnoty PSB (skupina N $\leq 1000 \times 10^3$ /ml, skupina V $\geq 1000 \times 10^3$ /ml) při jednotlivých odběrech.

parametr g/100 g	Sk.	1. odběr		2. odběr		3. odběr		4. odběr	
		x	SD	x	SD	x	SD	x	SD
α_{S1} -kasein	N	0,24	0,05	0,27	0,04	0,23	0,04	0,23	0,03
	V	0,25	0,04	0,29	0,03	0,26	0,05	0,28	0,07
α_{S2} -kasein	N	0,21	0,06	0,21	0,04	0,18	0,04	0,18	0,04
	V	0,20	0,03	0,25	0,14	0,20	0,04	0,19	0,04
β -kasein	N	1,51	0,22	1,63	0,28	1,66 ^a	0,25	1,79	0,21
	V	1,69	0,17	1,76	0,16	1,95 ^b	0,19	2,07	0,27
κ -kasein	N	0,30 ^a	0,05	0,31	0,06	0,26	0,05	0,27	0,08
	V	0,37 ^b	0,05	0,38	0,12	0,33	0,09	0,30	0,09

Hodnoty označené horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); x – průměrná hodnota; SD – směrodatná odchylka; Sk. – skupina; skupina N $\leq 1000 \times 10^3$ /ml, skupina V $\geq 1000 \times 10^3$ /ml)

Například Tamime et al. (2011) popisuje průměrné zastoupení β -kaseinu, které dle autorů tvoří 50–64 % z celkových kaseinů kozího mléka. Podobné hodnoty uvádějí i autoři (Kondyli et al. 2012). Vyšší zastoupení této frakce v kaseinových bílkovinách může být vysvětleno např. i působením proteolytických enzymů pocházejících ze somatických buněk.

Ačkoli by se vyšší obsah kaseinů ve skupině mlék s PSB nad 1000×10^3 /ml mohl jevit jako pozitivní efekt ovlivňující kvalitu kozího mléka, je nutné konstatovat, že vzorky mléka ve skupině VZ (vyšší než limitní hodnota) se vyznačuje změnou v technologických vlastnostech, a to poklesem termostability a trendem v prodloužení doby potřebné ke koagulaci mléka, na čemž má pravděpodobně podíl vyšší obsah kaseinů v této skupině viz Tabulka 11. Podobné výsledky jsou uvedeny i v Tabulce 12, kde byl prokázán rozdíl nejen v syřitelnosti, termostabilitě, ale i změně pH a zároveň byly potvrzeny rozdíly v odlišném zastoupení složek, jako jsou celkové bílkoviny, kasein, obsah laktózy i chloridových iontů.

Zhoršení technologických vlastností mléka souvisí nejen se změnami ve složení mléka, např. prokázanými změnami v obsah chloridových iontů, ale i nárůstem celkového obsahu kaseinů (Tabulka 14). Nicméně prodloužení doby koagulace může být také způsobeno vyšším obsahem bílkovin, což nejspíše zvyšuje nároky na čas potřebný ke koagulaci kaseinů. Jistý vliv budou mít i změny v zastoupení kaseinových frakcí bílkovin způsobené proteolytickou činností enzymů původem ze somatických buněk a bakterií, jelikož nelze opomenout fakt, že somatické buňky mají svůj vlastní enzymatický aparát, který může významně ovlivňovat technologickou zpracovatelnost mléka.

5.3.1.2. *Rozdíly v zastoupení minerálních látek*

Tabulka 14 znázorňuje variabilitu vybraných minerálních látek v individuálních vzorcích vzorků kozího mléka bez bakteriálního nálezu. Zajímavý je zejména vliv PSB na obsah chloridových iontů. Jejich nárůst byl sledován především ve skupině VZ, a to 155–166 mg/100 ml ve všech odběrech a při třech odběrech ze čtyř byl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu chloridů mezi skupinou NZ a VZ dle limitní hodnoty PSB $1000 \times 10^3/\text{ml}$. Ve skupině N byly chloridy přítomny v rozmezí 143–148 mg/100 ml. Tyto stanovené hodnoty odpovídají průměrné hodnotě 150 mg/100 g udávané pro kozí mléko (Turkmen 2017).

Hlavní funkcí chloridových iontů v mléce je udržovat osmotický tlak. V mléce se vyskytují zejména ve formě chloridu sodného. Vyšší koncentrace NaCl v mléce je spojována s horšími technologickými vlastnostmi mléka, jako je delší doba srážení sýřeniny a jeho nižší pevnost (Stocco et al. 2019). Statistický prokázaný rozdíl byl potvrzen v obsahu sodíku ve skupinách vzorků kozího mléka, jehož zastoupení je pravděpodobně ovlivněno také PSB. Stejně jako v případě chloridových iontů, je i zastoupení sodíku vyšší ve skupině VZ (38,8–40,4 mg/100 g) oproti skupině NZ (29,5–32,5 mg/100 g), a to ve všech případech (PSB 600– $1000 \times 10^3/\text{ml}$). Průměrný obsah sodíku dle (Kondyli et al. 2007) představuje 59,4 mg/100 g, (Alichanidis et al. 2016) pak 43 mg/100 g v rozmezí 23–61 mg/100 g mléka.

Nárůst Na, Cl, ale i K iontů může být pravděpodobně vysvětlen tím, že jsou součástí mléčného séra, tedy lépe rozpustné. Oproti tomu existují však rozdíly, pokud jde o rozdělení vápníku, fosforu a hořčíku, které jsou v různé míře rozpustné v mléčném séru (Alichanidis et al. 2016). Průměrný obsah těchto minerálních látek ve své studii uvádí (Mestawet et al. 2012), tedy 162 mg Ca/100 g, 139 mg P/100 g a 15 Mg mg/100 g.

Zhoršení technologických vlastností mléka pravděpodobně souvisí se změnami v zastoupení základních složek mléka, ale mohl by být vysvětlen i nárůstem chloridových iontů. Jak již bylo zhodnoceno v Tabulce 11 a 12, s rostoucí hodnotou PSB se ve skupině VZ zhoršuje syřitelnost mléka, dále byl sledován pokles termostability, nádoje a obsahu laktózy. Podobně jako ve studii autorů (Stocco et al. 2018). Dle (Malik et al. 2018) dále dochází v případě výskytu subklinické mastitidy k poklesu obsahu vápníku. Nicméně s narůstající hodnotou PSB nebyl tento trend jednoznačně potvrzen. Vápník byl ve skupině NZ zastoupen v rozsahu 101,7–104,2 mg/100 g, zatímco ve skupině VZ 103,6–106,1 mg/100 g mléka. Průměrná hodnota obsahu vápníku uváděná v kozím mléce bez ohledu na faktory, které by mohly na jeho obsah mít zásadní vliv, je dle celé řady autorů 132 mg/100 g (Kondyli et al. 2007; Park et al. 2007; Turkmen 2017) v rozsahu 90–199 mg/100 g mléka (Alichanidis et al. 2016).

Tabulka 14. Obsah vybraných minerálních látek (mg/100 g) ve vzorcích kozího mléka (bez významného bakteriálního nálezu) rozdělených dle limitní hodnoty PSB.

PSB/ml	600×10 ³				700×10 ³				800×10 ³ *				1000×10 ³			
	NZ		VZ		NZ		VZ		NZ		VZ		NZ		VZ	
n	8		15		8		15		8		15		8		15	
	<i>m</i>	SD	<i>m</i>	SD	<i>m</i>	SD	<i>m</i>	SD	<i>m</i>	SD	<i>m</i>	SD	<i>m</i>	SD	<i>m</i>	SD
Ca	104,2	11,9	103,6	13,4	104,0	11,1	103,6	13,9	102,7	11,3	104,6	13,9	101,7	11,0	106,1	14,3
K	170,1	31,7	168,5	34,3	173,8	31,7	166,0	34,1	177,1	31,6	162,9	33,3	178,5	29,2	158,8	34,4
Na	29,7 ^a	4,13	38,8 ^b	9,70	29,9 ^a	3,89	39,4 ^b	9,81	29,5 ^a	3,82	40,4 ^b	9,44	32,5 ^a	10,4	39,2 ^b	6,58
Cl**	143 ^b	13,9	155 ^a	12,2	144 ^b	13,4	158 ^a	12,5	146 ^b	12,7	161 ^a	12,4	148 ^b	11,6	166 ^a	12,3
Mg	12,1	0,66	12,4	0,89	12,1	0,62	12,5	0,92	12,0	0,67	12,6	0,86	12,0	0,68	12,6	0,88
P	89,4	7,72	88,0	10,5	89,9	7,33	87,7	10,8	91,0	7,75	86,7	10,6	90,9	7,17	85,9	11,3
S	24,5	1,45	25,7	2,44	24,5	1,36	25,8	2,51	24,7	1,35	25,8	2,61	24,4	1,67	26,2	2,36
Cu†	55,0	24,0	56,0	17,0	5,05	22,0	56,0	18,0	53,0	21,0	58,0	18,0	53,0	20,0	59,0	19,0
Mn†	14,0	9,0	19,0	23,0	13,0	9,0	20,0	23,0	14,0	9,0	20,0	24,0	13,0	9,0	23,0	26,0
Se†	11,0	4,0	8,0	6,0	11,0	4,0	8,0	6,0	11,0	4,0	8,0	6,0	10,0	5,0	9,0	7,0
Zn†	419	55,0	406	89,0	412	56,0	409	91,0	423	63,0	401	89,0	408	69,0	413	90,0
Fe†	274	53,0	426	39,7	275	50,0	436	41,0	273	47,0	451	42,3	268	45,0	488	45,2

Hodnoty označené odlišnými horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru, *m* – medián; SD – směrodatná odchylka; PSB – počet somatických buněk

Skupina NZ – vzorky mléka s PSB nižším než limitní hodnota PSB a bez významného záchytu bakterií

Skupina VZ – vzorky mléka s PSB rovným a vyšším než limitní hodnota PSB a bez významného záchytu bakterií

*Ve skupinách NZ a VZ s limitní hodnotou PSB 800×10³/ml jsou zařazeny stejně vzorky jako pro limitní hodnotu 900×10³/ml.

** Obsah chloridů je uveden v mg/100 ml mléka.

† Obsah je uveden v µg/100 g.

5.3.2. Chemické složení a vybrané parametry kozího mléka v roce 2021

Z celkového souboru dat ($n = 58$, všechna zvířata na 2. laktaci) byla pro detailnější vyhodnocení výsledků vybraná užší skupina vzorků bez významného mikrobiologického nálezu, tzn. vzorky mléka s počty stafylokoků do 50 KTJ/ml, počty alkaligenních mikroorganismů do 50 KTJ/ml a celkový počet mikroorganismů (CPM) do 200 KTJ/ml. Tyto přísnější limity byly zvoleny na základě předchozího výzkumu a rovněž z důvodu nemožnosti individuálně stanovovat veškeré přítomné mastitidní patogeny. Na základě těchto kritérií byla vytvořena užší skupina vzorků ($n = 31$), tedy vzorky bez významného bakteriálního nálezu. Z předchozích zkušeností, výsledků a možností sestavit soubor dat pro statistické vyhodnocení, byla nastavena mezní hranice PSB již $500 \times 10^3/\text{ml}$. Ačkoli se zdá limitní hodnota velmi benevolentní, autoři (Moradi et al. 2021) udávají běžnou hodnotu PSB v kozím mléce $300 \times 10^3/\text{ml}$ ačkoli Quintas et al. (2017) doplňuje, že nárůst somatických buněk u koz může ke konci laktace dosáhnout hodnoty vyšší až $2000 \times 10^3/\text{ml}$ bez výskytu infekce.

Opět byly zhodnoceny souvislosti parametru PSB, chemickým složením mléka a technologickými vlastnostmi. Tabulka 15 znázorňuje, že při nastavení nižší limitní hodnoty PSB ($500 \times 10^3/\text{ml}$) nedošlo ke statistickému potvrzení rozdílů v hlavních mléčných složkách mléka. Nicméně lze konstatovat, že ve skupině vzorků mléka s PSB do $500 \times 10^3/\text{ml}$ lze pozorovat nepatrně vyšší obsah tuku, bílkovin, laktózy i celkové sušiny. Tento závěr však není statisticky průkazný. Rozdíly v kaseinových bílkovinách jsou popsány v kapitole 5.3.2.1.

Zjištěny byly statisticky významné rozdíly v technologických vlastnostech mléka. Je zřejmé, že došlo k významnému snížení titrační kyselosti (5,68 vs 4,92) a zároveň nárůstu pH (6,82 vs. 6,90) ve skupině vzorků mlék spadající do skupiny s $\text{PSB} \geq 500 \times 10^3/\text{ml}$.

Obě skupiny vzorků (NZ a VZ) při limitní hodnotě PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$ obsahovaly podobné množství bílkovin, nicméně skupina VZ vykazovala významné zhoršení syřitelnosti kozího mléka. Lze se domnívat, že prodloužení syřitelnosti nelze jednoznačně přisuzovat nárůstu bílkovin (rok 2020) a s největší pravděpodobností souvisí se změnami v obsahu chloridů (5.3.2.2.). Tuto domněnku potvrzují i autoři Stocco et al. (2018) kde byla stanovena negativní korelace mezi obsahem tuku, bílkovin a zejména kaseinů ve vztahu k obsahu chloridů (NaCl). Negativní vztah NaCl vůči ostatním složkám mléka byl očekáván zejména z důvodu udržování osmotické rovnováhy v prostředí.

Pro lepší přehlednost a kontinuální využívání neparametrických testů byly v následujících výsledcích doplněny i hodnoty mediánu (m).

Tabulka 15. Rozdíly ve složení, nádoji a technologických vlastnostech individuálního koziho mléka (bez významného bakteriálního nálezu) rozděleného na skupiny dle limitní hodnoty PSB 500×10^3 v ml mléka.

PSB/ml	$\leq 500 \times 10^3$			$\geq 500 \times 10^3$		
skupina	NZ			VZ		
n	13			18		
parametr	<i>x</i>	<i>m</i>	SD	<i>x</i>	<i>m</i>	SD
tuk (g/100 g)	5,15	5,16	0,94	4,96	4,91	0,94
bílkoviny (g/100 g)	3,29	3,32	0,31	3,27	3,23	0,22
CN (g/100 g)	2,52	2,55	0,24	2,49	2,49	0,16
WP (g/100 g)	0,59	0,59	0,07	0,59	0,58	0,07
laktóza (g/100 g)	4,49	4,50	0,11	4,40	4,41	0,19
SNF (g/100 g)	8,85	8,90	0,45	8,67	8,68	0,32
SF (g/100 g)	13,80	13,84	1,05	13,53	13,44	0,82
močovina (mg/100 ml)	29,63	31,22	5,49	31,42	32,46	4,91
nádoj (ml)	628	600	249	597	560	175
syřitelnost (s)	202 ^b	179 ^b	66	319 ^a	311 ^a	130
termostabilita (s)	177	154	86	161	164	51
kysací schopnost	38,47	39,20	3,65	39,71	39,20	2,51
pH	6,82	6,80	0,08	6,90	6,89	0,11
SH	5,68 ^a	5,40 ^a	1,11	4,92 ^b	4,95 ^b	0,42

Hodnoty označené odlišnými horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru; *x* – průměr; *m* – medián; SD – směrodatná odchylka; CN – kaseinové bílkoviny; PSB – počet somatických buněk; SNF – tukuprostá sušina; SF – sušina; SH – titrační kyselost; WP – syrovátkové bílkoviny

NZ – skupina Z (bez významného nálezu mikroorganismů: stafylokoky do 50 KTJ a CPM do 200 KTJ/ml) s PSB do 500×10^3 /ml mléka; VZ – skupina Z s PSB nad 500×10^3 /ml mléka.

