

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Enzymatické a antimikrobiální vlastnosti kozího mléka

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Aneta Špínová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Tereza Michlová, Ph. D.

Konzultant: Ing. Klára Podhorecká

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Enzymatické a antimikrobiální vlastnosti kozího mléka" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Tereze Michlové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za cenné rady, které mi poskytla během tvorby práce. Dále velmi děkuji Ing. Kláře Podhorecké, konzultantce mé diplomové práce, která mi věnovala mnoho času a trpělivosti během posledního ročníku, a to především v činnostech týkajících se praktické části. Poděkování patří rovněž mé rodině, přítelovi a nejlepší kamarádce, kteří mě velmi podporovali během celého studia.

Enzymatické a antimikrobiální vlastnosti kozího mléka

Souhrn

Během posledního desetiletí se zvýšila celosvětová poptávka po kozím mléce více než dvakrát a předpokládá se, že do roku 2030 dojde ke zvýšení o dalších 53 %. Kozí mléko, ať už přímo či ve formě mléčných produktů, představuje vysoce nutričně hodnotnou potravinu. Lze ho považovat za zdroj makro i mikronutrientů, ale také řady účinných látek, které hrají významnou roli jak ve výživě, tak ve zdraví spotřebitelů. Kromě základních mléčných komponent disponuje kozí mléko obsahem proteolytických enzymů, které jsou významné při určování jakosti mléka a mléčných produktů. Endogenní enzymy jsou nativní enzymy mléka, jež pocházejí ze somatických buněk, krevní plazmy či povrchových vrstev tukových kuliček. Exogenní enzymy jsou produkovány mikroorganismy, které se dostávají do mléka za nevhodných hygienických podmínek. Řada nativních enzymů se podílí na přirozeném antimikrobiálním systému mléka. Současně však mohou mít tyto látky významný vliv na kvalitu a senzorické vlastnosti mléka a mléčných produktů během skladování. Termostabilní proteolytické enzymy produkované psychrotrofními bakteriemi a stejně tak tepelně odolné nativní proteázy, mají největší vliv na znehodnocení mléčných výrobků z důvodu degradace proteinů, jejíž následkem dochází ke snížení výtěžnosti produktů.

Kozí mléko obsahuje významné látky s antimikrobiálním účinkem jako je laktoferin a lysozym. Koncentrace těchto látek v kozím mléce se zvyšuje při mastitidě a souvisí s počtem somatických buněk. Somatické buňky, stejně jako mikrobiální profil syrového mléka, jsou považovány za indikátory kvality hygieny mléka a mohou poskytnout informace o zdravotním stavu mléčné žlázy. Kvalita i kvantita nadojeného mléka může být ovlivněna řadou faktorů jako je stádium laktace, způsob dojení a chovu, výživa či plemeno zvířete. Mezi významné patogenní mikroorganismy kozího mléka patří *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* či *Streptococcus agalactiae*.

Cílem práce bylo stanovit antimikrobiální látky – laktoferin, lysozym a celkovou proteolytickou aktivitu v kozím mléce. Pro určení laktoferinu a lysozymu byla zvolena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s FLD detekcí. Pro stanovení proteolytických enzymů byla zvolena spektrofotometrická metoda. V praktické části bylo analyzováno 58 individuálních vzorků kozího mléka z ekologické biofarmy v ČR.

Byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi celkovým počtem mikroorganismů nad i pod 100×10^3 KTJ/ml a počtem somatických buněk 300×10^3 /ml vůči laktoferinu a lysozymu. Nebyla nalezena korelace mezi vzrůstající koncentrací obou antimikrobiálních látek ve vztahu k počtu somatických buněk, u lysozymu ani ve vztahu k celkovému počtu mikroorganismů či mastitidním bakteriím. Proteolytická aktivita mléka neměla vliv na obsah a zastoupení přítomných bílkovin, korelovala však s obsahem laktoferinu. Nebyla zaznamenána závislost mezi celkovou proteolytickou aktivitou a zvýšeným počtem somatických buněk.

Klíčová slova: lysozym, laktoferin, proteáza, kozí mléko, HPLC, PSB, bakterie

Enzymatic and antimicrobial properties of goat's milk

Summary

Global demand for goat's milk has increased more than twice over the last decade and it is supposed to increase by further 53 % by 2030. Goat's milk, either directly or in the form of dairy products, is a highly nutritious food. It can be considered as a source of macro and micronutrients, but also of a number of active substances that play an important role in both nutrition and consumer health. Beside basic dairy components, goat's milk contains proteolytic enzymes which are important in determining the quality of milk and dairy products. Endogenous enzymes are the native enzymes of milk that come from somatic cells, blood plasma or from the surface layers of fat globules. Exogenous enzymes are produced by microorganisms that enter the milk under unsuitable hygienic conditions. Many native enzymes participate in the natural antimicrobial system of milk. However, they can have a significant effect on the quality and sensory characteristics of milk and milk products during storage. Thermostable proteolytic enzymes produced by psychrotrophic bacteria as well as heat resistant native proteases, have the biggest influence on the deterioration of dairy products due to protein degradation which results in reduce product yield.

Goat's milk contains important antimicrobial substances such as lactoferrin and lysozyme. The concentration of these substances in goat milk increases in mastitis and it is related to somatic cell count. Somatic cells, as well as the microbial profile of raw milk, are considered as indicators of milk hygiene quality and can provide information about the health status of the mammary gland. The quality and quantity of the milk can be influenced by a number of factors such as the stage of lactation, the method of milking and breeding, nutrition or the breed of the animal. Important pathogenic microorganisms in goat milk include *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Streptococcus agalactiae*.

The aim of the study was to determine antimicrobial substances – lactoferrin, lysozyme and total proteolytic activity in goat milk. The method of high-performance liquid chromatography with FLD detection was chosen for the determination of lactoferrin and lysozyme. The spectrophotometric method was chosen for the determination of proteases. In the practical part, 58 individual goat milk samples from an organic biofarm in the Czech Republic were analysed.

There were statistically significant differences between the total number of microorganisms above and below 100×10^3 CFU/ml and somatic cell count of 300×10^3 /ml towards lactoferrin and lysozyme. No correlation was found between the increasing concentration of both antimicrobial substances in relation to somatic cell count, for lysozyme even in relation to total microorganism count or mastitic bacteria. The proteolytic activity of milk did not affect the content and abundance of proteins present, however it correlated with the content of lactoferrin. There was no correlation between total protease activity and increased somatic cell count.

Keywords: lysozyme, lactoferrin, protease, goat milk, HPLC, SCC, bacteria

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Úvod do problematiky kozího mléka	10
3.2 Charakteristika a složení kozího mléka	11
3.2.1 Sacharidy v kozím mléce.....	12
3.2.2 Tuk v kozím mléce.....	12
3.2.3 Proteiny v kozím mléce.....	13
3.2.4 Antimikrobiální účinky bioaktivních peptidů kozího mléka.....	17
3.2.5 Minerální látky a vitaminy v kozím mléce	18
3.3 Látky s antimikrobiálním účinkem v kozím mléce	19
3.3.1 Laktoferin.....	19
3.3.2 Lysozym.....	21
3.3.3 Laktoperoxidázový systém.....	22
3.3.4 Imunoglobuliny	23
3.4 Enzymy kozího mléka	23
3.4.1 Základní rozdělení enzymů v mléce.....	23
3.4.2 Význam proteáz ve vztahu ke kvalitě a využití kozího mléka	25
3.5 Významné faktory ovlivňující celkovou kvalitu mléka	27
3.5.1 Somatické buňky v kozím mléce.....	27
3.5.2 Mikrobiologická kvalita kozího mléka	30
3.6 Kritéria pro syrové kozí mléko dle legislativy	32
3.7 Vybrané analytické metody pro stanovení látek s antimikrobiálním a enzymatickým účinkem	33
3.7.1 Laktoferin a lysozym	33
3.7.2 Proteolytická aktivita kozího mléka.....	34
4 Metodika	35
4.1 Odběr vzorků	35
4.1.1 Koza bílá krátkosrstá.....	35
4.2 Chemikálie	36
4.2.1 Standardy.....	36
4.3 Používané přístroje	37
4.4 Pomůcky	37
4.5 Příprava k analýze	37
4.5.1 Stanovení obsahu laktoferinu a lysozymu.....	37
4.5.2 Stanovení proteolytické aktivity mléka	38

4.6	Analýza a vyhodnocení dat	38
4.6.1	Laktoferin a lysozym	38
4.6.2	Proteolytická aktivita mléka	39
4.7	Statistická analýza	39
5	Výsledky.....	41
5.1	Laktoferin a lysozym.....	41
5.2	Proteolytická aktivita mléka	43
5.3	Obsah laktoferinu a lysozymu v závislosti na PSB, CPM a stafylokocích	45
6	Diskuze.....	50
7	Závěr	54
8	Literatura	56
9	Seznam použitých zkratek a symbolů	62
10	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

V současné době jsou mléko a mléčné výrobky bezpochyby nepostradatelnou složkou lidské výživy. Tyto potraviny tvoří komoditu, jejíž spotřeba ve světě neustále narůstá. Jedná se totiž o jednu z nejkompexnějších složek lidské stravy. Z nutričního hlediska je třeba zmínit především zdroj vápníku, jehož vstřebatelnost je oproti potravinám rostlinného původu značná. Mléko dále obsahuje plnohodnotné bílkoviny, laktózu a dobře stravitelný mléčný tuk, jež je zdrojem vitaminů rozpustných v tucích. Složení jednotlivých makro i mikroživin mléka a jeho jakost jsou ovlivněny mnoha faktory jako je živočišný druh, krmná dávka, stádium laktace, plemeno či zdravotní stav zvířete.

Pokroky v technologii mlékařství a v analytických metodách vedou k tomu, že se středem zájmů stávají v poslední době i funkční vlastnosti některých mléčných komponent. Jedná se např. o antimikrobiální účinky biologicky aktivních látek – laktoferinu a lysozymu, které mohou být po izolaci z mléka využity jako aktivní přísady do nových funkčních potravin, nutriční a kojenecké stravy, farmaceutických a kosmetických výrobků či do veterinárních preparátů. Zvýšené koncentrace těchto látek v mléce mohou zároveň signalizovat záněty mléčné žlázy a poukazovat tak na zdravotní stav zvířete. Diskutovanou skupinu látek, vykazující antimikrobiální a jiné zdraví prospěšné účinky v mléce, tvoří bioaktivní peptidy. Tyto peptidy vznikají enzymatickou hydrolýzou při průchodu gastrointestinálním traktem. Velké množství přirozeně vytvořených bioaktivních peptidů se nachází rovněž ve fermentovaných mléčných výrobcích z důvodu přítomnosti proteolytických kyselých kultur a poskytují tak zdravotní benefity spotřebitelům.