5.3.2.1. Zastoupení kaseinových bílkovin

V návaznosti na výsledky roku 2020, kde byly potvrzeny statistické rozdíly v obsahu bílkovin i kaseinů (Tabulka 11 a 12) a také změn technologických vlastností, byla v roce 2021 nastavena přísnější limitní hodnota PSB 500×10^3 /ml. Z Tabulky 15 je zřejmé, že byl sledován trend v poklesu bílkovin i kaseinů ve skupině vyšší než 500×10^3 /ml, přestože nedošlo ke statistickému potvrzení.

Vyloučením vlivu bakteriálního nálezu lze vyhodnotit vliv hodnoty PSB na zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí ve vybrané skupině vzorků (Z), tedy NZ (PSB $\leq 500 \times 10^3$ /ml) a VZ (PSB $\geq 500 \times 10^3$ /ml). Statisticky byl ve skupině s vyšším PSB stanoven pokles α_{S2} -kaseinu, nicméně lze pozorovat snížení obsahu α_{S1} -kaseinu, β -kaseinu i κ -kaseinu (Tabulka 16).

Tabulka 16. Obsah vybraných kaseinových bílkovin ve vzorcích mléka bez významného bakteriálního zánětu (Z) rozdělených dle limitní hodnoty PSB ($500 \times 10^3/\text{ml}$).

PSB/ml	$\leq 500 \times 10^3$			$\geq 500 \times 10^3$		
skupina	NZ			VZ		
n	13			18		
parametr	<i>x</i>	<i>m</i>	SD	<i>x</i>	<i>m</i>	SD
α_{S1} -kasein	0,25	0,21	0,10	0,22	0,20	0,04
α_{S2} -kasein	0,16 ^a	0,16	0,01	0,18 ^b	0,18	0,03
β -kasein	2,00	1,74	0,72	1,86	1,81	0,30
κ -kasein	0,21	0,20	0,11	0,17	0,14	0,09

Hodnoty označené horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru; *x* – průměrná hodnota; *m* – medián; SD – směrodatná odchylka; Sk. – skupina; skupina NZ $\leq 500 \times 10^3/\text{ml}$, skupina VZ $\geq 500 \times 10^3/\text{ml}$

Ovšem dominantní kaseinovou frakcí je opět β -kasein, kdy jeho vyšší obsah byl stanoven ve skupině s nižším PSB. Přesto je důležité si uvědomit, že z hlediska zpracování mléka za účelem výroby mléčných výrobků je α_{S1} -kasein, jehož obsah je relativně nízký.

Korelace jednotlivých frakcí s absolutní hodnotou PSB nebyla prokázána, proto bylo v posledním roce velkým přínosem stanovení diferenciálního počtu somatických buněk, který by mohl tyto souvislosti objasnit.

Malik et al. (2018) uvádí, že zvýšené hodnoty PSB způsobují pokles tuku a bílkovin v sýrech, čímž dochází ke snížení výtěžnosti těchto výrobků v důsledku zvýšené vlhkosti sýrů. To může být způsobeno zhoršením koagulace v důsledku změn ve složení mléčných bílkovin, zastoupení minerálních látek či zvýšením pH. Tyto změny byly popsány např. v Tabulce 12 a 14. Ham et al. (2010) uvádí, že ve vzorcích kozího mléka s hodnotami PSB vyššími než $1500 \times 10^3/\text{ml}$ byly stanoveny vyšší hodnoty α_{S1} -kaseinu a nižší obsah β -kaseinu oproti skupině s nižším PSB. Studie Stocco et al. (2018) popisuje, že u zdravých koz se mléko s vysokým PSB vyznačuje vysokým obsahem tuku, bílkovin, kaseinů, a tím pádem i delší dobou srážení, ale rychlejší tvorbou sýřeniny.

5.3.2.2. Rozdíly v zastoupení minerálních látek

V roce 2021 byly rovněž stanoveny rozdíly v obsahu vybraných minerálních látek (Tabulka 17). Statisticky významný rozdíl byl opět zjištěn v obsahu chloridových iontů mezi skupinami NZ a VZ (130 vs. 148 mg/100 ml). Ve skupině VZ (tedy mléka s PSB $\geq 500 \times 10^3/\text{ml}$) byl prokázán vyšší obsah chloridů. Podobně tomu bylo i v případě obsahu sodíku ve skupině s vyšším PSB. Tyto poznatky jsou ve shodě s předchozími výsledky, kde byl tento trend

potvrzen pro všechny zvolené limitní hodnoty PSB. S těmito změnami pravděpodobně souvisí prodloužení syřitelnosti ve skupině VZ ($\geq 500 \times 10^3/\text{ml}$).

Při zvolené limitní hodnotě PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$ lze sledovat vyšší zastoupení draslíku ve skupině VZ oproti skupině NZ (129,2 vs. 143 mg/100 g) což odpovídá průměrným hodnotám 152 mg/100 g v rozsahu 135–180 mg/100 g v závislosti na fázi laktace (Kondyli et al. 2007). Mezi skupinami vzorků rozdělených dle PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$ nebyly v případě minerálních látek stanoveny další průkazné rozdíly.

Tabulka 17. Obsah vybraných minerálních látek (mg/100 g) ve vzorcích koziho mléka (bez významného bakteriálního nálezu) rozdělených dle limitní hodnoty PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$.

PSB/ml		$\leq 500 \times 10^3$			$\geq 500 \times 10^3$		
skupina		NZ			VZ		
n		13			18		
parametr	<i>x</i>	<i>m</i>	SD	<i>x</i>	<i>m</i>	SD	
Ca	116,8	112,9	17,5	129,7	122,0	38,7	
K	129,2	129,2	14,7	143,0	144,2	28,4	
Na	32,9 ^a	32,8 ^a	3,46	35,2 ^b	37,8 ^b	10,0	
Cl*	130 ^b	130 ^b	8,60	148 ^a	149 ^a	10,5	
Mg	12,7	12,7	1,67	13,9	12,7	51,3	
P	79,6	74,3	13,5	87,5	75,7	35,2	
S	26,0	26,0	3,03	27,9	25,1	7,67	
Cu†	10,0	9,0	10,0	13,0	10,0	11,0	
Mn†	10,0	9,0	5,0	9,0	9,0	3,0	
Se†	6,0	7,0	4,0	6,0	5,0	7,0	
Zn†	403	392	125	441	430	96,0	
Fe†	366	372	70,0	353	344	102	

Hodnoty označené odlišnými horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru; *x* – průměr; výběrového souboru; *m* – medián; SD – směrodatná odchylka; PSB – počet somatických buněk

Skupina NZ: kozi mléka s PSB nižším než limitní hodnota PSB a bez významného záchytu bakterií.

Skupina VZ: kozi mléka s PSB rovným a vyšším než limitní hodnota PSB a bez významného záchytu bakterií

*Obsah chloridových iontů je uveden v mg/100 ml.

† Obsah je uveden v $\mu\text{g}/100 \text{ g}$.

5.3.3. Chemické složení a vybrané parametry kozího mléka v roce 2022

Ze souboru dat ($n = 57$) byla pro detailnější vyhodnocení výsledků vybraná užší skupina vzorků ($n = 39$, zvířata na 2. laktaci s porody v březnu) rozdělená na dvě podskupiny, a to vzorky mléka s počty stafylokoků do 40 KTJ/ml a s celkovým počtem mikroorganismů (CPM) do 100 KTJ/ml (skupina Z, $n = 18$) a vzorky mléka, které převyšovaly stanovená kritéria (skupina B, $n = 21$). Avšak při tomto rozdělení nebyly, vyjma minerálních látek, potvrzeny statisticky průkazné rozdíly v zastoupení hlavních složek mléka, ale i dalších sledovaných parametrů. Dále bylo stanoveno kritérium limitní hodnoty PSB ($500 \times 10^3/\text{ml}$), dle kterého byly rozděleny vzorky mléka bez bakteriálního nálezu na skupiny NZ a VZ (Tabulka 18). Podobně jako v roce 2021, lze konstatovat, že při nižším limitu PSB ($500 \times 10^3/\text{ml}$) nejsou rozdíly ve složení statisticky průkazné, přestože vyšší obsah tuku, bílkovin, laktózy i tukuprosté sušiny byl stanoven ve skupině NZ.

Pro skupinu VZ byla statisticky průkazně prodloužena doba potřebná ke koagulaci mléka neboli syřitelnost ($p = 0,028$) a rovněž byl potvrzen nárůst pH ($p = 0,044$) oproti skupině NZ.

Tabulka 18. Rozdíly v složení, nádoji a technologických vlastnostech individuálního kozího mléka na skupiny S (bez významného bakteriálního nálezu) rozděleného dle limitní hodnoty PSB 500×10^3 v ml mléka.

PSB/ml	$\leq 500 \times 10^3$			$\geq 500 \times 10^3$		
	skupina	NZ		VZ		
n		6		12		
parametr	x	m	SD	x	m	SD
tuk (g/100 g)	5,54	5,77	0,94	5,09	5,18	0,77
bílkoviny (g/100 g)	3,07	3,02	0,34	3,14	3,03	0,33
kasein (g/100 g)	2,21	2,16	0,28	2,23	2,15	0,25
WP (g/100 g)	0,68	0,67	0,06	0,72	0,70	0,07
NPN (g/100 g)	0,19	0,19	0,01	0,19	0,19	0,01
laktóza (g/100 g)	4,57	4,59	0,18	4,42	4,60	0,51
SF (g/100 g)	13,8	14,0	1,2	13,3	13,3	1,0
nádoj (ml)	582	555	212	488	450	251
syřitelnost (s)	169 ^b	168	27	248 ^a	228	97
pH	6,44 ^b	6,41	0,17	6,62 ^a	6,61	0,16
SH	5,01	4,90	0,88	4,56	4,45	0,57

Hodnoty označené odlišnými horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru; x – průměr; m – medián; SD – směrodatná odchylka; PSB – počet somatických buněk; SF – sušina; SH – titrační kyselost; WP – syrovátkové bílkoviny

NZ – skupina Z (bez významného nálezu mikroorganismů: stafylokoky do 40 KTJ a CPM do 100 KTJ/ml) s PSB do $500 \times 10^3/\text{ml}$ mléka; VZ – skupina Z s PSB nad $500 \times 10^3/\text{ml}$ mléka.

Odborná literatura zmiňuje korelace mezi technologickými vlastnostmi a vyšším PSB. Moradi et al. (2021) popisuje, že hodnota pH je důležitým faktorem ovlivňujícím zpracování mléka pro sýrařské účely, nicméně dodává, že ve vztahu k PSB je pH kozího mléka méně ovlivňováno hodnotou PSB než v případě kravského či ovčího mléka. Dle studie Pazzola et al. (2019) neovlivňují vysoké hodnoty SB sýrařský proces, ale zvyšují schopnost sýrů vázat vlhkost, což má za následek horší oddělení syrovátky, čímž vznikají sýry se zvýšenou proteolytickou a lipolytickou aktivitou (Raynal-Ljutovac et al. 2007). Dosažené výsledky potvrzují, že již relativně nízké hodnoty PSB ($500 \times 10^3/\text{ml}$) ovlivňují zpracovatelské vlastnosti mléka.

Vzhledem k faktu, že somatické buňky jsou zdrojem celé řady enzymů, zejména proteáz a lipáz, v závislosti na jednotlivých typech buněk, lze se domnívat, že dopad na kvalitu a zpracovatelnost mléka může být značný (Koess & Hamann 2008; Bagnicka et al. 2011; Li et al. 2014; Moradi et al. 2021).

Rovněž se stále nabízí otázka, zda PSB jakožto samostatný parametr může jednoznačně vypovídat o zdravotním stavu mléčné žlázy. Bylo publikováno několik prací, týkajících se převážně kravského mléka, které zdůrazňují, že je nezbytné zabývat se nejen CPM, ale i zastoupením jednotlivých buněčných subpopulací, kdy tuto hypotézu potvrzují např. autoři (Farschtschi et al. 2021), kdy v kravském mléce s $\text{PSB} \leq 100 \times 10^3/\text{ml}$ byla prokázána zánětlivá reakce na základě zvýšeného výskytu polymorfonukleárních neutrofilů (PMN buněk). Dále např. (Damm et al. 2017) objasnil, že v kravském mléce s vyšším PSB lze pozorovat narůstající podíl PMN, oproti klesajícímu výskytu makrofágů. Zastoupení lymfocytů bylo poměrně konstantní při různých hodnotách PSB. Diferenciální počet somatických buněk (DSCC) tak odráží antidromní trend, tedy opačný vývoj oproti normálnímu výskytu PMN a makrofágů v případě kravského mléka. Shodné výsledky uvádí i autoři (Koess & Hamann 2008). Vliv jednotlivých buněčných populací somatických buněk na složení kozího mléka a jeho technologické vlastnosti je popsán v kapitole 5.4. Zastoupení diferenciálního počtu somatických buněk.

5.3.3.1. Zastoupení kaseinových bílkovin

Za účelem ověření výsledků z roku 2021 byly nastaveny podobné limity PSB a hodnoty mikrobiologické kvality mléka, tj. vzorky rozdělené do skupiny Z (se stafylokoky pod 40 KTJ/ml a CPM pod 100 KTJ/ml) a skupina B tvořená vzorky s bakteriálním nálezem vyšším, než jsou uvedené limity.

Porovnáním skupiny vzorků Z (bez významného bakteriálního nálezu) a skupiny B (s bakteriálním nálezem) byl stanoven statisticky významný rozdíl v zastoupení α_{S1} -kaseinu

0,19 vs. 0,15 g/100 g ($p = 0,033$), respektive pokles α_{S1} -kaseinu ve skupině s bakteriálním nálezem. Z Tabulky 13 je zřejmé, že v roce 2022 byl opět pozorován trend v mírném poklesu celkových bílkovin a kaseinů ve skupině s vyšším PSB ($\geq 500 \times 10^3/\text{ml}$).

Tabulka 19 ovšem znázorňuje, že nebyly na základě limitní hodnoty PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$ stanoveny žádné statisticky průkazné rozdíly. Ve skupině s vyšším PSB lze pozorovat mírný trend v poklesu β - a κ -kaseinu. Stejný trend se prokázal i v předchozím roce, nicméně nešlo o statisticky průkazný výsledek.

Tabulka 19. Obsah vybraných kaseinových bílkovin ve vzorcích mléka bez významného bakteriálního nálezu dle limitní hodnoty PSB ($500 \times 10^3/\text{ml}$).

PSB/ml		$\leq 500 \times 10^3$			$\geq 500 \times 10^3$	
skupina		NZ			VZ	
n		6			12	
parametr	x	m	SD	x	m	SD
α_{S1} -kasein	0,20	0,20	0,03	0,19	0,20	0,03
α_{S2} -kasein	0,24	0,22	0,04	0,25	0,25	0,08
β -kasein	1,46	1,49	0,19	1,33	1,32	0,20
κ -kasein	0,48	0,51	0,08	0,41	0,43	0,08

Hodnoty označené horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru; x – průměr; m – medián; SD – směrodatná odchylka; Sk. – skupina; skupina N $\leq 500 \times 10^3/\text{ml}$, skupina V $\geq 500 \times 10^3/\text{ml}$

5.3.3.2. Rozdíly v zastoupení minerálních látek

Pro vyhodnocení minerálních látek během posledního roku experimentu (2022) byly nastaveny obdobné podmínky jako v roce předchozím. Opět byl jednoznačně potvrzen rozdíl v obsahu chloridových iontů, respektive jejich jednoznačný nárůst mezi skupinami NZ a VZ (131,4 vs. 146,5 mg/100 ml mléka) viz Tabulka 20. Stejný vývoj byl pozorován i v případě sodíku, kde byl znovu statisticky potvrzen vyšší obsah ve skupině VZ ($p = 0,013$). Oproti předchozímu roku byl obsah sodíku nižší téměř o 31 % ve skupině NZ a ve skupině VZ byl v roce 2022 sledován 22% pokles.

Statistické rozdíly v zastoupení vápníku a fosforu nebyly potvrzeny, nicméně průměrné hodnoty se shodují s autory uvedenými výše. Průměrný obsah vápníku a fosforu představoval ve skupině NZ 114 mg/100 g resp. 75,34 mg/100 g a ve skupině VZ 111,8 mg/100 g resp. 72,6 mg/100 g. Stanovené hodnoty vápníku a fosforu jsou nepatrně nižší, než hodnoty 134 mg/100 g resp. 121 mg/100 g uváděné v práci (Chia et al. 2017), ovšem nejedná se o statisticky průkazný rozdíl. Oproti předchozímu roku došlo rovněž k poklesu obsahu draslíku ve skupině VZ (151,5 vs. 136,1 mg/100 g), tyto hodnoty jsou srovnatelné s autory (Kondyli et al. 2007), oproti tomu značně vyšší hodnoty pro draslík jsou uvedené v práci (Turkmen 2017).

Tabulka 20. Obsah vybraných minerálních látek (mg/100 g) ve vzorcích kozího mléka (bez významného bakteriálního nálezu) rozdělených dle limitní hodnoty PSB 500×10^3 /ml (2022).

PSB/ml	$\leq 500 \times 10^3$			$\geq 500 \times 10^3$		
skupina	NZ			VZ		
n	6			12		
parametr	<i>x</i>	<i>m</i>	SD	<i>x</i>	<i>m</i>	SD
Ca	114,0	114,9	6,10	111,8	113,1	16,0
K	151,5	152,9	137,0	136,4	139,1	14,6
Na	22,6 ^a	22,7 ^a	3,69	28,9 ^b	29,2 ^b	4,02
Cl*	131,4 ^b	131,0 ^b	5,10	146,5 ^a	143,8 ^a	10,8
Mg	8,60	8,40	1,15	9,11	8,90	1,16
P	75,3	69,5	9,81	72,6	70,8	8,90
S	23,1	22,2	2,44	24,0	23,0	2,13
Cu†	18,0	18,0	4,0	45,0	28,0	40,0
Mn†	2,0	1,0	2,0	3,0	3,0	2,0
Zn†	229 ^a	230 ^a	35,0	282 ^b	302 ^b	77,0
Fe†	217	205	50,0	178	159	44,0

Hodnoty označené odlišnými horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru; *x* – průměr; *m* – medián; SD – směrodatná odchylka; PSB – počet somatických buněk; Skupina NZ: kozí mléka s PSB nižším než limitní hodnota PSB a bez významného záchytu bakterií; Skupina VZ: kozí mléka s PSB rovným a vyšším než limitní hodnota PSB a bez významného záchytu bakterií
*Obsah chloridových iontů je uveden v mg/100 ml. † Obsah je uveden v $\mu\text{g}/100 \text{ g}$.

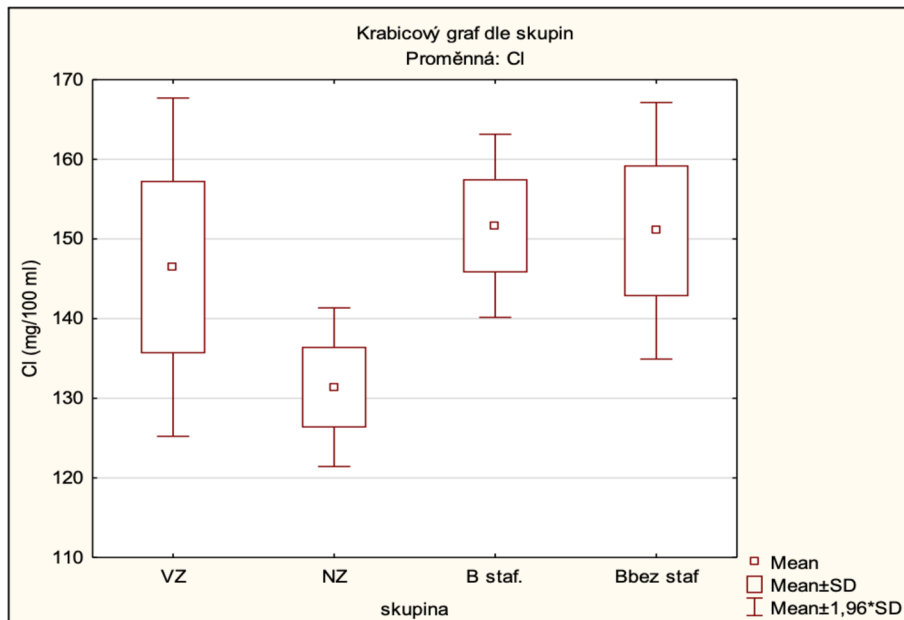
Zajímavým zjištěním je, že obsah zinku, kde byl v roce 2022 statisticky podložen rozdíl v obsahu mezi skupinou NZ a VZ ($p = 0,035$) byl jeho obsah o téměř 50 % nižší, než uvádí autoři práce (Park et al. 2007). Jedná se o výrazný pokles i ve srovnání s výsledky předchozího roku, tedy 2021 (o 23 % ve skupině NZ a o 30 % ve skupině VZ).

Cenné výsledky přineslo i porovnání skupin Z (vzorky mlék bez bakteriálního nálezu) za stanovené limitní hodnoty PSB (500×10^3 /ml) a skupina B (vzorky mlék s bakteriálním nálezem způsobeným buďto přítomností stafylokoků či jinými bakteriemi). Vzorky spadající do skupiny Z byly již vyhodnoceny výše, nicméně při porovnání se skupinou B (s přítomností patogenů – $B_{\text{stafyl.}}$ vs. bez přítomnosti patogenů – $B_{\text{bez stafyl.}}$) bylo dosaženo následujících výsledků.

Zatímco v obsahu chloridových iontů nebyl mezi skupinami vzorků $B_{\text{stafyl.}}$ vs. $B_{\text{bez stafyl.}}$ téměř žádný rozdíl (medián 153,6 vs. 149,9 mg/100 ml), v porovnání se skupinou Z byl však tento rozdíl znatelný a je zřejmé, že na obsah chloridových iontů má větší vliv PSB než přítomnost v tomto případě relativně nízkého počtu stafylokoků. Graf 5 oproti tomu znázorňuje markantní rozdíl v průměrných hodnotách chloridových iontů mezi skupinami VZ a NZ ($p = 0,003$) s intervalem hodnot 124–60,4 mg/100 ml mléka.

V případě obsahu sodíku ve vzorcích mléka byl prokázán statisticky průkazný rozdíl ($p = 0,044$) mezi skupinami N_{stafyl} vs. $N_{\text{bez stafyl}}$ s mediánem 29,4 vs. 24,5 mg/100 g (*Příloha I.*).

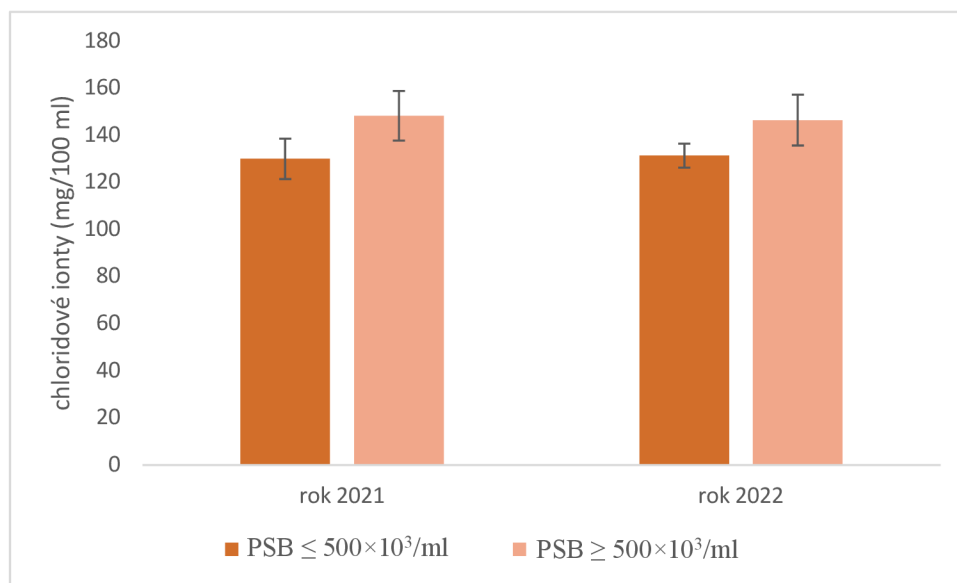
Graf 5. Porovnání obsahu chloridových iontů (mg/100 ml) v různých skupinách vzorků dle stanovených kritérií (PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$) a bakteriálního nálezu.



Z hlediska kvality koziho mléka je zřejmé, že právě chloridové ionty jsou v přímé korelaci s narůstajícím PSB a zhoršující se technologickou zpracovatelností. Graf 6 znázorňuje obsah chloridových iontů v roce 2021–2022 ve skupině vzorků s mezní hodnotou PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$. Tento fakt svědčí o tom, že i při relativně nízké hodnotě PSB ($500 \times 10^3/\text{ml}$) dochází k nárůstu chloridů v obou případech vždy ve skupině vyšší než $500 \times 10^3/\text{ml}$.

V roce 2021 odpovídal jejich obsah hodnotě 148,3 mg/100 ml, zatímco v roce 2022 byla tato hodnota 146,5 mg/100 ml ve skupině vyšší než $500 \times 10^3/\text{ml}$. Nicméně ve skupině s nižším PSB byly průměry let téměř shodné 130 vs. 131,4 mg/100 ml (2021 a 2022). Stejně tak v roce 2020 byla stanovena vyšší koncentrace chloridů ve skupinách dle limitu vyššího než PSB. Medián za rok 2020 byl ve skupině vyšší než $600 \times 10^3/\text{ml}$ (nejnižší limit pro vyhodnocení roku 2020) 155 mg/100 ml oproti skupině nižší (143 mg/100 g).

Graf 6. Obsah chloridových iontů (mg/100 ml) v individuálních vzorcích kozího mléka v průběhu let 2020–2022.



Výrazné změny ve složení mléka spojené se zvýšením koncentrace NaCl pravděpodobně mohou vést k nižším hodnotám výtěžnosti sýrů a sušiny sýrů u vzorků mléka charakterizovaných vysokým obsahem NaCl (Pazzola et al. 2019). Zvýšení koncentrace NaCl v mléce je často spojeno s poklesem obsahu tuku, bílkovin i kaseinů.

V případě rostoucích hodnot koncentrace NaCl nastává dle autorů většinou vyšší osmotický tlak, který je kompenzován snížením obsahu laktózy, což má za následek horší koagulační schopnost mléka a ovlivňuje zrání sýřeniny. Vysoká koncentrace NaCl může snižovat míru hydrolyzy κ -kaseinu, ovlivňovat pevnost sýřeniny a v důsledku substituce micelárního sodíku za vápník, modifikovat proces synereze (Foxy et al. 2017; Stocco et al. 2019).

Je vhodné uvést, že obsah minerálních látek v kozím mléce je ovlivněn mnoha faktory, mezi něž patří např. kvalita krmné dávky, fáze laktace či genetická příslušnost (Chávez-Servín et al. 2018; Nayik et al. 2022). I přesto, že koncentrace majoritních minerálních látek je v mléce relativně stabilní, oproti obsahu minoritních prvků, se v této práci podařilo opakovaně prokázat rozdíly v obsahu chloridových i sodných iontů u vzorků bez mikrobiálního nálezu při limitní hodnotě PSB 500×10³/ml. A to navzdory naprosté minimalizaci vlivu většiny výše zmiňovaných faktorů, které ovlivňují obsah minerálních látek v mléce.

Nicméně v některých případech, např. u zinku, případně sodíku se jejich zastoupení mezi roky 2021–2022 lišilo v rozmezí 20–30 %, nejedná se však o dramatické rozdíly. I přes snahu minimalizovat co nejvíce faktorů, došlo pravděpodobně skrze jednotný režim krmiva k narušení krmné dávky vlivem sezónnosti.

5.4. Zastoupení diferenciálního počtu somatických buněk

Somatické buňky v kozím mléce představují relativně složitou problematiku. V současné době nepanuje shoda ohledně užitečnosti somatických buněk jakožto stěžejního kritéria pro diagnostiku mastitidy či ukazatele kvality kozího mléka. V roce 2021 a 2022 bylo potvrzeno, že již při mezní hodnotě PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$ byly prokázány kvalitativní změny, a to ve stádu s vysokou hygienickou kvalitou, které vedly např. ke změně pH či zhoršení (prodloužení doby) syřitelnosti beze změny majoritních složek jako jsou bílkoviny, kaseiny.

Právě znalost jednotlivých buněčných subpopulací by mohla napomoci lepšímu porozumění těchto souvislostí a využití daného nástroje jak pro zajištění vhodné kvality kozího mléka k jeho technologickému zpracování, tak i zjednodušení identifikace různých typů mastitid.

Cílem této části výzkumu bylo nalézt vhodnou, rychlou a efektivní metodu pro stanovení jednotlivých typů somatických buněk. Zjištěno bylo procentuální zastoupení živých/neživých buněk, rozlišení epiteliálních buněk a leukocytů včetně jejich subpopulací, tzn. polymoronukleárních leukocytů (PMN), makrofágů (MF) a lymfocytů (LY).

Pro správné provedení analýzy pomocí průtokové cytometrie je třeba použít pouze buňky jednotlivé, tzv. singlety, které specificky fluoreskují v konkrétních kanálech. Analýza je prováděna na základě standardního protokolu tzv. „doublet discrimination“, kdy dochází k odstranění shluků na základě porovnání specifických charakteristik píků (výška a šířka píku, signálu) pro jednotlivé buňky.