Významnou složkou mléka jsou rovněž enzymy, které se podílejí na přirozeném antimikrobiálním systému mléka. Současně mohou mít tyto látky značný vliv na kvalitu a sensorické vlastnosti mléka a mléčných produktů během jejich skladování, kdy dochází k narušení doby trvanlivosti, chuti, vůně a ke vzniku technologických vad. Nejrelevantnější skupinou těchto látek pro mléčný průmysl jsou enzymy produkované psychrotrofními bakteriemi, které disponují termostabilitou a mají největší dopad na znehodnocení mléčných výrobků. Kontrolou těchto enzymů a jejich aktivity lze zajistit vysokou jakost mléka. Vyjma bakterií pochází mléčné enzymy také ze somatických buněk, jež jsou přirozenou součástí mléka. Při nadlimitním množství těchto buněk dochází k jejich lýze a následnému uvolňování enzymů v mléce, které v tomto zvýšeném množství způsobují degradaci bílkovin včetně prospěšných látek s antimikrobiálním účinkem. Enzymatický systém somatických buněk dokáže také štěpit laktózu, zapříčiňovat žluknutí mléčného tuku či kažení a hnití mléka. Celkovou kvalitu mléka ovlivňuje rovněž celkový počet mikroorganismů, který je závislý na celé řadě faktorů a může souviset s výskytem klinických i subklinických mastitid.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Základem diplomové práce bylo sestavit literární přehled zabývající se současným stavem problematiky látek s enzymatickým a antimikrobiálním účinkem v kozím mléce. Literární rešerše obsahuje popis sledovaných látek v kozím mléce, faktory ovlivňující jejich zastoupení, vybrané analytické metody apod.

Cílem praktické části bylo stanovit vybrané látky s enzymatickým a antimikrobiálním účinkem – laktoferinu a lysozymu, a posoudit jejich vztah k celkové kvalitě mléka, zejména bílkovin. Současně byly zohledněny faktory, které mohly tyto vlastnosti ovlivňovat a také byla provedena optimalizace vybraných metod stanovení.

Hypotézy:

- 1) Zvolené metody pro stanovení lysozymu, laktoferinu a celkové aktivity proteáz budou vhodně optimalizovány.
- 2) Obsah lysozymu a laktoferinu se bude lišit v individuálních vzorcích kozího mléka ve vztahu k počtu somatických buněk a celkovému počtu mikroorganismů, zejména mastitidních bakterií.
- 3) Proteolytická aktivita mléka bude ovlivňovat obsah a zastoupení bílkovin.
- 4) Celková aktivita proteáz bude vyšší ve vzorcích kozího mléka se zvýšeným počtem somatických buněk.

3 Literární rešerše

3.1 Úvod do problematiky kozího mléka

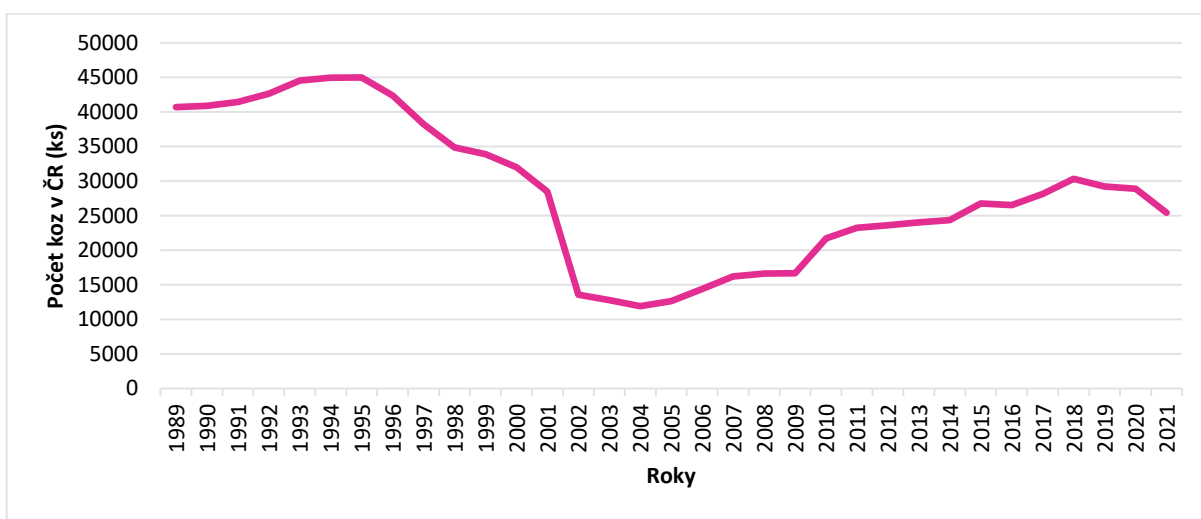
Ze studie, kterou realizovali Pulina et al. (2018) vyplývá, že produkce kozího mléka se zvýšila více než dvakrát během posledního desetiletí a předpokládá se, že se zvýší o dalších 53 % do roku 2030 (viz tabulka č. 1). Mléčná produkce získává stále větší ekonomický význam zejména pro výrobu kozích sýrů, jejichž objem i sortiment se postupně zvyšuje na trzích, kde jsou tyto sýry často oceňovány (Selvaggi et al. 2014). Dalším žadaným odvětvím je také výroba fermentovaných mléčných nápojů, jejichž spotřeba narůstá každým rokem. Kozí mléko se zároveň uplatňuje jako základ v nutriční a kojenecké výživě, kde je nezbytné, aby bylo mléko kvalitní a zdravotně nezávadné (Park et al. 2007). Ačkoli použití kozího mléka v hypoalergenní výživě není obecně doporučováno z důvodu křížové kontaminace kravských a kozích mléčných bílkovin, Ballabio et al. (2011) vzhledem k výsledkům své studie předpokládají úspěšnou aplikaci kozího mléka do modifikovaných formulí, jako jsou hydrolyzáty, pro vybrané skupiny alergických pacientů (Ballabio et al. 2011). Mléčné výrobky jsou mimo jiné zdrojem dalších funkčních látek jako jsou fytoosteroly, mastné kyseliny a probiotické bakterie. Specifické složky mléka se přidávají do farmaceutických výrobků a veterinárních preparátů zejména pro svůj antimikrobiální účinek. Jedná se zejména o laktoferin a lysozym (Samková et al. 2020).

Tabulka 1: Počty dojených koz, produkce kozího mléka a sýrů v České republice v letech 2011 až 2018 (Samková et al. 2020)

Ukazatel	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Počet dojených koz (ks)	2902	3208	3407	3556	3935	4610	5819	6093
Produkce kozího mléka (tis. l)	1500	1600	1650	1800	2000	2300	2900	2850
Produkce kozího sýra (t)	150	160	165	180	200	230	290	285

Domestikace koz je dobře známá již od starověku, neboť se předpokládá, že k ní došlo poprvé před 10 000 lety v íránských horách (Selvaggi et al. 2014). Vzhledem k omezené dostupnosti kravského mléka hraje chov koz klíčovou roli v mnoha rozvojových zemích (Park 2017). Odhaduje se, že více než 80 % populace všech koz se nachází v Asii a v Africe (Selvaggi et al. 2014). V České republice má chov koz bohatou historii a tradici. Naším nejčastěji chovaným plemenem je bílá krátkosrstá koza. V minulosti zde byly vysoké početní stavy koz, které se chovaly za účelem produkce mléka a masa pro vlastní potřebu, jak ukazuje obrázek č. 1 (Navrátilová et al. 2012). V posledních letech u nás vzrostl počet chovatelů koz z důvodu rostoucí poptávky po zdravé výživě. Chovatelé nejčastěji prodávají

čerstvé mléko nebo se zabývají výrobou kozích sýrů a jogurtů. Mléčné výrobky se prodávají většinou přímo na farmách nebo jsou dodávány do tržních sítí, ve kterých se dříve nalézaly jen velmi zřídka. V současné době však jejich nabídka vzrůstá (Lužová et al. 2012). Nevýhodou kozího mléka je jeho nedostatek zejména v zimních měsících z důvodu sezónní říje koz. Plodné období těchto zvířat se v našich klimatických podmínkách projevuje od konce léta až do konce podzimu. Nicméně u některých koz se objevuje říje rovněž v jarních měsících. Existují i výjimky, u kterých lze říji pozorovat v průběhu celého roku. V tomto případě se jedná o fyziologickou říji či o poruchu pohlavního aparátu nebo nekvalitní krmivo, jež říji vyvolá (Navrátilová et al. 2012).



Obrázek 1: Početní stavy koz na území ČR v období 1989 až 2021 (ČSÚ 2021)

3.2 Charakteristika a složení kozího mléka

Mléko, ať už přímo či ve formě mléčných výrobků, představuje vysoce nutričně hodnotnou biologickou potravinu. Lze ho považovat za zdroj makro i mikronutrientů, ale také řady účinných látek, které hrají významnou roli jak ve výživě, tak ve zdraví spotřebitelů. Vybrané složky kozího mléka znázorňuje tabulka č. 2 (Ceballos et al. 2009; Li et al. 2014).

Tabulka 2: Porovnání průměrného složení kozího, kravského, ovčího a mateřského mléka (Solaiman et al. 2010)

Složky mléka (%)	Kozí mléko	Kravské mléko	Ovčí mléko	Mateřské mléko
Voda	87,8	87,7	80,1	87,7
Sušina	12,2	12,3	19,9	12,3
Tuk	3,8	3,6	7,9	4,0
Bílkoviny	3,5	3,3	6,2	1,2
Laktosa	4,1	4,6	4,9	6,9
Popel	0,8	0,7	0,9	0,2

Množství, složení a vlastnosti nadojeného mléka jsou závislé na celé řadě exogenních a endogenních faktorů. Mezi exogenní činitele patří zejména podmínky chovu, způsob dojení a ošetření mléka po jeho nadojení, fyziologie a výživa koz. Nedostatečná výživa způsobuje snižování obsahu bílkovin, kdy největší pokles představují především kaseinové bílkoviny. Endogenní činitelé představují stádium laktace, dědičnost, individualitu a plemennou příslušnost zvířete. Obsah tuku, celkové sušiny a bílkovin v mléce je vysoký na počátku laktace. Ve druhém až třetím měsíci laktace obsah zmíněných komponent rychle klesá a dosahuje minima, poté se opět zvyšuje ke konci laktace (Park 2017).

3.2.1 Sacharidy v kozím mléce

Laktosa je hlavním sacharidem, který je tvořen v mléčné žláze koz (Park 2017). Jedná se o disacharid složený z glukózy a galaktózy. Vyskytuje se ve dvou izomerních formách, alfa (α) a beta (β), které jsou ve vodném roztoku v rovnováze. Laktosa je v gastrointestinálním traktu hydrolyzována β -galaktosidázou známou jako laktáza, která má zvláštní preferenci pro β formu. U savců aktivita β -galaktosidázy po odstavení výrazně klesá, u lidí k tomu zřejmě nedochází ve stejném stupni. Její aktivita zůstává zachována i v dospělosti a příznaky intolerance se objevují, pokud dojde k enzymatickému deficitu vrozenému či získanému. Populace trpící laktosovou intolerancí tak musí zcela vyloučit mléko a mléčné výrobky od koz i ostatních hospodářských zvířat (Pereira et al. 2013). Pokud dojde ke snížení celkového obsahu laktózy v kozím mléce, není tento jev vždy spojován se zvýšeným počtem minoritních patogenů či leukocytů (Bagnicka et al. 2011).