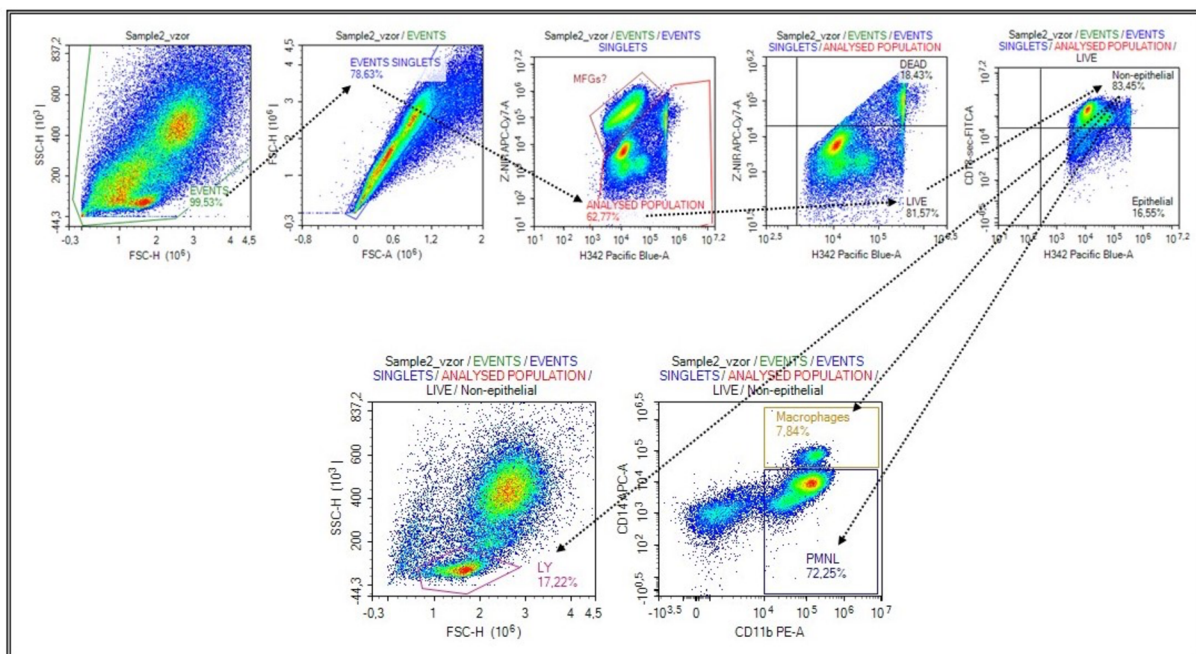
Z důvodu vyššího počtu přirozeně se vyskytujících cytoplazmatických částic v kozím mléce je třeba věnovat pozornost správné identifikaci jednotlivých typů buněk, aniž by došlo k chybnému nadhodnocení somatických buněk.

Zvláštní pozornost byla věnována přípravě vzorků a odstranění nežádoucích příměsí, zejména mléčného tuku, který by mohl významně ovlivňovat výsledek měření pomocí průtokové cytometrie. Komplikací v případě kozího mléka je navíc menší velikost těchto tukových kuliček, které mají na povrchu vázané bílkoviny a obarvují se velmi specificky. Podobnost kuliček mléčného tuku je dle našeho zjištění zatím limitujícím faktorem pro zavedení průtokové cytometrie do širší praxe. Proto je pro jednoznačné odlišení jednotlivých buněk třeba aplikovat specifické barvení a v případě použití standardní průtokové cytometrie dané výsledky ověřovat pomocí zobrazovacího cytometru (Image FC). Ve spolupráci s UK v Praze nám bylo toto ověření umožněno.

V rámci optimalizace došlo ke změně oproti původnímu záměru, kde byla protilátka CD45 zamýšlena jako hlavní panleukocytární marker, ale při prvních testech se potvrdilo, že nebyly

obarveny všechny typy těchto buněk, přestože výrobce deklaroval cross reaktivitu na mléko kozí. Proto byla tato látka nahrazena jinou protilátkou, konkrétně CD18.

Dále byla rozklíčována záležitost CD14+ (pozitivních) buněk, kdy jedna studie uváděla, že PMN buňky jsou definovány jako CD14- (negativní), ale toto tvrzení se v našem případě nepodařilo ověřit. Bylo zjištěno, že PMN byly slabě pozitivní na CD14. Přechody mezi PMN a makrofágy bylo však třeba odlišit. Díky testu blokace vazby bylo zjištěno, že se jedná o vazby nespecifické, které blokovat nelze. Zároveň bylo několika zdroji potvrzeno, že k těmto vazbám může docházet (Boulaaba et al. 2011; Mehne et al. 2010; Schwarz et al. 2011; Li et al. 2015). Schéma identifikace dle Schwarz (2011), které bylo zvoleno, potvrzuje, že PMN jsou definovány jako CD14+ (slabě pozitivní), zatímco makrofágy jako CD14+ (vysoce pozitivní). Schéma postupu identifikace jednotlivých typů buněk je zobrazeno na Obrázku 2.



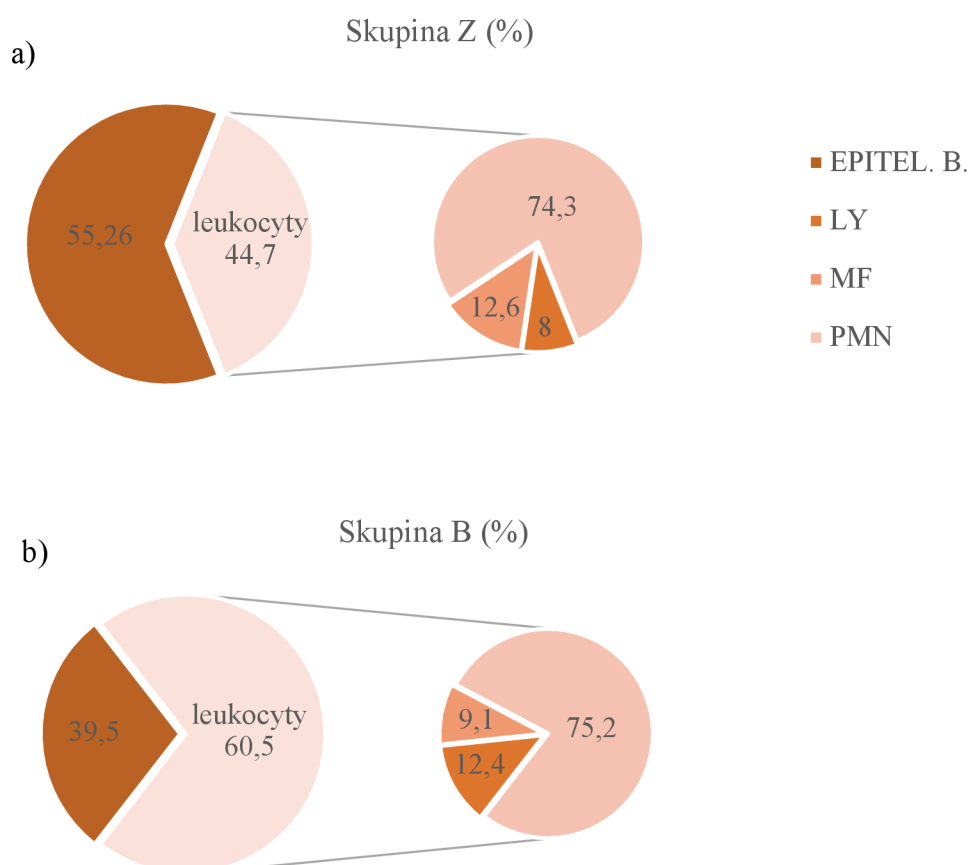
Obrázek 2. Záznam vyhodnocení jednotlivých subpopulací somatických buněk kozího mléka pomocí průtokové cytometrie (autor Ing. Filip Savvulidi, Ph.D.).

Klíčovou fází výzkumu bylo zhodnotit variabilitu zastoupení jednotlivých buněčných populací somatických buněk ve vzorcích kozího mléka s různým mikrobiologickým nálezem. Vzorky (n = 39) byly rozděleny na dvě skupiny, a to skupinu Z (bez významného bakteriálního nálezu s počty stafylokoků do 40 KTJ/ml a CPM do 100 KTJ/ml Z; n = 18) a skupinu B (vzorky zatížené bakteriálním nálezem; n = 21). Z Grafu 7a a 7b je patrné, že ve skupině kozího mléka bez bakteriálního nálezu (Z) lze pozorovat vyšší výskyt epiteliálních buněk oproti skupině B (55,26 vs. 39,48 %). Tabulka 21 potvrzuje statisticky průkazný rozdíl v zastoupení epiteliálních

a neepiteliálních somatických buněk mezi skupinami N a B ($p = 0,038$), čímž je vysvětlen i statisticky vyšší podíl celkových leukocytů.

Z pohledu somatických buněk původem z krve, jsou nejvíce zastoupenou skupinou leukocytů (neepiteliálních buněk) jednoznačně PMN. Ve skupině Z tvoří PMN 74,3 % a lehce vyšší zastoupení (75,2 %) bylo pozorováno i ve skupině B. Tyto hodnoty jsou pravděpodobně ovlivněno celkově dobrou mikrobiologickou kvalitou získaných vzorků mléka a rozdíly tak nejsou příliš markantní. Maximální zjištěný případ u počtu stafylokoků byl $6,9 \times 10^2$ KTJ/ml a CPM $8,3 \times 10^3$ /ml. Tento závěr se slučuje s různými studiemi zabývajícími se kozím mlékem, dle kterých je PMN dominujícím typem leukocytů v mléce pocházejícím ze zdravé, ale rovněž i infekcí napadené mléčné žlázy (Damm et al. 2017; Shah et al. 2017; Lianou et al. 2021). Dle různých studií představují PMN buňky v kozím mléce až 45–75 % (Boutinaud & Jammes 2002), 79 % (Boulaaba et al. 2011) či 45–74 % (Malik et al. 2018).

Graf 7. Procentuální zastoupení jednotlivých typů somatických buněk mezi skupinami Z (7a) vs. B (7b).



Rozdílná situace je v případě kravského mléka, kde se distribuce jednotlivých buněk s ohledem na zdravotní stav mléčné žlázy dojníc významně liší. Ve zdravém mléce jsou převažujícími typy makrofágy a lymfocyty, zatímco v mléce mastitidním převažují PMN (Bagnicka et al. 2011; Alhussien & Dang 2018; Malik et al. 2018). Li et al. (2014) uvádějí, že v bovinním mastitidním mléce mohou být v případě infekce přítomny PMN až v 92 %.

Tabulka 21 dále znázorňuje zajímavé rozdíly v obsahu chloridových iontů se statisticky prokazatelně vyšší hodnotou ($m = 152,1$ vs. $140,3$ mg/100 ml) ve skupině s mikrobiologickým nálezem B oproti skupině Z. Patrný rozdíl lze pozorovat i v případě PSB, kde byl naopak stanoven vyšší obsah ve skupině bez významného mikrobiologického nálezu (Z) oproti skupině B ($m = 949 \times 10^3$ vs. 404×10^3 /ml).

Tabulka 21. Vybrané parametry kozího mléka pro skupiny Z a B s rozdílným bakteriálním nálezem.

skupina n parametr	Z 18		B 21		p
	<i>m</i>	SD	<i>m</i>	SD	
PSB (10^3 /ml)	949 ^a	816	404 ^b	504	0,036
chloridy (mg/100 ml)	140,3 ^b	11,7	152,1 ^a	7,3	0,011
epitel. buňky (%)	53,1 ^a	26,0	33,4 ^b	22,2	0,038
leukocyty* (%)	46,9 ^b	26,0	66,6 ^a	22,2	0,038
lymfocyty* (%)	5,5	7,5	10,6	10,5	0,078
makrofágy* (%)	9,02	9,12	7,72	9,01	0,074
PMN* (%)	75,0	11,2	82,3	15,7	0,439

Hodnoty označené odlišnými horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru; Z – bez významného bakteriálního nálezu: stafylokoky do 40 KTJ a CPM do 100 KTJ; B – s bakteriálním nálezem; stafylokoky nad 40 KTJ a/nebo CPM nad 100 KTJ; * % z celkového obsahu leukocytů

Kozí mléko pocházející od zdravých zvířat je z důvodu odlišné sekrece mléka, tzv. apokrinní, charakteristické relativně vysokým podílem epiteliálních buněk (Jimenez-Granado et al. 2014; Shah et al. 2017; Albenzio et al. 2019). Imunitní obranný mechanismus mléčné žlázy v reakci na infekci způsobenou patogeny a poškození tkání vede ke zvýšení somatických buněk v mléčné žláze. V případě vzniku infekce dochází dle autorů (Stocco et al. 2020) k nárůstu neepiteliálních buněk, tedy leukocytů, které přechází z krve a zajišťují imunitní odpověď v mléčné žláze.

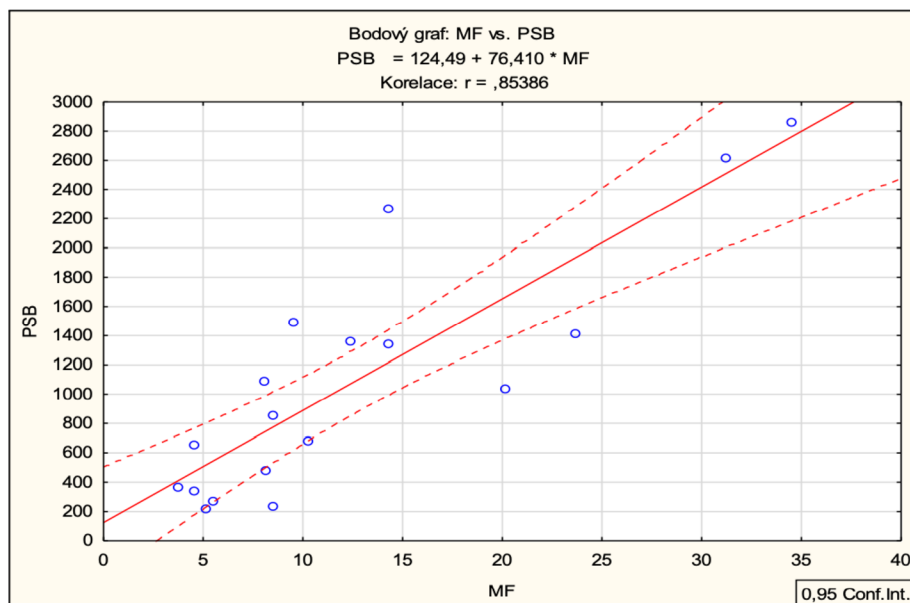
I v případě našeho výzkumu je patrný nárůst neepiteliálních buněk (leukocytů) ve skupině B. Dále lze sledovat zjevný trend v nárůstu lymfocytů a poklesu makrofágů mezi skupinami B a Z (Tabulka 21). Distribuce leukocytů v mléce by mohla být perspektivní pro odhad imunitní

reakce i při kolonizaci mléčné žlázy s nízkými počty mikroorganismů. Tyto hypotézu by však bylo třeba ověřit, ideálně i s vyššími počty mikroorganismů.

Pro další vyhodnocení byl zvolen soubor dat vzorků splňující kritéria minimalizace faktoru mikrobiologické zátěže, tj. mléka nezatížená vlivem přítomnosti bakterií a jejich enzymatického aparátu. Z hlediska zastoupení somatických buněk došlo k významnému nárůstu epitelálních buněk ve skupině VZ, a naopak poklesu leukocytů. Tento trend potvrzuje i korelační analýza (*Příloha II*), kde byla potvrzena negativní závislost leukocytů ($R = -0,607$), a naopak pozitivní korelace epitelálních buněk ($R = 0,607$) ve vztahu k PSB.

I přes minimalizaci bakteriálního nálezu lze konstatovat, že PMN představují dominantní a téměř shodné zastoupení jak ve skupině NZ, tak VZ (76,3 vs. 73,3 %). Statisticky průkazný byl ve skupině s vyšším PSB ($\geq 500 \times 10^3/\text{ml}$) pokles lymfocytů (o téměř 81 %) a nárůst makrofágů (o 55,6 %), tyto změny ve variabilitě byly také podloženy korelační analýzou (*Příloha II*). Negativní závislost ku absolutní hodnotě PSB na hladině významnosti $\alpha < 0,001$ byla stanovena u lymfocytů ($R = -0,736$), oproti tomu pozitivní korelace byla pozorována v případě makrofágů ($R = 0,854$) viz Graf 8.

Graf 8. Bodový graf závislosti makrofágů (MF) a celkového počtu somatických buněk na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Dále byla opět vzata skupina vzorků Z ($n = 18$), tedy vzorků bez významného bakteriálního nálezu. Vzorky byly rozděleny opět dle mezní hodnoty PSB (skupina NZ $\leq 500 \times 10^3/\text{ml}$ a VZ $\geq 500 \times 10^3/\text{ml}$), a následně byly zhodnoceny vybrané parametry (Tabulka 22).

Bylo zjištěno statisticky průkazné prodloužení doby potřebné ke koagulaci mléka (tzv. syřitelnost) ve skupině VZ, tedy s vyšším PSB, než je stanovená limitní hodnota, oproti skupině NZ (248 vs. 169 s). Dále byl ve skupině VZ pozorován prokazatelný nárůst pH a opět se potvrdily rozdíly v obsahu chloridových iontů, jejichž nárůst byl pozorován znovu ve skupině s vyšším PSB ($m = 143,8$ mg/100 ml). Trend byl sledován i v poklesu laktózy mezi skupinami NZ a VZ (4,57 vs. 4,42 g/100 g), nicméně tyto rozdíly nebyly při sledované limitní hodnotě PSB (500×10^3 /ml) potvrzeny. Sharma et al. (2011) uvádí, že pokles laktózy v mléce s vysokým počtem somatických buněk způsobuje prodloužení doby kysání a celkové zhoršení hygienické nezávadnosti konečného produktu. Leitner et al. (2016) dodává, že vyšší PSB často vedly k výraznému snížení pevnosti sýřeniny. Negativní dopady přítomnosti vysokých PSB jsou často spjaty s kratší trvanlivostí a nežádoucími změnami organoleptických vlastností finálních mléčných výrobků, a to v důsledku enzymatické aktivity somatických buněk (Malik et al. 2018).

Tabulka 22. Rozdíly ve sledovaných parametrech koziho mléka skupiny Z (bez významného bakteriálního nálezu) rozdělené podle limitní hodnoty PSB 500×10^3 /ml a jednotlivých typů somatických buněk.

PSB/ml	$\leq 500 \times 10^3$			$\geq 500 \times 10^3$		
	skupina	NZ		VZ		
n	6			12		
parametr	<i>x</i>	<i>m</i>	SD	<i>x</i>	<i>m</i>	SD
epitel. buňky (%)	41,2	37,3	21,3	62,3	66,1	26,1
leukocyty (%)	58,8	62,7	21,3	37,7	33,9	26,1
lymfocyty (%)	15,0 ^b	14,2 ^b	8,1	4,5 ^a	2,9 ^a	4,1
makrofágy (%)	5,9 ^a	5,3 ^a	2,0	16,0 ^b	13,3 ^b	9,5
PMN (%)	76,3	77,2	11,6	73,3	75,0	11,4
tuk (g/100 g)	5,54	5,77	0,94	5,09	5,18	0,77
bílkoviny (g/100 g)	3,07	3,02	0,34	3,14	3,03	0,33
CN (g/100 g)	2,21	2,16	0,28	2,23	2,15	0,25
WP (g/100 g)	0,68	0,67	0,06	0,72	0,70	0,07
NPN (g/100 g)	0,19	0,19	0,01	0,19	0,19	0,01
laktóza (g/100 g)	4,57	4,59	0,18	4,42	4,60	0,51
SF (g/100 g)	13,8	14,0	1,2	13,3	13,3	1,0
chloridy (mg/100 ml)	131,4 ^a	131,0 ^a	5,1	146,5 ^b	143,8 ^b	10,8
nádoj (ml)	582	555	212	488	450	251
syřitelnost (s)	169 ^a	168 ^a	27	248 ^b	228 ^b	97
pH	6,44 ^a	6,4 ^a	0,17	6,62 ^b	6,61 ^b	0,16
titrační kyselost SH	5,01	4,90	0,88	4,56	4,45	0,57

Hodnoty označené odlišnými horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n- počet případů výběrového souboru; *x* – průměr; *m* – medián; SD – směrodatná odchylka; CN – kasein; WP – syrovátkové bílkoviny; NPN – dusíkaté látky nebílkovinného charakteru; SF – sušina; PSB – počet somatických buněk; PMN – polymorfonukleární neutrofilů

NZ – skupina Z (bez významného nálezu bakterií): stafylokoky do 40 KTJ a CPM do 100 KTJ) s PSB do $500 \times 10^3/\text{ml}$ mléka

VZ – skupina Z s PSB nad $500 \times 10^3/\text{ml}$ mléka

Rozdělením vzorků mlék bez bakteriálního nálezu do skupin s limitní hodnotou PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$ byly zjištěny průkazné rozdíly v distribuci lymfocytů a makrofágů. Ve skupině VZ s PSB $\geq 500 \times 10^3/\text{ml}$ byl statisticky zjištěn nižší podíl lymfocytů (pokles až o 80 %) a vyšší podíl makrofágů (nárůst o více než 60 %).

Dále byly stanoveny statisticky průkazné rozdíly v obsahu chloridů, syřitelnosti a pH, kdy ve skupině VZ došlo k nárůstu obsahu chloridů, prodloužení syřitelnosti a zvýšení pH. Tato zjištění nás utvrzují, že s různou úrovní PSB se může lišit i distribuce leukocytů. Tyto závěry jsou v souladu s literaturou, kdy např. v kravském mléce ze zdravé mléčné žlázy bylo prokázáno dominantní zastoupení PMN při nárůstu somatických buněk již nad hranici již $9 \times 10^3/\text{ml}$. Toto zjištění naznačuje, že zánětlivý proces by se mohl objevit i v případě výrazně nižšího PSB, než je legislativou určená mezní hodnota ($100 \times 10^3/\text{ml}$) (Schwarz et al. 2011). Rozdíly v distribuci leukocytů v mléce ze zdravé mléčné žlázy potvrzují i autoři (Damm et al. 2017; Alhussien et al. 2018). Boulaaba et al. (2011) např. potvrzuje pokles lymfocytů s nárůstem PSB ve skupinách mlék bez bakteriálního nálezu. Nicméně v případě koziho mléka existuje podstatně méně studií, které se danou problematikou zabývají.

Vzhledem k předchozím výsledkům byl dále podrobněji zkoumán vliv přítomnosti makrofágů (MF) a PMN buněk (Tabulka 23). V případě makrofágů byla nastavena limitní hodnota 9 % a u dominantních PMN buněk 76 %. Tyto stanovené limity vychází z hodnot uvedených v literatuře (Boulaaba et al. 2011; Malik et al. 2018) a rovněž souvisí s rozumným rozdělením vzorků do skupin dle bakteriálního nálezu.

V obou případech byl zaznamenán rozdíl v syřitelnosti pro jednotlivé skupiny. Mezi vzorky rozdělenými dle zastoupení makrofágů byl navíc významný rozdíl v celkovém obsahu PSB, kdy ve skupině pod s přítomností makrofágů pod 9 % byla stanovena absolutní hodnota PSB s mediánem $1410 \times 10^3/\text{ml}$ vs $363 \times 10^3/\text{ml}$. Ve stejné skupině stanoven prokazatelně vyšší výskyt chloridových iontů.

Absolutní hodnota PSB vykazující vliv na různé vlastnosti mléka ovšem komplikuje interpretaci závislosti těchto parametrů na zastoupení makrofágů v mléce. Na druhou stranu mezi skupinami vytvořenými dle PMN (76 %) nebyl stanoven statistický rozdíl v obsahu PSB.

Tabulka 23. Vybrané parametry koziho mléka ve vzorcích koziho mléka (bez významného bakteriálního zánětu) rozdělených dle zastoupení makrofágů (MF) a polymorfonukleárních neutrofilů (PMN).

skupina n parametr	MF < 9 %			MF > 9 %		
	x	m	SD	x	m	SD
PSB (10 ³ /ml)	500 ^a	363 ^a	306	1676 ^b	1410 ^b	738
syřitelnost (s)	201 ^a	175 ^a	108	243 ^b	232 ^b	62
tuk (g/100 g)	5,38	5,38	0,80	5,10	5,18	0,89
bílkoviny (g/100 g)	3,06	2,97	0,28	3,17	3,05	0,37
CN (g/100 g)	2,19	2,08	0,24	2,26	2,16	0,28
WP (g/100 g)	0,69	0,69	0,05	0,72	0,69	0,09
laktóza (g/100 g)	4,61	4,59	0,16	4,33	4,52	0,56
SF (g/100 g)	13,6	13,7	1,0	13,3	13,0	1,1
chloridy (mg/100 ml)	132,0 ^b	131,1 ^b	4,8	150,9 ^a	155,2 ^a	8,2
	PMN < 76 %			PMN > 76 %		
	x	m	SD	x	m	SD
PSB (10 ³ /ml)	1166	1042	911	966	855	691
syřitelnost (s)	255 ^b	224 ^b	97	170 ^a	175 ^a	34
tuk (g/100 g)	5,11	5,18	0,93	5,45	5,38	0,67
bílkoviny (g/100 g)	3,24 ^b	3,09 ^b	0,34	2,92 ^a	2,93 ^a	0,17
CN (g/100 g)	2,32 ^b	2,23 ^b	0,27	2,07 ^a	2,06 ^a	0,13
WP (g/100 g)	0,72	0,69	0,08	0,67	0,67	0,04
laktóza (g/100 g)	4,36	4,52	0,52	4,64	4,60	0,08
SF (g/100 g)	13,5	13,5	1,2	13,5	13,7	0,7
chloridy (mg/100 ml)	143,4	142,4	12,3	138,4	136,8	11,0

Hodnoty označené odlišnými horními indexy (a, b) jsou statisticky rozdílné ($p < 0,05$); n – počet případů výběrového souboru; x – průměr; m – medián; SD – směrodatná odchylka; CN – kasein; WP – syrovátkové bílkoviny; NPN – dusíkaté látky nebílkovinného charakteru; SF – sušina; PSB – počet somatických buněk; Vzorky bez významného nálezu mikroorganismů: stafylokoky do 40 KTJ a CPM do 100 KTJ; MF – makrofágy; PMN – polymorfonukleární leukocyty.

Ve skupině s vyšším zastoupením PMN byl jednoznačně prokázán pokles celkových bílkovin a kaseinů, přičemž nižší obsah kaseinů by mohl vysvětlovat zhoršení syřitelnosti, tedy zkrácení doby potřebné pro koagulaci mléka.

Z provedené korelace jednotlivých kaseinových frakcí ve vztahu k celkovému PSB sice vyplývá, že nebyla prokázána silná závislost, nicméně statisticky průkazně byla potvrzena ve vztahu ke kaseinovým frakcím. *Příloha III* podrobněji znázorňuje tyto závislosti. Lze konstatovat, že celkový obsah bílkovin negativně koreluje s PMN ($R = -0,825$; $\alpha = 0,001$). Kaseiny obecně potvrzují stejný trend jako celkové bílkoviny, o čemž vypovídá jejich velmi silná závislost ($R = -0,833$) na hladině významnosti $\alpha = 0,001$. Oproti tomu syrovátkové

bílkoviny vykazují pouze trend s makrofágy ve vztahu k pozitivní korelaci. Pozitivní korelační závislost byla stanovena jak pro bílkoviny, tak kaseiny ve vztahu k epitelíálním buňkám.

Prokazatelná korelační závislost byla stanovena v případě β -kaseinu. Tento kasein vykazoval negativní souvislost s PMN ($R = -0,601$), zatímco lymfocyty neměly prokazatelný vliv na změnu v zastoupení vybraných mléčných bílkovin.

Li et al. (2014) uvádí, že endogenní proteázy původem ze SB, jako jsou kathepsiny a elastáza jsou jednoznačně zodpovědné za hydrolýzu α_{S1} -kaseinu a v případě kozího mléka zejména β -kaseinu.

Získané výsledky potvrzují závěry předchozího roku, že již při mezní hodnotě PSB ($500 \times 10^3/\text{ml}$) byly zaznamenány významné změny v kvalitě mléka. S nárůstem somatických buněk v mléce je nutné brát v úvahu riziko jejich enzymatického aparátu, zejména proteolytických enzymů. Závěrem lze předpokládat, že pokles bílkovin, resp. kaseinů je pravděpodobně způsoben jejich hydrolýzou proteolytickými enzymy PMN, z nichž nejznámější je skupina kathepsinů (Moradi et al. 2021), které mohou zapříčinit změny v prodloužení doby potřebné ke koagulaci. Albenzio et al. (2015) navíc dodává, že kathepsin D v mléce souvisí s PSB.

Dále jsou tyto buňky, zejména makrofágy, zdrojem plazminogenu, který je schopen aktivovat plazmin, hlavní proteolytický enzym v mléce (Albenzio et al. 2015), nicméně aktivita plazminu byla dle autorů výraznější v kozím mléce s vyšším PSB ($> 1500 \times 10^3/\text{ml}$) a naopak aktivita katepsinu D byla stanovena v mléce s PSB v rozsahu ($700\text{--}1500 \times 10^3/\text{ml}$). Stejně tak epitelíální buňky mohou produkovat látky s enzymatickými účinky (Janjanam et al. 2013).

Aktivita těchto enzymů, stejně jako v mléce kravském narůstá se zvyšující se hodnotou PSB (Li et al. 2014) a s tím i potenciální změny v distribuci jednotlivých buněčných populací, což může vést ke změně technologických vlastností během výroby mléčných výrobků.

6. Závěr

Pochopení vztahu mezi somatickými buňkami (SB) a produkcí mléka vysoké kvality je klíčovým prvkem vedoucím k zajištění efektivnosti a ziskovosti mlékárenského průmyslu, což se týká především kozího mléka s jeho specifickou sekrecí. S rostoucími požadavky na kvalitu potravin je třeba klást důraz nejen na nutriční přínos, ale i na další hygienické, a technologické parametry mléka a výrobků z něj.

Cílem dané disertační práce bylo zjištění souvislostí a prohloubení znalostí mezi somatickými buňkami a kvalitou kozího mléka, zejména ve vztahu k vlastnostem, které souvisejí s mléčnou užitkovostí a další technologickou zpracovatelností mléka, ale i hledání spolehlivých markerů a cest, jak diagnostikovat zánětlivé, ale i nezánnětlivé onemocnění zvířete.

Shrnutí cílů:

- 1) Stanovit počet somatických buněk (PSB), mikrobiologickou kvalitu a základní složení jednotlivých vzorků mléka širokého souboru pokusných zvířat (koz) a dle vzájemných interakcí určit limitní hodnoty PSB pro splnění ostatních kvalitativních parametrů ovlivňujících úspěšnost technologického zpracování suroviny.

Během let 2020–2022 se podařilo získat dostatečné množství individuálních vzorků kozího mléka, u kterých byl stanoven počet SB, dále CPM a provedena byla také identifikace mastitidních patogenů. Kromě základního složení mléka (obsah tuku, bílkovin, kaseinů, laktózy, aj.) byly stanoveny další složky viz následující cíle. Rovněž byly provedeny základní technologické zkoušky (syřitelnost, termostabilita, pH apod.).

Stěžejním cílem práce bylo stanovit limitní hodnotu PSB, při které dochází ke změnám sledovaných parametrů za současné minimalizace ostatních faktorů (zdravotní stav, fáze a počet laktace, plemeno, krmná dávka), které by mohly daný vliv zkruslovat.