3.2.2 Tuk v kozím mléce

Ve srovnání s kravským mlékem obsahuje kozí mléko obvykle vyšší obsah mastných kyselin (MK) s krátkým a středně dlouhým řetězcem. Toto množství představuje přibližně 36 %. V kravském mléce se tyto MK vyskytují v množství 21 % (Barrionuevo et al. 2002). Vyšší obsah kyselin s kratšími řetězci v kozím mléce lze přičíst rozdílům v polymeraci acetátu produkovaného bacherovými bakteriemi u koz. Barrionuevo et al. (2002) v závěru svých studií uvádí, že konzumace kozího mléka snižuje hladinu celkového cholesterolu a LDL frakce v důsledku vyšší přítomnosti MK se středně dlouhým řetězcem, které snižují syntézu endogenního cholesterolu. Oproti ostatním druhům mléka, obsahuje kozí mléko nejméně cholesterolu, přičemž jeho hodnoty se liší mezi různými plemeny. Většina cholesterolu v kozím mléce se nachází ve volném stavu, pouze malá část je v esterové formě (Park et al. 2017). Dalším významným rozdílem je průměrná velikost tukových kuliček, přičemž v kozím mléce měří 1,5 – 3,0 μm , zatímco v mléce kravském dosahují velikosti 4,5 μm . Menší rozměr tukových kuliček uděluje kozímu mléku přirozeně lepší stravitelnost a souvisí zřejmě také s horším vystáváním smetany na povrch. Shlukování tukových kuliček příznivě ovlivňuje aglutinin – protilátka, jejíž vazba na příslušný antigen způsobí shlukování buněk – kterého je v kozím mléce nedostatek (Park et al. 2017). Oproti ostatním složkám mléka je tuk v mléce snadněji ovlivnitelný výživou. Při snížení množství vlákniny v krmné dávce klesá obsah tuku

v mléce. Na jeho složení a sensorických vlastnostech se podílí charakter mastných kyselin obsažených v krmivu. Typické aroma po tzv. „kozíně“ zapříčiňují volné MK – kapronová, kaprinová a kaprylová. Z nasycených MK je nejvíce zastoupena palmitová kyselina, která tvoří téměř 30 % všech MK obsažených v kozím mléce. Myristová a laurová kyselina jsou rovněž vysoce zastoupené. Významnými nenasycenými MK kozího mléka jsou olejová a linolová kyselina (Rubin et al. 2021). Kozí mléko obsahuje nižší obsah orotové kyseliny, což má významný vliv na prevenci vzniku syndromu steatózy jater. V mléčném tuku se nachází konjugovaná linolová kyselina (CLA) vznikající biohydrogenačními reakcemi prováděnými mikroorganismy trávicího traktu přežvýkavců. CLA je významná z hlediska příznivých účinků na lidské zdraví. Byl prokázán její antikarcinogenní a antiaterogenní efekt (Pereira 2013). Zároveň byl prokázán její účinek na hospodaření s tuky v těle, přičemž CLA tvoří bariéru proti pronikání mastných kyselin do tukových buněk, a tak zabraňuje ukládání tuku v podkožních vrstvách. Výzkumy ukazují také schopnost CLA stimulovat imunitní systém (Park et al. 2017). Množství CLA v mléce může být značně proměnlivé především v závislosti na ročním období a v důsledku výživy zvířat (Pereira 2013). Obsah této kyseliny v mléce lze zvýšit například přidávkou řepkového oleje do krmné dávky (Park et al. 2017).

Horincar & Bahrim (2017) poukazují na účinnost enzymatické hydrolýzy mléčného tuku ze syrového kozího mléka pomocí kmene *Candida lipolytica* za účelem uvolnění volných MK s antimikrobiální aktivitou pomocí kultivace in situ. Získané hydrolyzáty vykazovaly antimikrobiální vlastnosti vůči bakteriím *Bacillus subtilis* a *Bacillus cereus*. Současně potlačovaly růst plísní jako je například *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida mycoderma*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.* či *Geotrichum candidum*. Deriváty volných MK z tuku kozího mléka mohou působit jako přírodní konzervační látky pro zvýšení trvanlivosti potravin. V současné době se biokonzervace stává diskutovaným tématem. Existují však jen omezené zprávy týkající se výroby antimikrobiálních mastných kyselin z tuku kozího mléka a jejich využití v praxi (Horincar & Bahrim 2017).

3.2.3 Proteiny v kozím mléce

Mléko je obecně považováno za významný zdroj bílkovin v lidské stravě. Jejich obsah v mléce představuje přibližně 32 g na 1 litr (Pereira 2013). Substituce aminokyselin v řetězcích proteinu jsou zodpovědné za typické aroma kozího mléka a výrobků z něj. Tyto substituce zároveň umožňují detekci i zanedbatelného množství kravského mléka, kterým by bylo kozí mléko falšováno (Haenlein 2004; Selvaggi et al. 2014).

Existují dvě základní skupiny bílkovin kozího mléka: kaseinové bílkoviny (nerozpustné) a syrovátkové bílkoviny (rozpustné) (Tedde et al. 2019). Přirozený poměr kaseinových a syrovátkových bílkovin v kozím mléce představuje 75:25 (St-gelais et al. 2003). Obě skupiny bílkovin jsou vysoce kvalitní s ohledem na požadavky lidské výživy pro svůj obsah esenciálních aminokyselin, stravitelnost a biologickou dostupnost (Pereira 2013).

Kozí mléko obsahuje šest hlavních bílkovin, které se podobají odpovídajícím bílkovinám kravského mléka. Jedná se o: α -s-1-kasein, α -s-2-kasein, β -kasein, κ -kasein (kaseinové bílkoviny), α -laktalbumin a β -laktoglobulin (syrovátkové bílkoviny). Tyto bílkoviny

se shodují v obecné klasifikaci, ale liší se v genetických polymorfismech a jejich frekvencích v populaci koz. Mléko obsahuje rovněž důležité minoritní bílkoviny, jako jsou imunoglobuliny, sérový albumin, laktoferin, lysozym, laktoperoxidáza, transferin či prolaktin. Obsah dusíkatých složek v kozím mléce se liší v závislosti na plemeni, genetice, ročním období, fázi laktace a krmivu. Průměrný obsah vybraných bílkoviny zobrazuje tabulka č. 3. (Selvaggi et al. 2014).

Tabulka 3: Obsah vybraných bílkovin v kozím mléce (Park et al. 2017)

Bílkovina	Hodnota v kozím mléce
Kaseinové bílkoviny (g/100 ml)	2,11
α -s-1-kasein (%)	5,6
α -s-2-kasein (%)	19,2
β -kasein (%)	54,8
κ -kasein (%)	20,4
Syrovátkové bílkoviny (%)	0,6
α -laktalbumin (%)	0,06 – 0,11
β -laktoglobulin (%)	0,18 – 0,28
Laktoferin (μ g/100 ml)	20 – 200
Lysozym (μ g/100 ml)	25

3.2.3.1 Kaseinové bílkoviny

Kaseinové bílkoviny jsou skupinou fosfoproteinů, které se syntetizují uvnitř mléčné žlázy v reakci na laktogenní hormony a další stimuly. Tyto látky jsou rozptýlené v mléce v koloidní disperzi ve formě kaseinových micel, které jsou zodpovědné za většinu jedinečných fyzikálních vlastností mléka. Micely se skládají z molekul kaseinu, vápníku a anorganických fosforečnanových a citrátových iontů. V kaseinových bílkovinách se vyskytují všechny esenciální aminokyseliny s výjimkou sирných aminokyselin. Kasein lze proto považovat za vysoce výživnou bílkovinu. Z hlediska fyzikální chemie jsou kaseinové micely velmi stabilní koloidní agregáty (Petrotos et al. 2015). Velikost kaseinových micel kozího mléka se zřetelně liší od mléka kravského. V kozím mléce dosahují rozměrů 30 – 60 nm. V kravském mléce je jejich velikost podstatně větší a pohybuje se v rozmezí 30 – 300 nm. Zároveň mají kaseinové micely kozího mléka pomalejší sedimentaci a nižší tepelnou stabilitu (Selvaggi et al. 2014). Experimentální studie ukazují, že některé kaseinové peptidy podporují tvorbu mucinu v gastrointestinálním traktu, čímž zabraňují adhezenci patogenních mikroorganismů na střevní povrch (Pereira 2013).

Jak bylo uvedeno výše, existují 4 základní druhy kaseinů: α -s-1-kasein, α -s-2-kasein, β -kasein a κ -kasein. Jednotlivé kaseiny disponují mírně odlišnými vlastnostmi, které způsobují variace v obsahu aminokyselin (Park et al. 2017). Z kvantitativního hlediska je

nejvariabilnějším genem kaseinu gen CSN1S1, který kóduje α -s-1-kasein. Na základě obsahu α -s-1-kaseinu lze alely CSN1S1 rozdělit do 4 skupin: silné alely (A, A', B1, B2, B3, B4, B', C, H, L a M) střední alely (E a I), slabé alely (F a G) a nulové alely (O1, O2, a N), které nevytvářejí žádný α -s-1-kasein. Nejnovější objevenou variantou je varianta A'. Distribuce těchto alel byla zkoumána u různých plemen koz, přičemž se ukázalo, že silné alely mají vyšší frekvenci u plemen pocházející z oblasti Středomoří. Tento aspekt naznačuje, že mléko pocházející od těchto plemen je vhodnější pro výrobu sýrů, jelikož obsahuje vyšší množství α -s-1-kaseinu, které poskytuje lepší koagulaci a následnou vyšší výtěžnost sýrů. Naopak kozí mléko s nízkou nebo žádnou hodnotou α -s-1-kaseinu má nižší výtěžnost sýřeniny, delší dobu srážení a větší tepelnou odolnost (Ballabio et al. 2011). Alely, které jsou spojeny se sníženou nebo nulovou expresí genu se u koz vyskytují nejčastěji. Proto je jejich základním α -s-kaseinem α -s2-kasein, který má odlišnou stravitelnost a rozdílné vlastnosti pro výrobu sýrů. Naproti tomu majoritním α -s-kaseinem v kravském mléce je α -s-1-kasein, který je nejčastěji spojován s alergií na mléčnou bílkovinu (Selvaggi et al. 2014).

Alergie na kravské mléko je nejčastější alergií u dětí v prvních letech života. Při absenci mateřského mléka potřebují alergici alternativní zdroj bílkovin, který je obvykle založen na hydrolyzovaných bílkovinách kravského mléka (kaseinových či syrovátkových) nebo na přípravcích na bázi sóji. Mléko různých druhů savců bylo navrženo jako možná alternativa kravského mléka, ale jeho bezpečnost pro alergické osoby se stále diskutuje. Jak bylo zmíněno výše, α -s-1-kasein nacházející se v kozím mléce je kódován genem CSN1S1 a je charakterizován rozsáhlým kvalitativním a kvantitativním polymorfismem. Určitá plemena koz jsou spojena s nulovou nebo se sníženou expresí tohoto specifického proteinu. Přesto je zde riziko zkřížené reaktivity mezi bílkovinami kravského a kozího mléka, a je proto nutná obezřetnost před použitím kozího mléka pro kojeneckou výživu. Ačkoli použití kozího mléka v hypoalergenní výživě není obecně doporučováno, Ballabio et al. (2011) vzhledem k výsledkům své studie předpokládají úspěšnou aplikaci kozího mléka do modifikovaných formulí, jako jsou hydrolyzáty, pro vybrané skupiny alergických pacientů (Ballabio et al. 2011).