V roce 2020 byla nejdříve posuzována mikrobiologická kvalita mléka a následně byla z hlediska vyhodnocování dat stanovena i limitní hranice PSB dle které byly individuální vzorky kozího mléka rozděleny. Dle provedené rešerše byly nastaveny limitní hodnoty PSB v rozsahu $600\text{--}1000 \times 10^3/\text{ml}$. V dalším roce (2021) se podařilo snížit sledovanou limitní hodnotu PSB na $500 \times 10^3/\text{ml}$ a v roce 2022 došlo k ověření těchto závěrů a potvrzení změn zaznamenaných v minulém roce. Dále se podařilo rozšířit studium SB a zavést novou analytickou metodu pro stanovení diferenciálního počtu SB (cíl 3). Dle uvedených informací a výsledků lze konstatovat, že tento cíl byl splněn v celém jeho rozsahu.

- 2) Stanovit zastoupení minerálních látek, zejména sodných, draselných, vápenatých a chloridových iontů ve vztahu k hygienické kvalitě mléka.

V průběhu daného výzkumu byly úspěšně stanoveny vybrané minerální látky, pozornost byla věnována zejména obsahu vápenatých, draselných, sodných a chloridových iontů, u relativně širokého souboru individuálních vzorků zvířat. Tyto analyty byly dány do souvislosti a vyhodnoceny vzhledem k mikrobiologické kvalitě vzorků a limitním hodnotám PSB. Zejména stanovení chloridových iontů, jakožto jednoho z významných ukazatelů nežádoucích změn, přineslo prokazatelné informace o změnách probíhajících v kozím mléce viz (hypotéza 2).

- 3) Navrhnout a optimalizovat přípravu vzorku a instrumentální analytickou metodu stanovení diferenciálního počtu jednotlivých typů somatických buněk v kozím mléce.

Cílem bylo nalézt vhodnou, rychlou a efektivní metodu pro stanovení jednotlivých typů somatických buněk. Byla zavedena nová metoda ke kvantifikaci jednotlivých typů somatických buněk, tzv. diferenciálního počtu somatických buněk (DPSB) pomocí průtokové cytometrie, pomocí které je možné zhodnotit i životaschopnost somatických buněk v kozím mléce. Zavedená analytická metoda umožňuje rozpoznat jednotlivé typy somatických buněk, a to jak epitelální buňky, ale i lymfocyty, makrofágy (MF) či polymorfonukleární neutrofile (PMN). Analýza byla prováděna na základě standardního protokolu tzv. „doublet discrimination“, kdy dochází k odstranění shluků na základě porovnání specifických charakteristik píků (výška a šířka píku, signál) pro jednotlivé typy buněk. Nicméně zavedení vhodného protokolu specifických barviv a protilátek byla klíčovým faktorem k dosažení kýžených výsledků. Správnost metody bylo ověřeno pomocí obrazového cytometru (Image FC).

Zhodnocení hypotéz:

- 1) Zastoupení základních složek a dalších kvalitativních parametrů kozího mléka z mléčné žlázy bez významného nálezu bakteriálních patogenů, je značně ovlivněno počtem somatických buněk.

V roce 2020 byly prokázány změny v kvalitě individuálních vzorků kozích mlék již od limitní hodnoty PSB $600 \times 10^3/\text{ml}$ (pokles nádoje, trend ve zhoršení syžitelnosti), a to ve stádu s velmi dobrým standardem hygienické kvality mléka bez významné přítomnosti mastitidních bakterií v mléčné žláze (65 % vzorků). V rámci roku 2020 dominovaly jednoznačně environmentální bakterie (33,8 %). Oproti tomu v roce 2021 byl pozorován pokles mlék bez přítomnosti

mastitidních bakterií (43,1 %). Ve letech (2020–2022) byly dominantní environmentální bakterie s tím, že v roce 2021 a 2022 došlo k jejich nárůstu. Nejrozšířenější detekovanými patogeny byly koaguláza negativní stafylokoky. Mezi další často detekované patogeny patří *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Escherichia Coli*, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp. apod.

S rostoucí hodnotou PSB se dále zásadně měnila kvalita koziho mléka a nejvýznamnější rozdíly byly zjištěny pro limitní hodnotu $1000 \times 10^3/\text{ml}$. Ve skupině s vyšší hodnotou PSB než $1000 \times 10^3/\text{ml}$ byl prokázán zejména nárůst v obsahu bílkovin, kaseinů, dále byl zaznamenán pokles laktózy a došlo k prokazatelnému zhoršení termostability a syřitelnosti. Dalším rokem (2021) bylo navázáno na předchozí výsledky a limitní hodnoty byly nastaveny ještě přísněji. Za vzorky pocházející ze zdravé mléčné žlázy byly považovány ty, které splňovaly kritéria pro stafylokoky 50 KTJ/ml a CPM do 200 KTJ/ml. Při limitní hodnotě PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$ byly prokázány změny zejména v technologických parametrech mléka jako je zhoršení syřitelnosti či nárůst pH. Současně byl pozorován trend poklesu v obsahu tuku, bílkovin i laktózy ve skupině s vyšším PSB než $500 \times 10^3/\text{ml}$. Z těchto závěrů se lze domnívat, že prodloužení syřitelnosti nelze jednoznačně přisuzovat nárůstu bílkovin (rok 2020) a s největší pravděpodobností souvisí se změnami v obsahu chloridových iontů.

V roce 2022 došlo k ověření těchto závěrů, kdy byly nastaveny limity pro zdravou mléčnou žlázu (stafylokoky pod 40 KTJ/ml a CPM do 100 KTJ/ml). Znovu se podařilo potvrdit, že již hodnota PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$ je zásadní a dochází k různým kvalitativním změnám v mléce. Ve skupině s PSB vyšším než limitní hodnota $500 \times 10^3/\text{ml}$ byla výrazně prodloužena doba potřebná ke koagulaci a nárůst pH. **Dle dosažených výsledků byla hypotéza jednoznačně potvrzena.**

- 2) Změnami v hygienické kvalitě koziho mléka jsou ovlivňovány koncentrace minerálních látek.

V průběhu roku 2020 byl zaznamenán rozdíl ve skupině vzorků mlék rozdělených dle limitních mezí PSB 600×10^3 – $1000 \times 10^3/\text{ml}$, byl zjištěn vyšším obsah Na a Cl vždy ve skupině s vyšší hodnotou oproti skupině s nižší hodnotou PSB. Vyšší koncentrace NaCl v mléce je pravděpodobně spojována se zhoršujícími se technologickými vlastnostmi mléka, jako je delší doba srážení sýřeniny a její nižší pevnost. Nárůst sodných, chloridových, v některých případech i draselných iontů, se díky jejich dobré rozpustnosti projevuje zvýšením jejich obsahu v mléčném séru, což má nepochybně vliv na technologické vlastnosti mléka. Oproti tomu nebyly stanoveny statisticky průkazné rozdíly, pokud jde o výskyt Ca, P a Mg. Zmíněné minerální látky se nachází v mléce pouze ve formě vázané, nejčastěji ve formě fosforečnanů,

uhličitanů, chloridů apod. Vápník je navíc vázán na kaseinové bílkoviny. Tyto minerální látky jsou rozpustné pouze v různé míře (Alichandis et al. 2016).

V roce 2021 byl jednoznačně potvrzen nárůst sodných ($37,8 \text{ mg}/100 \text{ g}$) a chloridových iontů ($149 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) ve skupině nad limitní hodnotu PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$. Obdobný trend byl potvrzen v roce 2022 a lze tvrdit, že obsah sodných a chloridových iontů jednoznačně souvisí se změnami základních složek mléka a má vliv na zhoršení technologických vlastností mléka. Statistické rozdíly v zastoupení vápníku a fosforu nebyly jednoznačně potvrzeny, naměřené průměrné hodnoty se shodují s autory vědeckých studií. Lze se domnívat, že obsah Ca, Mg a P je ovlivněn podstatně méně hodnotou PSB. **Hypotéza byla potvrzena pouze částečně (pro ionty chloridové, sodné a draselné).**

3) Vyvinutá metoda je vhodná pro analýzu diferenciálního počtu somatických buněk v kozím mléce.

V neposlední řadě byla optimalizována metoda stanovení diferenciálního počtu somatických buněk v kozím mléce pomocí průtokové cytometrie. Ve skupině kozího mléka bez bakteriálního nálezu (Z) byl pozorován celkově nižší počet leukocytů ($44,74 \text{ vs. } 60,52 \%$) a k tomu vyšší výskyt epiteliálních buněk oproti skupině s bakteriálním nálezem (B). PMN buňky představovaly dominující typ leukocytů v mléce pocházejícím ze zdravé ($74,3 \%$), ale rovněž i infekcí napadené mléčné žlázy ($75,2 \%$). Dále byl ve skupině s vyšším PSB ($\geq 500 \times 10^3/\text{ml}$) statisticky průkazný pokles lymfocytů (o téměř 81%) a nárůst makrofágů (o $55,6 \%$).

Nejvýznamnějším zjištěním je souvislost vyšší hodnoty PMN buněk nad $76,0 \%$ v kozím mléce s prokazatelně nižším obsahem bílkovin, kaseinů a zkrácenou dobou syřitelnosti, což lze pravděpodobně přičíst proteolytické aktivitě enzymů PMN, z nichž nejznámější je kathepsin. Navíc mezi skupinami vytvořenými dle PMN (76%) nebyl zjištěn statistický rozdíl v obsahu celkového PSB. Potvrzuje se, že vybrané subpopulace somatických buněk v kozím mléce mohou mít vliv na složení a vlastnosti mléka. Na závěr je důležité uvést, že optimalizovaná metoda byla řádně ověřena pro analýzu kozího mléka a je vhodná pro dané použití. **Hypotéza byla potvrzena.**

Přínos pro praxi

PSB je opomíjeným faktorem, který sehrává podstatnou roli v úspěšnosti technologického zpracování kozího mléka, a to již od relativně nízkých hodnot PSB ($500 \times 10^3/\text{ml}$), jak bylo zjištěno v této práci. Důležité je také nezapomínat na významný vliv mastitidních bakterií, které

kolonizují mléčnou žlázu zvířat a mají vliv na kvalitu a technologické vlastnosti produkovaného mléka, a to i přes splněné hygienické limity bazénových vzorků kozího mléka.

Získané výsledky mohou pomoci k lepšímu a komplexnějšímu pochopení dané problematiky, což může ideálně vést ke zlepšení informovanosti farmářů či zpracovatelů mléka.

Vzhledem k bohatému enzymatickému aparátu SB se rovněž nabízí otázka, zda by nebylo vhodné zařadit do procesu výroby mléčných sýrů krok, jak účinně snížit somatické buňky z kozího mléka, např. centrifugací. Během skladování mléka může docházet k hydrolyze kaseinů působením proteolytických enzymů, které mohou negativně ovlivňovat zpracování mléka, včetně snížení výtěžnosti a způsobovat kvalitativní změny finálních mléčných výrobků. Problematika enzymů SB je složitým tématem a dosud neexistuje mnoho informací o celkovém přehledu a konkrétním působení všech enzymů. Vzhledem k vysokým počtům SB je tudíž třeba se tímto tématem dále zabývat.

Diferenciál somatických buněk by mohl být považován za nový účinný nástroj, jak lépe pochopit imunitní odpověď mléčné žlázy, diagnostikovat různé typy mastitid a dalších zánětlivých i nezáneťlivých onemocnění. Je patrné, že pro monitoring PSB a z toho plynoucí řízené kontroly jejich hodnot a dále pro prevenci výskytu infekcí mléčné žlázy, je vhodné provádět rutinní testy a podílet se na jejich zjednodušení a zrychlení.

7. Seznam použité literatury

- Aganga AA, Amarteifio JO, Nkile N. 2002. Effect of stage of lactation on nutrient composition in Tswana sheep and goat's milk. *Journal of Food Composition and Analysis* **15**:533–543.
- Albenzio M, Caroprese M. 2011. Differential leucocyte count for ewe milk with low and high somatic cell count. *Journal of Dairy Research* **78**:43–48.
- Albenzio M, Figliola L, Caroprese M, Marino R, Sevi A, Santillo A. 2019. Somatic cell count in sheep milk. *Small Ruminant Research* **176**:24–30.
- Albenzio M, Santillo A. 2011. Biochemical characteristics of ewe and goat milk: Effect on the quality of dairy products. *Small Ruminant Research* **101**:33–40.
- Albenzio M, Santillo A, Avondo M, Nudda A, Chessa S, Pirisi A, Banni S. 2016. Nutritional properties of small ruminant food products and their role on human health. *Small Ruminant Research* **135**:3–12.
- Albenzio M, Santillo A, Caroprese M, D'Angelo F, Marino R, Sevi A. 2009. Role of endogenous enzymes in proteolysis of sheep milk. *Journal of Dairy Science* **92**:79–86.
- Albenzio M, Santillo A, Caroprese M, Polito AN. 2017. Role of Milk From Small Ruminant Species on Human Health. Pages 435–440 in Watson RR, Collier RJ, Preedy VR, editors. *Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease*. Elsevier, Amsterdam.
- Albenzio M, Santillo A, Kelly AL, Caroprese M, Marino R, Sevi A. 2015. Activities of indigenous proteolytic enzymes in caprine milk of different somatic cell counts. *Journal of Dairy Science* **98**:7587–7594.
- Alhussien MN, Dang AK. 2018. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Veterinary World* **11**:562–577.
- Alichanidis E, Moatsou G, Polychroniadou A. 2016. Composition and Properties of Non-cow Milk and Products. Pages 81–116 in *Non-Bovine Milk and Milk Products*. Elsevier Inc. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803361-6.00005-3>.
- Almaas H, Cases AL, Devold TG, Holm H, Langsrud T, Aabakken L, Aadnoey T, Vegarud GE. 2006. In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal* **16**:961–968.
- Amigo L, Recio I, Ramos M. 2000. Genetic polymorphism of ovine milk proteins: Its influence on technological properties of milk - A review. *International Dairy Journal* **10**:135–149.

- Bagnicka E, Winnicka A, Jóźwik A, Rzewuska M, Strzałkowska N, Kościuczuk E, Prusak B, Kaba J, Horbańczuk J, Krzyzewski J. 2011. Relationship between somatic cell count and bacterial pathogens in goat milk. *Small Ruminant Research* **100**:72–77.
- Ballabio C, Chessa S, Rignanese D, Gigliotti C, Pagnacco G, Terracciano L, Fiocchi A, Restani P, Caroli AM. 2011. Goat milk allergenicity as a function of α S1-casein genetic polymorphism. *Journal of Dairy Science* **94**:998–1004.
- Bara-Herczegh O, Csanádi J, Török G. 2009. Investigation of the protein fractions in goat milk with RP-HPLC to optimize the milk processing. *Analele Universității din Oradea, Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie și Tehnologii de Industrie Alimentară* **11**:111–118.
- Barrón-Bravo OG, Gutiérrez-Chávez AJ, Ángel-Sahagún CA, Montaldo HH, Shepard L, Valencia-Posadas M. 2013. Losses in milk yield, fat and protein contents according to different levels of somatic cell count in dairy goats. *Small Ruminant Research* **113**:421–431.
- Bernacka H. 2007. Cytological Quality of Goat Milk on the Basis of the Somatic Cell Count. *Jakość Cytologiczna Mleka Kóz Na Podstawie Zawartości Komórek* **7**:773–778.
- Biadała A, Konieczny P. 2018. Goat's milk-derived bioactive components - A review. *Mljekarstvo* **68**:239–253.
- Bogdanovičová K, Marcela V-K, Vladimír B, Libor K, Ivana K, Renáta K. 2016. Microbiological quality of raw milk in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Sciences* **34**:189–196.
- Bordin G, Cordeiro Raposo F, De La Calle B, Rodriguez AR. 2001. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **928**:63–76.
- Boulaaba A, Grabowski N, Klein G. 2011. Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. *Small Ruminant Research* **97**:117–123.
- Boutinaud M, Jammes H. 2002. Potential uses of milk epithelial cells: A review. *Reproduction Nutrition Development* **42**:133–147.
- Bramanti E, Sortino C, Raspi G. 2002. New chromatographic method for separation and determination of denatured α S1-, α S2-, β - and κ -caseins by hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* **958**:157–15766.
- Buffoni JN, Bonizzi I, Pauciullo A, Ramunno L, Feligini M. 2011. Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Food Chemistry* **127**:1515–1520.