3.2.3.2 Surovátkové bílkoviny

Základními surovátkovými bílkovinami jsou α -laktalbumin a β -laktoglobulin. Do této skupiny proteinů patří také sérový albumin, imunoglobuliny, proteózo-peptonová frakce, laktoferin a transferin. Na rozdíl od kaseinových bílkovin neobsahují surovátkové proteiny fosfor a vyznačují se vysokým obsahem aminokyselin obsahujících síru, tedy methioninem a cysteinem. Z nutričního hlediska mají proteiny mléčné surovátky v různých aspektech lepší vlastnosti nežli kaseinové bílkoviny. Příkladem je výhodnější aminokyselinový profil, který je podobný mateřskému mléku. Z tohoto důvodu jsou surovátkové proteiny doporučovány pro výrobu mléčných výrobků jako náhrada kravského mléka ve výživě kojenců. Bylo prokázáno, že kaseinové bílkoviny mají nižší stravitelnost a vstřebatelnost oproti surovátkovým bílkovinám. Surovátkové proteiny se současně používají jako přísady do potravin, vzhledem ke svým důležitým funkčním vlastnostem, jako je rozpustnost v širokém rozmezí pH,

viskozita, schopnost zadržovat vodu, gelovatění, adheze, emulgace a pění (Haenlein et al. 2004; Selvaggi et al. 2014).

3.2.3.2.1 B-laktoglobulin

B-laktoglobulin je dominantní syrovátkovou bílkovinou v mléce. Tvoří 10 % z celkového obsahu mléčných bílkovin a 50 – 60 % celkových syrovátkových bílkovin. Syntetizuje se v mléčné žláze a má 2 genetické varianty: β -laktoglobulin A a β -laktoglobulin B, které se liší záměnou glycinu ve variantě β -laktoglobulinu B za asparagovou kyselinu ve variantě A. Mléko všech přežvýkavců obsahuje β -laktoglobulin, zatímco mléko téměř všech ostatních zvířat tuto bílkovinu postrádá (Kilara & Vaghela 2018). B-laktoglobulin se vyskytuje převážně v prostorovém uspořádání β -skládaného listu a skládá se ze 162 aminokyselinových zbytků. Působí jako účinný emulgátor a imunomodulátor. Jeho molekula obsahuje hydrofobní část, která může vázat vitamin A a D, vápník a MK, čímž usnadňuje jejich resorpci (Petrotos et al. 2014).

B-laktoglobulin je nejčastější syrovátkovou bílkovinou způsobující alergie na bílkovinu mléka, přičemž může být současně podporován kaseinovými bílkoviny. Obvykle se jedná o první potravinovou alergii pozorovatelnou u dětí a její prevalence se pohybuje v rozmezí 2 – 7,5 %. Peptidy pocházející z β -laktoglobulinu mohou snižovat produkci imunoglobulinu E, který je pro tuto bílkovinu specifický. Ve většině případů mají tyto alergie tendenci vymizet během dětství (Pereira 2013; Petrotos et al. 2014). U dospělé populace je alergie na mléčnou bílkovinu poměrně vzácná, Marková (2021) uvádí, že touto alergií trpí pod 1 % dospělých. Vzhledem k tomu, že alergie postihují především děti, a to i v novorozeneckém období, řeší se často vhodné pokyny pro léčbu, aby se zajistil přiměřený vývoj dětí. Dříve bylo dětem podáváno kozí mléko jako alternativa za mléko kravské, nicméně tento přístup je nesprávný z důvodu podobnosti struktury bílkovin, což se může projevat i u mléka ostatních savců (Pereira 2013; Marková 2021).

3.2.3.2.2 A-laktalbumin

Druhou nejrozšířenější syrovátkovou bílkovinou je α -laktalbumin, který tvoří asi 2 % celkové mléčné bílkoviny a 5 – 25 % celkového syrovátkového proteinu. Jeho poměr k β -laktoglobulinu v syrovátce je 1:3. A-laktalbumin je plně syntetizován v mléčné žláze a působí jako koenzym pro biosyntézu laktózy (Kilara & Vaghela 2018). Na rozdíl od β -laktoglobulinu má nízkou imunogenicitu, a tím i nízký potenciál vyvolávat alergie, což z něj činí cennou živinu pro děti. Molekula α -laktalbuminu se skládá ze 123 aminokyselinových zbytků a jeho globulární struktura obsahuje čtyři disulfidické můstky, čtyři α -helixy a dvě oblasti s prostorovým uspořádáním β -skládaného listu. Několik oblastí tvořených α -helixem váží vápník. Toto prostorové uspořádání poskytuje bílkovině ochranu před denaturací (Petrotos et al. 2014). Tato vlastnost je neobvyklá v porovnání s ostatními bílkoviny, které vykazují zvýšenou tepelnou citlivost v přítomnosti vápníku. Důvodem je pravděpodobně schopnost vápníku podporovat tvorbu iontových intermolekulárních příčných vazeb s většinou bílkovin. Tyto vazby udržují molekuly v blízkosti a zvyšují pravděpodobnost

agregace při zahřívání. Naproti tomu α -laktalbumin využívá vápník k tvorbě intramolekulárních iontových vazeb, díky nimž je molekula odolná vůči tepelnému rozkladu (Kilara & Vaghela 2018).

3.2.4 Antimikrobiální účinky bioaktivních peptidů kozího mléka

Mléčným bílkovinám je věnována stále větší pozornost jako potenciálním složkám zdraví prospěšných funkčních potravin zaměřených na chronická onemocnění související s výživou, jako jsou kardiovaskulární choroby, diabetes mellitus 2. typu a obezita (Petrotos et al. 2015). Za tímto účelem je velký zájem věnován bioaktivním peptidům vznikajícím enzymatickou hydrolýzou při průchodu gastrointestinálním traktem. Tyto peptidy jsou identifikovány v hydrolyzátech mléčných bílkovin a byly prokázány jejich antimikrobiální, imunomodulační, antitrombotické, růst stimuluje a antihypertenzní vlastnosti. Současně trávením kozího mléka žaludečním pepsinem vznikají bioaktivní peptidy se silnými antioxidantními aktivitami (Hisham et al. 2017). Velké množství přirozeně vytvořených bioaktivních peptidů se nachází rovněž ve fermentovaných mléčných výrobcích jako jsou jogurty či kefírová a acidofilní mléka z důvodu přítomnosti proteolytických kyselých kultur (Park et al. 2017). Mezi tyto kultury patří např. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Biologicky aktivní peptidy lze vyrobit také proteolýzou pomocí enzymů získaných z mikroorganismů nebo rostlin. Díky výše zmíněným klinicky doloženým zdravotním benefitům byly vyvinuty technologie vhodné pro průmyslovou výrobu bioaktivních mléčných peptidů, které se přidávají do určitých potravin uváděných na trh (Petrotos et al. 2015). Kimpel & Schmitt (2015) ve svých studiích popisují možné využití mléčných bílkovin jako cíleně orientované nosiče, které fungují jako transportní prostředky pro hydrofobní bioaktivní látky jako jsou antioxidanty, vitaminy rozpustné v tucích, probiotika či nutraceutika. Tuto schopnost mléčným bílkovinám poskytují jejich funkční vlastnosti, které jsou dány hydrofobními vazbami a vazbami jiných molekul nebo iontů, povrchovou aktivitou, agregací, gelací či interakcí s jinými polymery. Následkem této funkcionalizace vznikají inovativní potraviny, které mají jak ekonomický potenciál, tak zdravotní benefity pro celosvětovou populaci (Kimpel a Schmitt 2015). Antimikrobiální peptidové prekurzory v mléčných bílkovinách mohou podporovat přirozenou obranyschopnost organismu proti patogenům. Proto se tyto bílkoviny v potravinách považují za složky nutriční imunity. Obecně lze očekávat větší antimikrobiální účinek v mléce definovaný přítomností bioaktivních peptidů, než je součet jednotlivých složek imunoglobulinových a neimunoglobulinových obranných bílkovin, jako jsou laktoferin, laktoperoxidáza, lysozym a další peptidy. Všechny tyto přirozeně se vyskytující proteiny mají synergický účinek (Park et al. 2007).

Bylo zjištěno, že peptidové fragmenty β -laktoglobulinu, které vznikají působením alkalázy, pepsinu nebo trypsinu v gastrointestinálním traktu, vykazují antimikrobiální účinky vůči *E. coli* a patogenním kmenům *E. coli*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Mechanismus patogenního působení mikroorganismů spočívá v jejich adhezi na lidské ileostomické glykoproteiny. Inhibice této adheze je zprostředkována vazbou β -laktoglobulinu

na dvou různých místech na imobilizovaných ileostomických glykoproteinech, přičemž jsou pro tuto aktivitu důležité disulfidické můstky v molekule β -laktoglobulinu (Petrotos et al. 2014). Mezi nejvýznamnější bioaktivní peptid vznikající hydrolyzou α -laktalbuminu v gastrointestinálním traktu patří tripeptid Gly-Leu-Phe, který stimuluje fagocytózu makrofágů prostřednictvím specifických receptorů. Je proto považován za látku s významnou antimikrobiální aktivitou. Studie ukazují, že bioaktivní peptidy, které jsou uvolňovány z α -laktalbuminu inhibují růst *E. Coli* a zároveň podporují růst bakterie *Bifidobacterium longum* (Petrotos et al. 2014).

Byly identifikovány čtyři antimikrobiální peptidy z pepsinového hydrolyzátu kozího α -s-2-kaseinu, které odpovídají fragmentům (165 – 170), (165 – 181), (184 – 208) a (203 – 208). Ukazuje se, že nejsilnější aktivitu proti bakteriím má fragment (165 – 181). Fragment (203 – 208) je multifunkční, jelikož vykazuje nejen antimikrobiální aktivitu, ale také silnou antihypertenzní a antioxidační aktivitu (Park et al. 2017).

Peptidy odvozené z další syrovátkové bílkoviny – laktoferinu mající antibakteriální účinky, přitahují velkou pozornost zejména v posledních několika desetiletích (Park et al. 2007). Dle dostupné studie lze tvrdit, že antibakteriální peptidy získané enzymatickým štěpením, vykazují silnější aktivitu než prekurzor laktoferin. Antibakteriální aktivita laktoferinu v kozím mléce byla potvrzena u fragmentu (17 – 41). V hydrolyzátu kozího laktoferinu byl dále identifikován laktofericin s odpovídajícím fragmentem (14 – 42), který vykazuje antibakteriální aktivitu vůči *Escherichia coli* a *Micrococcus flavus* (Park et al. 2017).

3.2.5 Minerální látky a vitaminy v kozím mléce

Kozí mléko obsahuje přibližně 134 mg vápníku a 121 mg fosforu na 100 g mléka. Ve srovnání s kravským mlékem je obsah těchto prvků vyšší stejně jako je tomu u draslíku, hořčíku a chlóru. Naproti tomu má kozí mléko nižší obsah sodíku a síry. Množství zmíněných prvků značně kolísá během fází laktace. Počet laktací nemá na množství minerálních látek prakticky žádný vliv, výjimkou je sodík, u kterého je obsah při první laktaci nižší o 15 – 20 % (Park et al. 2017). Laktosa, jež se přirozeně vyskytuje v kozím mléce, podporuje absorpci vápníku. Tento prvek se v kozím mléce nachází ve 2 formách – koloidní a iontové. Zajímavou vlastností mléka je významná role iontového vápníku při stabilizaci, syřitelnosti, tepelné odolnosti a povrchových a reologických vlastnostech mléčných bílkovin (Glantz et al. 2020). Kozí mléko je rovněž dobrým zdrojem mikroelementů jako je zinek a selen. Množství zinku je podmíněno jeho příjmem z krmiva. V mléce je přítomné také železo, měď a mangan. Obsah těchto prvků je nižší ve zralém mléce oproti mlezivu (Pereira 2013).

Charakteristickým znakem mléčného tuku koz jsou malé tukové kuličky. Tato vlastnost podporuje hypotézu o vyšších koncentracích vitaminů A D v kozím mléce, které jsou na mléčný tuk vázány (Pereira 2013). Hypotéza o vyšším množství vitamínu A nebyla potvrzena ve studii Hodulové et al. (2016). Naopak byla potvrzena studií Park et al. (2017), která současně vyvrací hypotézu o vyšší koncentraci vitamínu D. Některé země obohacují odstředěné mléko o vitaminy A D, aby se zvýšila jeho nutriční hodnota (Pereira 2013). Dle Hodulové et al. (2016) přispívá mléko k referenčnímu dennímu příjmu vitamínu A v rozmezí

11 – 16 %. Čerstvá pastvina je zároveň nejlepším zdrojem karotenoidů z běžně používaných krmiv. Karotenoidy jsou prekurzorem retinolu, proto může být jeho koncentrace v mléce vyšší v jarním a letním období nežli v podzimních a zimních měsících, pokud je zachované stejné složení krmiva (Hodulová et al. 2016). Křídově bílou barvu kozího mléka způsobuje přeměna veškerého β -karotenu na vitamin A. Kozí mléko poskytuje také dostatek thiaminu, riboflavinu, niacinu a pantothenové kyseliny. Vysoký obsah vitaminů skupiny B je výsledkem syntézy v bachoru koz (Park et al. 2017). Kozí mléko je chudé na askorbovou a listovou kyselinu a na pyridoxin. Současně obsahuje nedostatek vitaminu B12 následkem nízkého množství kobaltu (Rubin et al. 2021). Bylo prokázáno, že nižší teplota a krátkodobá pasterizace kozího mléka je nejlepší pro zachování vitaminů a prodloužení trvanlivosti mléka z důvodu jeho termolability (Park et al. 2017). Chramostová et al. (2016) uvádí, že termolabilita je přirozenou vlastností syrového kozího mléka. K této vlastnosti přispívá mnoho parametrů jako je například vyšší kyselost mléka (průměrná hodnota pH se pohybuje v rozmezí 6,5 – 6,7 dle stadia laktace a plemene zvířete) a vyšší hodnoty celkového počtu mikroorganismů. Klíčovým faktorem je rovněž obsah volných aminoskupin, kterých se v kozím mléce nachází přirozeně více. S nízkou termostabilitou je vždy nutno počítat při úpravách vyžadujících vyšší tepelný záhřev. Z tohoto důvodu je nevhodná UHT technologie či výroba kondenzovaného mléka (Chramostová et al. 2016).

3.3 Látky s antimikrobiálním účinkem v kozím mléce

Mléko savců, včetně mléka kozího, obsahuje významné antimikrobiálně aktivní komponenty, především laktoferin, lysozym, laktoperoxidázu a imunoglobuliny. Tyto látky zajišťují imunitní ochranu v počátečních fázích života mláďete. Jejich význam je rovněž důležitý pro potlačení růstu mikroorganismů bezprostředně po nadojení mléka, ve kterém jsou aktivní přibližně 0,5 – 4 h, poté jejich aktivita klesá. Antimikrobiální účinky těchto mléčných složek vedou po izolaci k vývoji nových funkčních potravin, kojenecké a dětské výživy, potravinových doplňků či farmaceutických léčiv (Plocková et al. 2020).

V současné době je věnována zvýšená pozornost laktoferinu pro jeho schopnost vázat se na buněčné receptory využívané koronaviry a tím blokovat jejich vstup do buňky. Byl popsán potenciál entericky enkapsulovaného laktoferinu pro blokaci koronaviru a zvažuje se jeho preventivní a terapeutické působení proti onemocnění COVID-19 v podobě preparátu (Kell et al. 2020).

Vzhledem k potvrzeným antimikrobiálním účinkům výše uvedených látek a stále se zvyšujícímu počtu lidské populace vůči antibiotické rezistenci mikroorganismů lze očekávat další výzkum a aplikaci těchto látek (Plocková et al. 2020).

3.3.1 Laktoferin

Jedná se o monomerní glykoprotein, který patří do skupiny transferinů. Laktoferin je významným zdrojem železa a aminokyselin, které mu dodávají vysokou biologickou a nutriční hodnotu. Přítomnost železa poskytuje laktoferinu charakteristickou červenou barvu, proto je

známý také pod názvem červený protein. Laktoferin je syntetizován v mléčné žláze, ale i v jiných exokrinních žlázách. Současně se tvoří také v neutrofilních granulocytech (Petrotos et al. 2014). Mimo mléko se laktoferin vyskytuje ve slinách, slzách, potu, pankreatické šťávě, bronchiálním hlenu, synoviální tekutině a v nasálním sekretu. Tento glykoprotein se vyjma kozího mléka nachází rovněž v mléce mateřském a v mléce dalších druhů savců jako je mléko kravské, kobyli, myši a mléko prasnic. Postrádá ho mléko psí, králíčí a potkaní (Plocková et al. 2020).

Molekula laktoferinu se skládá ze dvou sférických laloků: N-koncového a C-koncového. Oba laloky jsou spojeny šroubovicí. Laktoferinová složka syrovátky se skládá z 689 aminokyselinových zbytků a 4 N-vázaných glykanů, dále obsahuje 2 globulární jednotky, přičemž každá jednotka má schopnost velmi pevně vázat 1 ion trojmocného železa (Petrotos et al. 2014). Laktoferin z kozího mléka má podobné funkční vlastnosti jako laktoferin v lidském mléce díky homologii složení N-glykanů, jež jsou součástí molekuly. Objev funkčních vlastností laktoferinu vede ke zvýšenému využití této látky do kojenecké výživy, funkčních potravin, léčiv či veterinárních preparátů a krmiv (Parc et al. 2014).

Jednou z hlavních funkcí laktoferinu je jeho antimikrobiální účinek, díky němuž je mléčná žláza a gastrointestinální trakt mláďat chráněn proti infekci a dochází tak k modulaci imunitního systému. Antimikrobiální mechanismus ovlivňuje vazbu železa z prostředí, přičemž nedostupnost železa vede k inhibici růstu bakterií jako jsou *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Listeria spp.*, *Bacillus spp.*, ale také kvasinek, mezi které patří například *Candida albicans*. Druhým antimikrobiálním mechanismem je vazba laktoferinu nebo jeho štěpných produktů (laktofericinu) na buněčnou stěnu bakterií, která způsobuje poškození funkce a integrity buněčné membrány a následnou likvidaci bakterie. Laktofericin se váže na teichovou kyselinu v buněčné stěně grampozitivních bakterií a na lipopolysacharidy v buněčné stěně gramnegativních bakterií. Bakterie mléčného kvašení osidlující gastrointestinální trakt mají obecně nízké nároky na železo a jejich růst tak není ovlivňován přítomností laktoferinu (Park et al. 2017).

Laktoferin působí jako růstový faktor stimulující buněčnou proliferaci a diferenciaci a podporuje tak růst lymfocytů, erytrocytů a dalších buněk. Tato látka vykazuje rovněž protizánětlivou funkci tím, že ovlivňuje produkci signálních proteinů – cytokinů, které regulují imunitní a zánětlivou odpověď organismu. Inhibuje také uvolnění tzv. tumor necrosis factoru alpha a interleukinu 6. V místě zánětu zamezuje laktoferin tvorbě volných radikálů (Wang et al. 2018).

Množství laktoferinu v kozím mléce je zvýšené při zánětu mléčné žlázy a předpokládá se, že bude úzce souviset s počtem somatických buněk. Vyšší obsah laktoferinu se nachází rovněž v kolostru (Petrotos et al. 2014). Koncentrace laktoferinu dále souvisí s fází laktace a frekvencí dojení. Bylo dokázáno, že vyšší frekvence dojivosti v časně laktaci ovlivňuje proliferaci buněk mléčné žlázy stejně jako expresi hlavních mléčných proteinových genů. Množství mRNA α -s-1-kaseinu, β -kaseinu, α -laktalbuminu a β -laktoglobulinu je z tohoto důvodu vyšší v mléce od koz, které byly dojeny vícekrát za den. Wang et al. (2018) zjistili, že

koncentrace laktoferinu koreluje s koncentrací proteinů v kozím mléce. Dále prokázali korelaci obsahu laktoferinu s paritou. Z tohoto důvodu mají kozy na první laktaci nižší množství laktoferinu v mléce (Wang et al. 2018).

3.3.2 Lysozym

Jedná se o enzym, tzv. muramidázu, nacházející se v slzách, slinách a v mléce všech savců, kteří specificky štěpí vazbu β -1,4 mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem v peptidoglykanové vrstvě bakterií, což má za následek buněčnou lýzu. V poměrně vysoké koncentraci se tato látka nachází také v neutrofilních granulocytech, v krevním séru a ve vaječném bílku. Postrádá ji pot, moč a mozkomíšni mok (Kilara & Vaghela 2018).

Lysozym je v mateřském mléce, na rozdíl od mléka dojných zvířat, obsažen ve velké míře (400 mg/ml). Kozí mléko obsahuje 0,250 mg/ml lysozymu a kravské mléko pouze 0,130 mg/ml (McInnis et al. 2015). Tento enzym působí více na grampozitivní bakterie, ale ve spojení s dalšími složkami přirozeného antimikrobiálního systému je účinný i proti gramnegativním bakteriím. Příkladem je jeho spojení s imunoglobulinem A, kdy je účinný proti *E. Coli*. Ve spojení s askorbátem a peroxidem vodíku je účinný proti *Salmonelle spp.* Lysozym pomáhá chránit kojence před patogenními bakteriemi a podporuje tvorbu zdravého střevního mikrobiomu. Jako imunomodulátor stimulující imunitní systém má nepřímý vliv na obranný systém. Jeho antimikrobiálního působení se využívá v sýrařství k omezení rozvoje sporulujících anaerobních mikroorganismů rodu *Clostridium* (Lonnerdal et al. 2003).

Bylo zjištěno, že molekula lysozymu je blízce příbuzná molekule α -laktalbuminu. Obě látky mají ze 40 % stejné aminokyselinové zbytky a dalších 20 % zbytků má podobnou strukturu. A-laktalbumin pomáhá syntetizovat stejnou vazbu, kterou štěpí lysozym. Navzdory jejich podobnosti nepracují na stejných substrátech a nejsou příbuzné antigenně (Kilara & Vaghela 2018).

Množství lysozymu závisí na obsahu leukocytů, proto je jeho koncentrace zvýšená při mastitidě. Aktivita tohoto enzymu je nízká v mléce a zvýšená v kolostru. V přítomnosti lysozymu se působením chymosinu či pepsinu v žaludku nesráží kasein v tuhou kompaktní sraženinu, ale v jemné vločky, které jsou stravitelnější. Proto má přítomnost tohoto enzymu nutriční význam u sajících mláďat. Lysozym působí baktericidně na enterokokový mikrobiom ve střevě. Tato látka současně snižuje odolnost bakteriální buněčné stěny tím, že z ní uvolňuje aminosacharidy, které jsou růstovým faktorem pro *Lactobacillus bifidus* (Plocková et al. 2020).