- Ceballos LS, Morales ER, de la Torre Adarve G, Castro JD, Martínez LP, Sampelayo MRS. 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis* **22**:322–329.
- Claeys WL, et al. 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* **31**:251–262.
- Clark S, Mora García MB. 2017. A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science* **100**:10026–10044.
- Clark S, Sherbon JW. 2000. Alpha_{S1}-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research* **38**:123–134.
- Contreras A, Luengo C, Sánchez A, Corrales JC. 2003. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livestock Production Science* **79**:273–283.
- Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* **68**:145–153.
- Dalgleish DG. 2011. On the structural models of bovine casein micelles - Review and possible improvements. *Soft Matter* **7**:2265–2272.
- Damm M, Holm C, Blaabjerg M, Bro MN, Schwarz D. 2017. Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *Journal of Dairy Science* **100**:4926–4940.
- Desobry-Banon S, Richard F, Hardy J. 1994. Study of Acid and Rennet Coagulation of High Pressurized Milk. *Journal of Dairy Science* **77**:3267–3274.
- El-Sayed MMH, Chase HA. 2011. Trends in whey protein fractionation. *Biotechnology Letters* **33**:1501–1511.
- EU. 2004. Regulation (EC) no 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of European Union*. L 139.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Available from <https://www.fao.org/faostat/en/#data> (accessed March 2023).
- Fantová M. 2015. Chov koz. 4. vydání. Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovčí a koz, z.s. vydalo nakladatelství Brázda, Praha.
- Farschtschi S, Mattes M, Hildebrandt A, Chiang D, Kirchner B, Kliem H, Pfaffl MW. 2021. Development of an advanced flow cytometry based high-resolution immunophenotyping method to benchmark early immune response in dairy cows. *Nature* **11**:1–13.
- FDA. 2017. US Department of Health and Human Services. Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and

- Drug Administration. Available from <https://www.fda.gov/media/114169/download> (accessed March 2023).
- Ferro MM, Tedeschi LO, Atzori AS. 2017. The comparison of the lactation and milk yield and composition of selected breeds of sheep and goats. *Translational Animal Science* **1**:498–506.
- Fox PF. 2009. *Dairy Chemistry And Biochemistry*. 2. vydání. Springer, New York.
- Gelasakis AI, Angelidis A, Giannakou R, Arsenos G. 2018. Bacterial subclinical mastitis and its effect on milk quality traits in low-input dairy goat herds. *Veterinary Record* **183**:449–458.
- Goetsch AL, Zeng SS, Gipson TA. 2011. Factors affecting goat milk production and quality. *Small Ruminant Research* **101**:55–63.
- Gonçalves JL, Kamphuis C, Martins CMMR, Barreiro JR, Tomazi T, Gameiro AH, Hogeveen H, dos Santos M V. 2018. Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. *Livestock Science* **210**:25–32.
- Foxx PF, Guinee TP, Cogann TM, Mcsweeney PLH. 2017. *Fundamentals of Cheese Science* Second Edition. Springer. New York.
- Hagnestam-Nielsen C, Emanuelson U, Berglund B, Strandberg E. 2009. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *Journal of Dairy Science* **92**:3124–3133.
- Ham JS, Lee SG, Jeong SG, Oh MH, Kim DH, Park YW. 2010. Characteristics of Korean-Saanen goat milk caseins and somatic cell counts in comparison with Holstein cow milk counterparts. *Small Ruminant Research* **93**:202–205. *Ruminant Research* **93**:202–205.
- Hamed H, El Feki A, Gargouri A. 2008. Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant factors. *Comptes Rendus - Biologies* **331**:144–151.
- Hamed H, Trujillo AJ, Juan B, Guamis B, ElFeki A, Gargouri A. 2012. Interrelationships between somatic cell counts, lactation stage and lactation number and their influence on plasmin activity and protein fraction distribution in dromedary (*Camelus dromedaries*) and cow milks. *Small Ruminant Research* **105**:300–307.
- Hodgkinson AJ, Wallace OAM, Smolenski G, Prosser CG. 2019. Gastric digestion of cow and goat milk: Peptides derived from simulated conditions of infant digestion. *Food Chemistry* **276**:619–625.
- Horne DS. 2002. Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **7**:456–461.
- Hussein HA, Fouad MT, Abd El-Razik KA, Abo El-Maaty AM, D'Ambrosio C, Scaloni A, Gomaa AM. 2020. Study on prevalence and bacterial etiology of mastitis, and effects of

- subclinical mastitis and stage of lactation on SCC in dairy goats in Egypt. *Tropical Animal Health and Production* **52**:3091–3097.
- 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.
- Chen H, Wooten H, Thompson L, Pan K. 2019. Nanoparticles of casein micelles for encapsulation of food ingredients. Pages 39–68 in *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*. Elsevier.
- Chia J, Burrow K, Carne A, McConnell M, Samuelsson L, Day L, Young W, Bekhit AEDA. 2017. Pages 345–362 in Watson ER, Collier J, Victor R, editors. *Minerals in Sheep Milk. Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease*. Elsevier Inc. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128097625000279#abs0010> (accessed March 2023).
- Ingham B, Smialowska A, Kirby NM, Wang C, Carr AJ. 2018. A structural comparison of casein micelles in cow, goat and sheep milk using X-ray scattering. *Soft Matter* **14**:3336–3343.
- International Conference on Harmonization (ICH). 1996. *Guideline on the validation of analytical procedures: Methodology Q2B*. Geneva.
- Janjanam J et al. 2013. Proteome analysis of functionally differentiated bovine (*Bos indicus*) mammary epithelial cells isolated from milk. *Proteomics* **13**:3189–3204.
- Jimenez-Granado R, Sanchez-Rodriguez M, Arce C, Rodriguez-Estevez V. 2014. Factors affecting somatic cell count in dairy goats: A review. *Spanish Journal of Agricultural Research* **12**:133–150.
- Kalyankar SD, Khedkar CD, Patil AM. 2015. Goat: Milk. Pages 256-260 in Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, editors. *Encyclopedia of Food and Health*, 1st edition. Elsevier, Amsterdam.
- Kelly AL, O’Flaherty F, Fox PF. 2006. Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. *International Dairy Journal* **16**:563–572.
- Kilara A, Vaghela MN. 2017. Whey proteins. Page Proteins in Food Processing: Second Edition Second Edi. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X>.
- Kimpel F, Schmitt JJ. 2015. Review: Milk Proteins as Nanocarrier Systems for Hydrophobic Nutraceuticals. *Journal of Food Science* **80**:2361–2366.

- Koess C, Hamann J. 2008. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *Journal of Dairy Research* **75**:225–232.
- Kondyli E, Katsiari MC, Voutsinas LP. 2007. Variations of vitamin and mineral contents in raw goat milk of the indigenous Greek breed during lactation. *Food Chemistry* **100**:226–230.
- Kondyli E, Svarnas C, Samelis J, Katsiari MC. 2012. Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. *Small Ruminant Research* **103**:194–199.
- 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.
- Leitner G, Lavon Y, Matzrafi Z, Benun O, Bezman D, Merin U. 2016. Somatic cell counts, chemical composition and coagulation properties of goat and sheep bulk tank milk. *International Dairy Journal* **58**:9–13.
- Leitner G, Merin U, Lavi Y, Egber A, Silanikove N. 2007. Aetiology of intramammary infection and its effect on milk composition in goat flocks. *Journal of Dairy Research* **74**:186–193.
- Leitner G, Merin U, Silanikove N. 2004. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *Journal of Dairy Science* **87**:1719–1726.
- Lianou DT, Michael CK, Vasileiou NGC, Liagka DV, Mavrogianni VS, Caroprese M, Fthenakis GC. 2021. Association of breed of sheep or goats with somatic cell counts and total bacterial counts of bulk-tank milk. *Applied Sciences* **11** (e7356) DOI: 10.3390/app11167356.
- Li N, Richoux R, Boutinaud M, Martin P, Gagnaire V. 2014. Role of somatic cells on dairy processes and products: A review. *Dairy Science and Technology* **94**:517–538.
- Li N, Richoux R, Perruchot MH, Boutinaud M, Mayol JF, Gagnaire V. 2015. Flow cytometry approach to quantify the viability of milk somatic cell counts after various physico-chemical treatments. *PLoS ONE* **10**:1–15.
- Mahmoud NMA, M EZIE, Fadlemoula AA, Adv JAP, Al MET. 2014. Effect of Stage of Lactation on Milk Yield and Composition of First Kidder Damascus does in the Sudan Effect of Stage of Lactation on Milk Yield and Composition of First Kidder Damascus does in the Sudan **4**:355–362.

- Malik TA, Mohini M, Mir SH, Ganaie BA, Singh D, Varun TK, Howal S, Thakur S. 2018. Somatic cells in relation to udder health and milk quality-A review. *Journal of Animal Health and Production* **6**:18–26.
- Marletta D, Criscione A, Bordonaro S, Guastella AM, D'Urso G. 2007. Casein polymorphism in goat-s milk. *Dairy Science and Technology* **87**:491–504.
- Martin P, Szymanowska M, Zwierzchowski L, Leroux C. 2002. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reproduction Nutrition Development* **42**:433–459.
- Masoodi TA, Shafi G. 2010. Analysis of casein alpha S1 & S2 proteins from different mammalian species. *Bioinformation* **4**:430–435.
- McMahon DJ, Oommen BS. 2008. Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science* **91**:1709–1721.
- Mehdid A, Martí-De Olives AM De, Fernández N, Rodríguez M, Peris C. 2019. Effect of stress on somatic cell count and milk yield and composition in goats. *Research in Veterinary Science* **125**:61–70.
- Mehne D, Drees S, Schuberth H-J, Sauter-Louis C, Zerbe H, Petzl W. 2010. Accurate and rapid flow cytometric leukocyte differentiation in low and high somatic cell count milk. *Milchwissenschaft* **65**:235-238.
- Mestawet TA, Girma A, Ådnøy T, Devold TG, Narvhus JA, Vegarud GE. 2012. Milk production, composition and variation at different lactation stages of four goat breeds in Ethiopia. *Small Ruminant Research* **105**:176–181.
- Ministerstvo zemědělství. 2017. Vyhláška č. 445/2017 Sb. ze dne 12. prosince 2017, kterou se mění vyhláška č. 128/2009 Sb., o přizpůsobení veterinárních a hygienických požadavků pro některé potravinářské podniky, v nichž se zachází se živočišnými produkty, ve znění vyhlášky č. 191/2013 Sb. Available from <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2017-445> (accessed March 2023).
- Modrackova N, Stovicek A, Burtscher J, Bolechova P, Killer J, Domig KJ, Neuzil-Bunesova V. 2021. The bifidobacterial distribution in the microbiome of captive primates reflects parvorder and feed specialization of the host. *Nature* **11** (e15273) DOI: 10.1038/s41598-021-94824-y.
- Montalbano M, Segreto R, Di Gerlando R, Mastrangelo S, Sardina MT. 2016. Quantitative determination of casein genetic variants in goat milk: Application in Girgentana dairy goat breed. *Food Chemistry* **192**:760–764.

- Moradi M, Omer AK, Razavi R, Valipour S, Guimarães JT. 2021, February 1. The relationship between milk somatic cell count and cheese production, quality and safety: A review. *International Dairy Journal* 113 (104884) DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104884.
- Musayeva K, Sederevičius A, Želvyte R, Monkevičiene I, Beliavska-Aleksiejune D, Stankevičius R. 2016. Relationship between somatic cell count and milk casein level obtained by two different methods. *Czech Journal of Food Sciences* 34:47–51.
- Nayik GA, Jagdale YD, Gaikwad SA, Devkatte AN, Dar AH, Ansari MJ. 2022. Nutritional Profile, Processing and Potential Products: A Comparative Review of Goat Milk. *Dairy* 3:622–647.
- Norman HD, Guinan, FL, Megonigal JH (jr.), Dürr J. 2021. Milk somatic cell count from Dairy Herd Improvement herds during 2021. Council on Dairy Cattle Breeding Research Report. 2-22. Available from <https://queries.uscdcb.com/publish/dhi/current/sccx.html> (accessed February 2023).
- Novac CS, Andrei S. 2020. The impact of mastitis on the biochemical parameters, oxidative and nitrosative stress markers in goat's milk: A review. *Pathogens* 9:1–23.
- Oftedal OT. 2012. The evolution of milk secretion and its ancient origins. *Animal* 6:355–368.
- Olechnowicz J, Sobek Z. 2008. Factors of variation influencing production level, SCC and basic milk composition in dairy goats. *Journal of Animal and Feed Sciences* 17:41–49.
- Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7:109–121.
- Park YW. 2017. Nutritional and Chemical Composition of Goat Milk. Pages 34–58 in Park YW, Haenlein FW, Wendorff WL, editors. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. John Wiley & Sons Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119110316> (accessed March 2023).
- Park YW, Haenlein GFW. 2008. Overview of Milk of Non-Bovine Mammals. Pages 11–33 in Park YW, Haenlein GFW, editors. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Blackwell Publishing Ltd. Available from <https://www.wiley.com/endk/Handbook+of+Milk+of+Non+Bovine+Mammals,+2nd+Edition-p-9781119110279> (accessed March 2023).
- Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68:88–113.
- Paterna A, Contreras A, Gómez-Martín A, Amores J, Tatay-Dualde J, Prats-van der Ham M, Corrales JC, Sánchez A, De la Fe C. 2014. The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats. *Small Ruminant Research* 121:36–41.