Existují dva typy lysozymu: lysozym c, jež se nachází ve vaječném bílku slepic a lysozym g, který je přítomný ve vaječném bílku hus. Syrovátka kozího mléka obsahuje oba zmíněné typy lysozymu (Petrotos et al. 2014).

3.3.3 Laktoperoxidázový systém

Laktoperoxidáza je glykoprotein, který je důležitou součástí přirozeného obranného systému savců. Nachází se v řadě biologických sekretů včetně slz a slin. V mléce se jeho koncentrace pohybuje okolo 30 mg/l, což představuje přibližně 1 % celkového syrovátkového proteinu. Aktivita tohoto glykoproteinu závisí na mnoha faktorech jako je druh a plemeno zvířete, krmivo, roční období či rozmnožovací cyklus, přičemž maximální aktivitu v mléce vykazuje při pH 6,0 (Petrotos et al. 2014). Laktoperoxidáza patří mezi tepelně nejstabilnější enzymy v mléce. Používá se jako indikátor účinnosti pasterace mléka, kdy inaktivace enzymu nastává při teplotě 80 °C po dobu 15 vteřin. Laktoperoxidáza se rovněž využívá jako konzervační látka v kojenecké výživě, zmrzlinách či ve smetaně (Deeth et al. 2021).

Laktoperoxidázový systém (LPS) se skládá ze tří složek: enzym laktoperoxidáza, thiokyanát a peroxid vodíku. Laktoperoxidáza se v mléce běžně nachází v dostatečném množství. Thiokyanát a peroxid vodíku jsou však limitujícími faktory a je třeba je přidávat z exogenního zdroje, aby se aktivoval LPS. Laktoperoxidáza katalyzuje oxidaci thiokyanátu peroxidem vodíku za vzniku thiokyanogenu, který se následně hydrolyzuje na hypothiokyanát, který má prokázanou antibakteriální aktivitu (Seifu et al. 2004). Laktoperoxidáza obsahuje atom trojmocného železa a jednu hemovou skupinu. LPS váže vápenaté ionty, které stabilizují molekulární konformaci enzymu a zachovává tak jeho strukturní integritu. Na atom železa připadá jedna molekula vápníku, přičemž protein, jež je součástí enzymu, má k vápníku vysokou afinitu. Obsah železa v LPS je 0,07 %, což odpovídá jednomu atomu železa na molekulu LPS (Nidhi et al. 2022).

Vzhledem k tomu, že je LPS syntetizován především polymorfonukleárními leukocyty, očekává se, že se jeho aktivita bude zvyšovat s narůstajícím počtem somatických buněk v mléce. Proto může být LPS použit k detekci subklinické mastitidy u dojných koz (Seifu et al. 2007). LPS inhibuje růst a metabolismus různých druhů mikroorganismů a má také potenciál zlepšit kvalitu a bezpečnost fermentovaných mléčných výrobků. Antimikrobiální účinek tohoto systému pramení z reakce nestabilního hypothiokyanátu se sulfhydrylovými skupinami proteinů v buněčné stěně bakterií. LPS je obecně účinnější proti gramnegativním bakteriím, včetně rodu *Pseudomonas*, nežli grampozitivním bakteriím. Inhibuje však obě skupiny alimentárních patogenů včetně *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* a *Campylobacter jejuni*. Ve studiích od Seifu et al. (2004) byl stanoven baktericidní účinek laktoperoxidázového systému vůči bakteriím *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* a *Brucella melitensis* ve vzorcích kozího mléka uchovávaných 6 hodin při teplotě 30 °C. Ve vyspělých zemích je bakteriologická kvalita syrového mléka při sběru, skladování a přepravě zajištěna chlazením. Ve venkovských oblastech většiny rozvojových zemí s teplým klimatem však konvenční chladicí zařízení nejsou k dispozici z technických či ekonomických důvodů. V důsledku toho byl LPS doporučen pro konzervaci syrového mléka jako alternativa k chlazení (Seifu et al. 2004).

3.3.4 Imunoglobuliny

Imunoglobuliny (Ig) tvoří nejméně 2 % celkové mléčné bílkoviny. Hlavními imunoglobuliny (Ig) v mléce jsou: IgG1, IgG2, IgA a IgM. Všechny tyto molekuly mají podobnou základní strukturu a skládají se ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců. Molekuly Ig nejsou syntetizovány v mléčné žláze, a proto se do ní musí nejprve dostat, aby mohly následně vstoupit do mléka. V případě nejméně jedné třídy protilátek IgG1 bylo lokalizováno specifické receptorové místo na membráně buněk mléčné žlázy, které usnadňuje vstup tohoto proteinu do mléčné žlázy (Kilara & Vaghela 2018). Imunoglobuliny hrají důležitou roli v ochraně proti mikrobiálním patogenům, jsou zodpovědné za stimulaci fagocytózy a za prevenci adheze mikrobů na slizniční epitel. Zároveň neutralizují viry a toxiny. Koncentrace imunoglobulinů je vyšší v mlezivu (Petrotos et al. 2014).

3.4 Enzymy koziho mléka

Dle původu se dělí enzymy v mléce na endogenní a exogenní. Endogenní enzymy jsou nativní enzymy mléka. Pocházejí ze somatických buněk, z krevní plazmy či z povrchových vrstev tukových kuliček. Bylo zjištěno, že existuje více než 60 nativních mléčných enzymů, ačkoli s moderní proteomickou analýzou mléčných bílkovin by tento počet mohl být mnohem vyšší (Deeth et al. 2021). Exogenní enzymy jsou produkovány mikroorganismy, které se dostávají do mléka za nevhodných hygienických podmínek. Řada nativních enzymů se podílí na přirozeném antimikrobiálním systému mléka. Současně však mohou mít tyto enzymy významný vliv na kvalitu a sensorické vlastnosti mléka a mléčných produktů, kdy dochází k narušení doby trvanlivosti, chuti, vůně a ke vzniku technologických vad výrobků. Tepelně odolné proteolytické a lipolytické enzymy z psychrotrofních bakterií, jakož i tepelně odolné nativní proteázy, mají největší vliv na znehodnocení mléčných výrobků během skladování a jsou proto nejrelevantnější pro mlékárenský průmysl. Kontrolou těchto enzymů a jejich aktivity lze zajistit kvalitu mléka po celou dobu trvanlivosti (Glantz et al. 2020).

3.4.1 Základní rozdělení enzymů v mléce

3.4.1.1 Oxidoreduktázy

Do skupiny oxidoreduktáz patří laktoperoxidáza, xantinoxidáza a kataláza. Laktoperoxidáza a xantinoxidáza jsou součástí laktoperoxidázového systému, jež zastává antimikrobiální účinek v mléce. Koncentrace katalázy je zvýšená v mlezivu, na konci laktace a při infekci mléčné žlázy (Deeth et al. 2021).

3.4.1.2 Transferázy

Tato třída enzymů katalyzuje přenos skupiny atomů z jedné molekuly – donoru na molekulu druhou – akceptor. Z významných transferáz katalyzujících transaminaci aminokyselin lze zmínit alanin-aminotransferázy a aspartam-aminotransferázy. Mezi

transferázy, jež katalyzují fermentaci laktózy, se řadí pyruvátkináza a glykokináza. Z dalších enzymů této skupiny jsou v mléce přítomny aminotransferázy, hexosotransferázy, fosfotransferázy, acylaminotransferázy a další. Některé z nich se účastní procesu syntézy složek mléka. Například γ -glutamyltransferáza se nepřímo účastní syntézy mléčných bílkovin a galaktosyltransferáza je součástí enzymu laktosynthetázy (Navrátilová et al. 2012).

3.4.1.3 Hydrolázy

3.4.1.3.1 Lipázy

Lipázy jsou zodpovědné za hydrolytické žluknutí mléčného tuku, kdy dochází k hydrolyze molekul triacylglycerolů na glycerol a mastné kyseliny. Vzniklé volné mastné kyseliny mají nežádoucí vliv na chuť mléka. Vyjma těchto negativních účinků, může lipolýza snížit povrchovou aktivitu a pěnovost mléka a tím snížit také čas šlehání a stloukání. Lipoproteinová lipáza je hlavní nativní lipázou a potenciálně technologicky nejvýznamnějším enzymem přítomným v mléce. Zvýšený počet somatických buněk koreluje se zvýšeným množstvím lipoproteinové lipázy v mléce. Lipolýza může být spontánní nebo indukovaná. Spontánní lipolýzu ovlivňují například nutriční faktory krmiva či plemeno zvířete a tím modifikují technologické a sensorické vlastnosti mléka a mléčných výrobků (Glantz et al. 2020).

3.4.1.3.2 Fosfatázy

Existují dva typy fosfatáz, které jsou přirozenou složkou mléka: kyselá a alkalická. Kyselá fosfatáza pochází z leukocytů. V mléce se nachází v nízkých koncentracích a její aktivita se zvyšuje při mastitidách. Jedná se o termostabilní enzym, který se inaktivuje při teplotě 95 °C po dobu několika minut. Syntéza alkalické fosfatázy probíhá v epitelu mléčné žlázy, v krevní plazmě a v buněčných elementech. Oproti kyselé fosfatáze je termolabilnější a její teplotní rozmezí inaktivace se pohybuje v hodnotách 63 – 65 °C po dobu 30 minut. Alkalická fosfatáza slouží jako indikátor účinnosti vysoké pasterace (Deeth et al. 2021).

3.4.1.3.3 Proteázy

Mezi nativní proteolytické enzymy v mléce patří plazmin, katepsin D, elastáza a jiné. Plazmin, hlavní nativní mléčná proteáza, je serinová proteáza, která se nachází v syrovém mléce v komplexním systému obsahujícím inaktivovaný prekurzor plazminogen spolu s aktivátory a inhibitory plazminogenu, které určují aktivitu plazminu. V syrovém mléce se většina plazminu vyskytuje ve formě neaktivního plazminogenu, přičemž uváděné hodnoty plazminogenu a plazminu se pohybují v poměru od 9:1 do 2:1 (Palomba et al. 2017). Jak plazmin, tak plazminogen jsou tepelně stabilní. Odolávají pasteraci a do určité míry také UHT ošetření. Aktivátory a inhibitory plazminogenu stejně jako inhibitory plazminu jsou termolabilní. V čerstvém mléce je plazmin vázán především na kaseinové micely, přičemž hlavním substrátem jeho proteolytické aktivity je β -kasein. Syrovátkové bílkoviny jsou vůči hydrolyze plazminem většinou rezistentní. Dle Glantz et al. (2020) zvýšený počet somatických buněk v mléce koreluje se zvýšeným množstvím plazminu v mléce. Aktivita

plazminu se zvyšuje také při mastitidách, s paritou a v časně a pozdní laktaci (Glantz et al. 2020). Plazmin může způsobit proteolýzu v UHT mléce během skladování, jestliže podmínky tepelného ošetření nejsou dostatečné k jeho inaktivaci. Méně aktivní plazmin zůstává v mléce po nepřímém UHT ošetření z důvodu většího příkonu tepla ve srovnání s přímým tepelným ošetřením (Palomba et al. 2017). Dle Asselt et al. (2008) je účinnou podmínkou pro zabránění proteolýzy plazminu v UHT mléce přehřívací teplota 80 °C po dobu 300 s. Dle Rauh et al. (2014) by tato přehřívací teplota měla být dokonce 95 °C po dobu 180 s.

Katepsin D je asparaginová proteáza, která stejně jako plazmin existuje v mléce ve formě neaktivního prekurzorového proteinu, prokatepsinu D. Kromě toho existuje ještě třetí forma, pseudokatepsin D, která vzniká hydrolyzací prokatepsinu D se ztrátou 18 aminokyselin. Pseudokatepsin D je hydrolyzován na katepsin D se ztrátou 26 aminokyselin. Prokatepsin D je hlavní formou katepsinu D v mléce. Proteolytická aktivita způsobená nativním prokatepsinem D v mléce přispívá k proteolýze v sýrech s nízkým pH, jako je sýr feta (Deeth et al. 2021).

Mezi mikroorganismy, představující nejzávažnější zdravotní problémy, náleží skupina psychrotrofních mikroorganismů, která produkuje exogenní enzymy v syrovém mléce. Nejčastěji se jedná o rod *Pseudomonas*, ale patří sem rovněž rod *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Serratia* či *Bacillus*. Bakteriální proteázy jsou produkovány v pozdní log fázi, kdy počet bakterií představuje 10^6 až 10^8 KTJ v 1 ml. Většina těchto proteáz je tepelně stabilních a může si zachovat určitou aktivitu i po UHT záhřevu. Obvykle se jedná o metaloproteinázy, jelikož tyto enzymy k optimalizaci své aktivity vyžadují přítomnost kovového iontu jako je vápník. Proteázy produkované těmito bakteriemi jsou aktivní v širokém rozsahu pH a teplot. Psychrotrofní mikroorganismy dokáží růst v chladu při teplotách nižších než 7 °C. Některé bakteriální proteázy vykazují různé rychlosti inaktivace při nízkých a vysokých teplotách. Například proteáza produkovaná bakterií *Serratia marcescens* vykazuje rychlou inaktivaci pod teplotu 65 °C, pomalou inaktivaci nad teplotu 95 °C a kolísavou inaktivaci mezi teplotou 65 – 95 °C (Glantz et al. 2020). Dle Deeth. et al (2021) je vhodnou prevencí pro inaktivaci bakteriálních proteáz kombinace tepelného záhřevu při nízkých teplotách spolu s UHT záhřevem, což je mnohem účinnější než samotný UHT záhřev (Deeth et al. 2021). Množství psychrotrofních mikroorganismů v mléce je ovlivněno hygienou při jeho získávání, ošetření a skladování. Primárním zdrojem této skupiny mikroorganismů jsou krmiva, kontaminovaná voda a prach. Nejvýznamnějším sekundárním zdrojem jsou nedostatečně čištěné plochy, které přicházejí do styku s chlazeným mlékem, dále potrubí a chladicí nádrže. Za správných hygienických podmínek by měl představovat obsah těchto bakterií v mléce méně než 10 %. Pokud by na farmách docházelo k nehygienickým podmínkám, tvořily by psychrotrofní mikroorganismy více než 75 % celkových přítomných bakterií (Palomba et al. 2017).

3.4.2 Význam proteáz ve vztahu ke kvalitě a využití kozího mléka

Kvalita mléka a mléčných produktů se odvíjí od hygienických podmínek a technologického zařízení zemědělské prvovýroby, přes svoz a příjem mléka

v mlékárenských závodech, až po proces zpracování a ošetření mléka. Proteázy jsou významné z důvodu své termostability a podílu na kažení mléka. Enzymatická hydrolýza bílkovin má za následek rozklad kaseinových proteinů a je spojena se změnami struktury a ovlivněním chuti a vůně sýrů během zrání. Nejčastěji dochází ke kyselému zápachu a k hořké chuti. Proteolytická aktivita je současně spojena s nižší výtěžností sýrů a s gelováním mléka během jeho skladování. Následkem těchto jevů se snižuje údržnost mléka a akceptovatelnost mléčných produktů spotřebiteli. Rozsah proteolýzy je úměrný množství přítomných enzymů a délce jejich působení za daných podmínek. Mezi kaseinovými frakcemi je κ -kasein hydrolizován nejrychleji, když je teplota mléka vyšší než 4 °C, což má za následek tvorbu para- κ -kaseinového komplexu. Rozklad α a β -kaseinu je při stejné teplotě poněkud méně výrazný a obecně není pozorovaný při teplotách 4 °C (Glantz et al. 2020).

Bakteriální proteázy v mléce napadají všechny formy kaseinových bílkovin, přičemž přednostně hydrolyzují κ -kasein následovaný β -kaseinem. Hydrolýza κ -kaseinu může mít za následek destabilizaci kaseinových micel, která vede k produkci malých peptidových fragmentů a k rozvoji hořké chuti mléka (Palomba et al. 2017). Proteolytické změny se projevují rovněž zvýšením koncentrace neproteinového dusíku a tvorbou para- κ -kaseinového komplexu doprovázenou koagulací mléka (Chen et al. 2003). Rod *Bacillus* produkuje široké spektrum proteolytických enzymů, které se liší množstvím a relativním poměrem mezi jednotlivými kmeny (Samarzija et al. 2012). Proteázy jež jsou produkovány rodem *Bacillus* mají obvykle optimální pH v alkalickém rozmezí a teplotní optimum při 30 – 37 °C (Chen et al. 2003). V důsledku proteolytické aktivity způsobené *Bacillus spp.* dochází k výraznému zvýšení koncentrace volného tyrosinu, který se může v mléce zvýšit až na 2,13 mg/ml, ve srovnání s množstvím jeho počáteční hodnoty, která představuje přibližně 0,65 mg/ml (Nabrdalik et al. 2010).

Význam proteáz může mít současně pozitivní efekt v případě sýrů během fáze zrání. Proteázy dodávají konečnému výrobku charakteristický chuťový profil a jsou velmi významné pro vývoj textury. Plazmin je zvláště důležitý při zrání sýrů vyrobených s použitím vysokých teplot, které inaktivují syřidlo. Tato výroba inaktivuje inhibitory a aktivátory plazminu a iniciuje aktivaci plazminogenu na plazmin. Kromě toho jsou inhibitory plazminu z velké části odloučeny v syrovátce, zatímco plazmin, plazminogen a aktivátor plazminogenu zůstávají v kaseinových micelách a jsou proto uchovány v sýřenině (Ardö 2021). Marino et al. (2005) uvádí, že přidavek extraktů ze somatických buněk do kvalitního mléka ovlivnil rychlost proteolýzy v mléce i v sýrech a chemické složení sýrů během zrání. Když byly somatické buňky přidány do mléka po pasterizaci, byl jejich přínos k proteolýze jak v mléce, tak v sýru nejvyšší. Pasterace tedy snížila, ale neodstranila enzymatickou aktivitu spojenou s buňkami (Marino et al. 2005). V rámci studie kaseinových hydrolyzátů byly identifikovány hlavní sloučeniny odvozené od kaseinových bílkovin působením proteáz somatických buněk. A-s-1-kasein byl štěpen rychleji při pH 5,2 než při pH 6,6, což naznačuje, že kyselé proteinázy v somatických buňkách jsou pravděpodobně nejvýznamnější pro fermentované mléčné výrobky (Palomba et al. 2017).

3.5 Významné faktory ovlivňující celkovou kvalitu mléka

Kvalita i kvantita nadojeného mléka jsou klíčové pro ekonomický úspěch v mlékařství. Oba zmíněné aspekty jsou závislé na celé řadě faktorů jako je stádium laktace, způsob dojení a chovu, výživa, plemeno či zdravotní stav zvířete. Kvalita mléka se týká především jeho vhodnosti ke konzumaci a ke zpracování na mléčné výrobky. Poukazuje však také na zdravotní status zvířete nebo stáda, které toto mléko produkuje. Infekce mléčné žlázy má za následek zhoršení koagulačních vlastností mléka a zvýšení proteolytické aktivity, která má negativní vliv na zpracovatelnost mléka pro výrobu sýrů (Leitner et al. 2016). Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující celkovou kvalitu mléka patří počet somatických buněk (PSB) a přítomnost patogenních mikroorganismů (Bagnicka et al. 2011).

3.5.1 Somatické buňky v kozím mléce

PSB je považován za nepřímý indikátor kvality hygieny mléka a zdravotního stavu mléčné žlázy. Vyšší hodnoty PSB nad fyziologickou hodnotu mohou signalizovat zánětlivé onemocnění – mastitidu a mít negativní vliv na technologické zpracování mléčných výrobků, kdy mléko disponuje především horší syřitelností (Souzaa et al. 2012).

3.5.1.1 Charakteristika a původ somatických buněk

Somatické buňky (SB) jsou přirozenou složkou syrového mléka. První skupinu SB tvoří buňky epitelální vznikající deskvamací epitelu a fyziologickou regenerací mléčných alveolů. (Podhorecká et al. 2021). Druhá skupina SB pochází z krve, ve které jsou převládajícím typem buněk především leukocyty, a to zejména makrofágy, polymorfonukleární neutrofilů a lymfocyty (Li et al. 2014). Leukocyty se podílejí na fagocytóze přítomných patogenních mikroorganismů, obnovují napadené a postižené tkáně a produkují specifické protilátky regulující imunitní reakce organismu. Vyjma zmíněných krevních buněk se v mléce vyskytují také eozinofilní a bazofilní leukocyty a erytrocyty (Tedde et al. 2019). Erytrocyty se mohou nacházet v kolostru, v mléce se objevují při těžkých zánětech či při poranění nejčastěji strukových vývodů. Kozí mléko obsahuje přirozeně více SB z důvodu vyššího množství epitelálních buněk a jejich fragmentů. Příčinou vyššího PSB v kozím mléce je rovněž odlišný typ sekrece mléka. Na rozdíl od dojnic s mezokrinním typem sekrece, je u koz typická sekrece apokrinní. Z apokrinní sekrece v mléčné žláze pocházejí cytoplazmatické částice, jež jsou přirozenou součástí kozího mléka. Tyto částice neobsahují jádro ani DNA, proto nejsou klasifikovány jako buňky. Naproti tomu obsahují hojné množství proteinů a RNA. (Podhorecká et al. 2021).

Polymorfonukleární neutrofilů jsou hlavním typem leukocytů vyskytujících se v mléce zdravých koz a tvoří více než 40 % celkového PSB. Naproti tomu mléko kravské a ovčí obsahuje převážně makrofágy a při mastitidách dochází u těchto savců ke zvyšování obsahu polymorfonukleárních neutrofilů. Při infekci mléčné žlázy u koz je množství polymorfonukleárních neutrofilů stále dominantní (Tedde et al. 2019). Tento typ leukocytů

dosahuje velikosti 9 – 10 μm a má charakteristické segmentované jádro, které se intenzivně barví. Jádro tvoří jednotlivé laloky, které spojují filamenty. Největšími buněčnými elementy mléčné žlázy jsou makrofágy, které měří 10 – 45 μm . Diferencují se z krevních monocytů, které náhodně migrují do různých tkání, ve kterých se usazují jako zralé makrofágy bez nutného vlivu lokálního zánětu. V mléce vykazují obvykle stejnou strukturální podobu jako v krvi. Tvar makrofágů je oválný, eventuálně kulatý. Jejich jádro je fazolovitého tvaru a cytoplazma se barví světle. Na rozdíl od polymorfonukleárních neutrofilů reagují pomaleji na vnější podnět. Po uplynutí 8 – 12 hodin po nadojení jsou makrofágy převládajícím typem buněk v ložiscích zánětu. Lymfocyty jsou nefagocytujícími buňkami mléčné žlázy. Jejich tvar je sférický. Mají velké jádro, které se na rozdíl od cytoplazmy barví tmavě a vyplňuje většinu buňky. Malé lymfocyty dosahují velikosti 5 – 7 μm , velké lymfocyty měří 12 – 15 μm . Populace těchto leukocytů v mléce zahrnuje B a T buňky, které hrají významnou roli v humorální a buňkami zprostředkované imunitě (Souzaa et al. 2012).