- Paape MJ, Wiggans GR, Bannerman DD, Thomas DL, Sanders AH, Contreras A, Moroni P, Miller RH. 2007. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research* **68**:114–125.
- Pazzola M, Stocco G, Dettori ML, Bittante G, Vacca GM. 2019. Effect of goat milk composition on cheesemaking traits and daily cheese production. *Journal of Dairy Science* **102**:3947–3955.
- Pereira PC. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* **30**:619–627.
- Perinelli DR, Bonacucina G, Cespi M, Bonazza F, Palmieri GF, Pucciarelli S, Polzonetti V, Attarian L, Polidori P, Vincenzetti S. 2019. A comparison among β -caseins purified from milk of different species: Self-assembling behaviour and immunogenicity potential. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **173**:210–216.
- Permyakov EA, Berliner LJ. 2000. α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters* **473**:269–274.
- Petrotos K, Tsakali E, Goulas P, D'Alessandro AG. 2014. Casein and Whey Proteins in Human Health. Pages 94–146 in Kanekanian A, editor. *Milk and Dairy Products as Functional Foods*. John Wiley & Sons Ltd. Available from *Casein and Whey Proteins in Human Health - Milk and Dairy Products as Functional Foods - Wiley Online Library* (accessed March 2023).
- Pham CTN. 2006. Neutrophil serine proteases: Specific regulators of inflammation. *Nature Reviews Immunology* **6**:541–550.
- Piredda Agenzia G, Pirisi A. 2004. Pages 110–116 in Pirisi A, editor. *Production and quality of sheep and goat milk – prospects for their improvement*. Special Issue of the International Dairy Federation.
- Pirisi A, Lauret A, Dubeuf JP. 2007. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Ruminant Research* **68**:167–178.
- Podhorecká K, Borková M, Šulc M, Seydlová R, Dragounová H, Švejcarová M, Peroutková J, Elich O. 2021. Somatic cell count in goat milk: An indirect quality indicator. *Foods* **10**:1–11.
- Quintas H, Margatho G, Rodríguez-Estévez, Simões J. 2018. Sustainable Goat Production in Adverse Environments. Pages 393–405 in Simões J, Gutiérrez, editors. *Sustainable Goat Production in Adverse Environments*. Springer Cham.

- Rafiq S, Huma N, Pasha I, Sameen A, Mukhtar O, Khan MI. 2016. Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **29**:1022–1028.
- Ranadheera CS et al. 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.
- Raynal-Ljutovac K, Pirisi A, de Crémoux R, Gonzalo C. 2007. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research* **68**:126–144.
- Recio I, de la Fuente MA, Juaréz M, Ramos M. 2009. Bioactive Components in Sheep Milk. Pages 83–104 in Park YW, editor. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. John Wiley & Sons, Singapore.
- Ribeiro AC, Ribeiro SDA. 2010. Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research* **89**:225–233.
- Ribeiro JC, Tamanini R, Corrêa Da Silva LC, Beloti V. 2015. Quality of milk produced by small and large dairy producers. *Semina: Ciências Agrárias* **36**:883–888.
- Robitaille G, Ayers C. 1995. Effects of κ -casein glycosylation on heat stability of milk. *Food Res. Int.* **28**:17–21.
- Rupp, et al. 2019. Divergent selection on milk somatic cell count in goats improves udder health and milk quality with no effect on nematode resistance. *Journal of Dairy Science* **102**:5242–5253.
- 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.
- Seydlová R, Dragounová H. 2017. Faktory ovlivňující počet somatických buněk v mléce malých přežvýkavců, ovcí a koz. *Náš chov* **12**:45–47.
- Shah A, Darzi MM, Kamil SA, Mir MS, Maqbool R, Kashani B, Wani H, Bashir A, Dar AA. 2017. Somatic cell alteration in healthy and mastitic milk of sheep and goats. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **5**:27–33.
- Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. 2011. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences* **24**:429–438.
- Schwarz D, Diesterbeck US, König S, Brügemann K, Schlez K, Zschöck M, Wolter W, Czerny CP. 2011. Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory

- reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science* **94**:5033–5044.
- Silanikove N, Leitner G, Merin U. 2016. Influence of Animal Health, Breed, and Diet on Non-cow Milk Composition. Pages 61-79 in Tsakalidou E, Papadimitriou K, editors. *Non-Bovine Milk and Milk Products*. Elsevier, Amsterdam.
- Silanikove N, Leitner G, Merin U, Prosser CG. 2010. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research* **89**:110–124.
- Silanikove N, Merin U, Shapiro F, Leitner G. 2014. Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality. *Journal of Dairy Science* **97**:3449–3455.
- Silva AE (jr.), Vasconcelos PC, Saraiva MMS, Filho LS, Silva NMV, Givisiez PEN, Oliveira CJB. 2021. Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus* spp. contaminating raw goat milk. *Veterinary World* **14**:1074–1079.
- Simões J, Bauer A. 2018. Reproductive and Milk Production Profiles in Serrana Goats. Pages 233–244 in in Simões J, Gutiérrez, editors. *Sustainable Goat Production in Adverse Environments*. Springer, Cham.
- Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. 1997. Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science* **80**:1851–1865.
- 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.
- Stocco G, Pazzola M, Dettori ML, Cipolat-Gotet C, Summer A, Vacca GM. 2019. Variation in caprine milk composition and coagulation as affected by udder health indicators. *International Dairy Journal* **98**:9–16.
- Stocco G, Pazzola M, Dettori ML, Paschino P, Bittante G, Vacca GM. 2018. Effect of composition on coagulation, curd firming, and syneresis of goat milk. *Journal of Dairy Science* **101**:9693–9702.
- Stocco G, Summer A, Cipolat-Gotet C, Zanini L, Vairani D, Dadousis C, Zecconi A. 2020. Differential somatic cell count as a novel indicator of milk quality in dairy cows. *Animals* **10** (753) DOI: 10.3390/ani10050753.
- Stuhr T, Aulrich K. 2010. Intramammary infections in dairy goats: Recent knowledge and indicators for detection of subclinical mastitis. *Landbauforschung Volkenrode* **60**:267–280.

- Tamime AY, Wszolek M, Božanić R, Özer B. 2011. Popular ovine and caprine fermented milks. *Small Ruminant Research* **101**:2–16.
- Tarola AM, Preti R, Girelli AM, Campana P. 2019. Recent Advances in the Valorization of Goat Milk: Nutritional Properties and Production Sustainability. *Nutrition and Food Engineering* **13**:183–188.
- Thomä-Worringer C, Sørensen J, López-Fandiño R. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal* **16**:1324–1333.
- Turkmen N. 2017. The Nutritional Value and Health Benefits of Goat Milk Components. Pages 441–449 in Watson RR, Collier RJ, Preedy VR, editors. *Nutrients in Dairy and their Implications for Health and Disease*. Elsevier, Amsterdam.
- Turovsky T, Khalfin R, Kababya S, Schmidt A, Barenholz Y, Danino D. 2015. Celecoxib Encapsulation in β -Casein Micelles: Structure, Interactions, and Conformation. *Langmuir* **31**:7183–7192.
- Vacca GM, Stocco G, Dettori ML, Pira E, Bittante G, Pazzola M. 2018. Milk yield, quality, and coagulation properties of 6 breeds of goats: Environmental and individual variability. *Journal of Dairy Science* **101**:7236–7247.
- Vargas-Bello-Pérez E, Márquez-Hernández RI, Hernández-Castellano LE. 2019. Bioactive peptides from milk: Animal determinants and their implications in human health. *Journal of Dairy Research* **86**:136–144.
- Verraes C, Claeys W, Cardoen S, Daube G, De Zutter L, Imberechts H, Dierick K, Herman L. 2014. A review of the microbiological hazards of raw milk from animal species other than cows. *International Dairy Journal* **50**:32–44.
- 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.
- Vieitez I, Irigaray B, Callejas N, González V, Gimenez S, Arechavaleta A, Grompone M, Gámbaro A. 2016. Composition of fatty acids and triglycerides in goat cheeses and study of the triglyceride composition of goat milk and cow milk blends. *Journal of Food Composition and Analysis* **48**:95–101.
- Vostra-Vydrova H, Hofmanova B, Moravcikova N, Rychtarova J, Kasarda R, Machova K, Brzakova M, Vostry L. 2020. Genetic diversity, admixture and the effect of inbreeding on milk performance in two autochthonous goat breeds. *Livestock Science* **240**:104–63.
- Walstra P, Jenness R. 1984. *Dairy Chemistry and Physics*. John Wiley & Sons, New York.

- Wang X, Zhao X, Huang D, Pan X, Qi Y, Yang Y, Zhao H, Cheng G. 2017. Proteomic analysis and cross species comparison of casein fractions from the milk of dairy animals. *Scientific Reports* **7**:1–9.
- Wedholm A, Hallén E, Bach Larsen L, Lindmark-Månsson H, Hans Karlsson A, Allmere T. 2006. Comparison of milk protein composition in a Swedish and a Danish dairy herd using reversed phase HPLC. *Acta Agriculturae Scandinavica A: Animal Sciences* **56**:8–15.
- Yuksel Z, Avci E, Uymaz B, Erdem YK. 2012. General composition and protein surface hydrophobicity of goat, sheep and cow milk in the region of Mount Ida. *Small Ruminant Research* **106**:137–144.
- Zamuner F, DiGiacomo K, Cameron Awn, Leury BJ. 2020. Effects of month of kidding, parity number, and litter size on milk yield of commercial dairy goats in Australia. *Journal of Dairy Science* **103**:954–964.
- Zhuang Y, Ueda I, Kulozik U, Gebhardt R. 2018. Influence of β -lactoglobulin and calcium chloride on the molecular structure and interactions of casein micelles. *International Journal of Biological Macromolecules* **107**:560–566.

8. Technické normy

- ČSN 57 0530. 1972. Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Úřad pro normalizaci a měření, Praha.
- ČSN ISO 17997-1. 2006. Mléko – Stanovení obsahu kaseinového dusíku – Část 1: Nepřímá metoda (Referenční metoda). Český normalizační institut, Praha.
- ČSN ISO 6731. 2011. Mléko, smetana a zahuštěné neslazené mléko – Stanovení obsahu celkové sušiny (Referenční metoda). Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.
- ČSN EN ISO 1211. 2011. Mléko – Stanovení obsahu tuku – Vážková metoda (Referenční metoda). Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.
- ČSN EN ISO 8968-1. 2014. Mléko a mléčné výrobky – Stanovení obsahu dusíku – Část 1: Metoda podle Kjeldahla a výpočet hrubého proteinu. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.
- ČSN EN ISO 4833-1. 2014. Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.
- IDF 79-2. 2002. Dried milk ice-mixes and processed cheese – Determination of lactose content, Part 2: Enzymatic method utilizing the galactose moiety of the lactose. International Dairy Federation, Brussels.

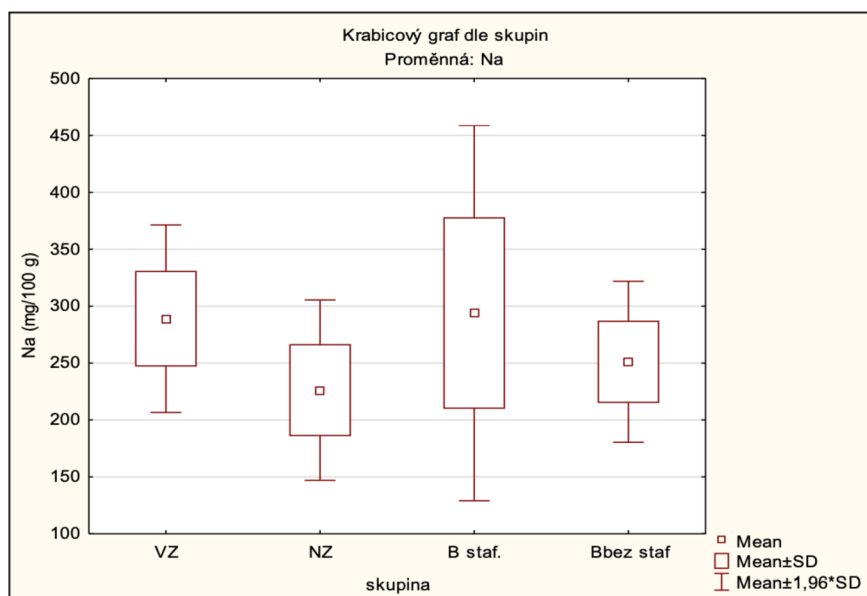
9. Seznam použitých zkratek

α -kasein	alfa-kasein
β -kasein	beta-kasein
CLA	konjugovaná linolová kyselina
CN	kaseinové bílkoviny (<i>casein</i>)
CNS	koaguláza negativní stafylokoky
CMP	kaseinomakropeptid
CPM	celkový počet mikroorganismů
ČSN	česká technická norma
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSCC	diferenciální počet somatických buněk
EP	Evropský Parlament
FSC	přední rozptyl (<i>forward scatter</i>)
ICP-OES	metoda optické emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou
IMI	intramamární infekce
HCl	chlorovodíková kyselina
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
κ -kasein	kappa-kasein
KTJ	kolonie tvořící jednotky
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
<i>m</i>	medián
MO	mikroorganismy
MS	hmotnostní spektrometrie
<i>n</i>	počet případů souboru dat
NPN	nebílkovinné dusíkaté látky (<i>non-protein nitrogen</i>)
PK-	koaguláza negativní
PMN	polymorfonukleární neutrofilny
PSB	počet somatických buněk
ROS	reaktivní forma kyslíku
R^2	Koeficient determinace
rpm	otáčky za minutu (<i>revolutions per minute</i>)
SB	somatické buňky

SD	směrodatná odchylka
SCC	boční rozptyl (<i>side scatter</i>)
SH	Soxhlet-Henkel
SNF	tukuprostá sušina
TFA	trifluoroctová kyselina
TOF	detektor doby letu (<i>time of flight detector</i>)
TS	celková sušina
UDP	uridindifosfát
WP	syrovátkové bílkoviny (<i>whey proteins</i>)
\bar{x}	průměr

10. Přílohy

Příloha I. Porovnání obsahu chloridových iontů (mg/100 ml) v různých skupinách vzorků dle stanovených kritérií (PSB $500 \times 10^3/\text{ml}$) a bakteriálního nálezu (rok 2020).



Příloha II. Korelace jednotlivých buněčných populací a celkového PSB (rok 2022).

proměnná	PSB ($\times 10^3/\text{ml}$)	mrtvé buňky	živé buňky	epitel. buňky	leukocyty	LY	MF	PMN
mrtvé buňky	-0,220	1,000	-1,000***	-0,541*	0,541*	0,021	-0,152	0,268
živé buňky	0,220	-1,000***	1,000	0,541*	-0,541*	-0,021	0,152	-0,268
epitel. buňky	0,607**	-0,541*	0,541*	1,000	-1,000***	-0,255	0,607**	-0,623*
leukocyty	-0,607**	0,541*	-0,541*	-1,000***	1,000	0,255	-0,607**	0,623*
LY	-0,736***	0,021	-0,021	-0,255	0,255	1,000	-0,572*	-0,137
MF	0,854***	-0,152	0,152	0,607**	-0,607**	-0,572*	1,000	-0,628*
PMN	-0,382	0,268	-0,268	-0,623**	0,623**	-0,137	-0,628**	1,000

LY – lymfocyty; MF – makrofágy; PMN – polymorfonukleární neutrofil; PSB – počet somatických buněk;
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Příloha III. Korelační analýza základních složek mléka s jednotlivými typy somatických buněk (rok 2022).

proměnná	epitel. buňky	LY	MF	PMN
nádoj	-0,522*	0,279	-0,437	0,499*
tuk	-0,184	0,351	-0,510*	0,186
bílkoviny	0,565*	0,201	0,443	-0,825***
CN	0,570*	0,258	0,422	-0,833***
WP	0,471	0,009	0,437	-0,686**
laktóza	-0,398	0,228	-0,745**	0,596*
TS	-0,066	0,408	-0,487	0,034
α_{S1} -CN	0,174	-0,098	-0,044	0,108
α_{S2} -CN	0,416	-0,129	0,229	-0,477
β -CN	0,299	0,174	0,325	-0,601*
κ -CN	-0,221	0,430	-0,213	-0,147

CN -kasein; WP – syrovátkové bílkoviny; TS – celková sušina; LY - lymfocyty; MF – makrofágy; PMN – polymorfonukleární neutrofil; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001