Katelicidin je protein podílející se na vrozené imunitě mléčné žlázy. Tato bílkovina vykazuje jak přímou antimikrobiální aktivitu, tak i chemotaktické a regulační funkce. Katelicidin má významný potenciál jako specifický citlivý marker mastitidy. Tedde et al. (2019) zjistili silnou korelaci mezi hladinami katelicidinu v kozím mléce a PSB. Přestože je katelicidin produkován epitelovými buňkami mléčné žlázy, je spojen především s polymorfonukleárními neutrofily, kde se hojně vyskytuje uložený v cytoplazmatických granulech. Díky tomu může katelicidin odrážet nárůst polymorfonukleárních neutrofilů lépe než celkový PSB a působit tak jako spolehlivější marker zánětu mléčné žlázy, zejména na konci laktace (Tedde et al. 2019).

PSB v mléce je velmi variabilní a je ovlivněn mnoha faktory jako je druh a plemeno zvířete, výživa, stres, technika dojení, ale také faktory individuální a environmentální. Vysoké množství PSB je rovněž při zahájení laktace, kdy se v mléce vyskytuje vysoký obsah leukocytů, kolostrálních tělísek a epitelálních buněk. K mírnému zvýšení PSB dochází také na konci laktace, kdy pomalu dochází k přípravě na laktaci následující, a tím k regeneraci epitelu mléčné žlázy (Tedde et al. 2019). Některé neinfekční faktory jako je fáze laktace a parita mají větší vliv na PSB u koz ve srovnání s ovcemi a skotem. Ukazuje se, že PSB u koz se mění variabilně během dne, kdy existují přechodná zvýšení PSB, jež mohou trvat 1 – 3 dny, ve kterých se PSB dokáže zvýšit 2 – 20 krát (Mehdid et al. 2019). Bylo prokázáno, že PSB u koz zvyšuje rovněž estrus (Moroni et al. 2007; Christodoulopoulos et al. 2008). Na farmách účinkuje několik faktorů, jako jsou podmínky prostředí či krmivo, které mohou způsobit různé stupně stresu, který ovlivňuje pohodu zvířat. Stres spouští aktivaci hypotalamicko-hypofyzárně-nadledvinové osy, zvyšuje sekreci glukokortikoidů a počet leukocytů v krvi, ve které současně dochází ke snížení poměru neutrofilů a lymfocytů (Mehdid et al. 2019). Někteří autoři se domnívají, že určité zdánlivě stresující situace, jako je dojení, zvyšuje PSB (Karzis et al., 2004; Salama et al., 2003) Dle Yagi et al. (2004) dochází ke zvýšení PSB v důsledku stresu způsobeného přepravou zvířat. Naproti tomu McDougall et al. (2002) zjistili, že stres vyvolaný 45 minutovým transportem neovlivňuje PSB.

3.5.1.2 Enzymatický systém somatických buněk

Součástí somatických buněk jsou vlastní endogenní enzymy známé jako mléčné autochtonní enzymy, které přímo ovlivňují technologické vlastnosti mléka a finální kvalitu mléčných produktů. Při nadlimitním množství SB dochází k jejich lýze a následnému uvolňování enzymů, které v tomto zvýšeném množství způsobují žluknutí mléčného tuku, degradaci bílkovin včetně prospěšných látek s antimikrobiálním účinkem, štěpení laktózy či kažení a hnití mléka (Albenzio et al. 2015). Ze studií, které realizovali Raynal-Ljutovac et al. (2008) vyplývá, že SB mají vlastní proteolytický systém, který dokáže měnit kaseinové frakce, které mají následně dopad na snížení pevnosti sýřeniny. Endogenní enzymy nacházející se v somatických buňkách mohou dokonce ovlivnit organoleptické vlastnosti mléka či utlumit růst ušlechtilých bakterií mléčného kvašení. Studie od Li et al. (2014) poukazují na žádoucí úlohu SB, jejichž enzymy mají schopnost urychlit proteolýzu při zrání sýrů a zlepšit senzorickou kvalitu sýrů.

Hlavní endogenní enzymy ze SB v mléce pocházejí obecně z makrofágů a z neutrofilních granulocytů. Patří mezi ně lipázy (např. lipoproteinová lipáza), oxidázy (např. kataláza a laktoperoxidáza), glykosidázy (např. lysozym) a proteázy (např. katepsiny, elastáza a kolagenáza). Lipoproteinová lipáza je aktivní i po pasterizaci mléka a podílí se na produkci volných mastných kyselin v mléce během skladování. Kromě toho je pasterizované mléko s vysokým PSB náchylnější k lipolýze oproti mléku, jež obsahuje nízký PSB (Tedde et al. 2019). Srovnání proteomů z makrofágů a membrán tukových kuliček v mléce ukazuje, že mají mnoho společných proteinů včetně enzymů, například: annexin, vimentin, apolipoprotein, α -enoláza, aktin, NADP1-dependentní izocitrát dehydrogenáza a další. Nelze vyloučit uvolňování těchto proteinů v mléce jako přirozený jev nebo během technologických procesů, které mohou vést k podcenění jejich úlohy v konečné kvalitě mléčných výrobků (Li et al. 2014).

3.5.1.2.1 Proteázy pocházející ze somatických buněk

Endogenní proteázy působí na kaseinové bílkoviny v mléce i během procesu zpracování. Mohou, proto modifikovat rozklad kaseinových proteinů v mléčných produktech a dávat různé texturní a organoleptické vlastnosti finálním mléčným výrobkům. Mohou rovněž snižovat výtěžnost sýrů. Katepsiny B, D, G a elastáza jsou zodpovědné za hydrolýzu α -s-1-kaseinů a β -kaseinů (Moatsou 2010). Katepsin D může hydrolyzovat všechny kaseiny (α -s-1-, α -s-2-, β - a κ -kaseiny). Jeho aktivita je však nejvyšší u α -s-1-kaseinu se širokým spektrem štěpných míst. Katepsin D obsahuje štěpná místa podobná chymosinu. Chymosin, hlavní aktivní proteáza syřidla používaného při výrobě sýrů, je zodpovědný za srážení mléka a způsobuje vznik sýřeniny a odloučení syrovátky. Katepsin B má společná štěpná místa s katepsinem D a chymosinem, zejména na vazbě Phe23-Phe24 α -s-1-kaseinu (Albenzio et al. 2015). Endogenní enzymy SB vykazují různé aktivity v závislosti na svém původním umístění v organismu. Aktivita katepsinu D v alveolárních makrofázích je šedesát krát vyšší ve srovnání s neutrofilními granulocyty, zatímco v lymfocytech tato aktivita detekovaná není. Přítomnost

některých endogenních enzymů SB v mléce může měnit aktivitu jiných enzymů v mléce. Například aktivátory plazminogenu, z nichž pochází ze SB, mohou modifikovat aktivitu plazminu (Albenzio et al. 2015).

Katepsin D je již více než století velmi diskutován v oblasti humánní medicíny, protože se jedná o nádorový marker. Množství katepsinu D v kozím mléce je čtyřikrát až sedmkrát vyšší než v mléce kravském. Tento typ proteázy je schopen přežít většinu tepelných úprav používaných při výrobě sýra a je stabilní při různých hodnotách pH od 3,5 – 7. Koncentrace katepsinu D negativně koreluje s hladinou kaseinových bílkovin pravděpodobně v důsledku hydrolyzační schopnosti tohoto enzymu. Negativní korelace je rovněž mezi aktivitou tohoto enzymu a PSB. Naproti tomu kozí mléko s vysokým počtem SB, které korelují se subklinickou a klinickou mastitidou, obsahuje katepsin G (Boulaaba et al. 2011).

Elastáza, jež je přítomná především v neutrofilních granulocytech, má výrazně vyšší aktivitu, pokud tato skupina bílých krvinek masivně přechází z krve do mléka v průběhu mastitidy. Aktivita elastázy má pozitivní korelaci s PSB v kozím mléce (Li et al. 2014).

3.5.2 Mikrobiologická kvalita kozího mléka

Celkový počet mikroorganismů (CPM) je základním kritériem pro hodnocení mikrobiologické kvality kozího mléka (Kuchtík et al. 2015). Druhy bakterií přítomných v mléce mohou ovlivnit výrobu sýrů, jejich trvanlivost a mohou podporovat zdraví nebo způsobovat onemocnění spotřebitelům mléka a mléčných výrobků. Mikrobiální profil syrového mléka může také poskytnout informace o zdravotním stavu mléčné žlázy, protože se mění v reakci na zánětlivá onemocnění, jako je např. mastitida (McInnis et al. 2015). CPM v kozím mléce ovlivňuje rovněž řada faktorů jako je zdravotní stav zvířete, plemeno, farma, hygiena vemene a dojícího zařízení, teplota, skladování, transport mléka aj. (Kuchtík et al. 2015). Dle McInnis et al. (2015) ovlivňuje bakteriální populace v mléce laktační cyklus. Mikrobiota mléka na konci laktace se liší od mikrobiologie mléka na začátku a uprostřed laktace. Do CPM se řadí všechny fakultativně anaerobní a mezofilní aerobní mikroorganismy, tedy nejen bakterie, ale i kvasinky a plísně, které jsou schopné růst za stanovených podmínek při teplotě 30 °C (Kuchtík et al. 2015).

Dle Bagnické et al. (2011) jsou hlavními patogeny kozího mléka *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* a *Streptococcus agalactiae*. Kozí mléko obsahuje rovněž minoritní patogeny, mezi které se řadí koaguláza-negativní stafylokoky jako jsou *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus epidermidis*, dále alfa-hemolytické streptokoky, *Enterococcus spp.* a *Corynebacterium spp.* Ze studie, kterou realizovala Podhorecká et al. (2021) vyplývá, že kvalitu mléka ovlivňuje i nízký počet koaguláza-negativních stafylokoků. Tyto bakterie, způsobující mastitidu v mléčné žláze, mohou měnit kvalitu mléka i v případě, že je počet mikrobů v rámci přípustných limitů pro objemové mléko, které nařizuje legislativa. Dle Kuchtíka et al. (2015) patří mezi nejvýznamnější alimentární patogeny kozího mléka *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* a *Campylobacter spp.* Ze studie, kterou uskutečnila Bogdaničová et al. (2016) vyplývá, že se ve vzorcích kozího mléka vyskytovala v největším

podílu bakterie *Escherichia Coli* (90,3 %), následovaná *Staphylococcus aureus* (29 %) a *Listeria monocytogenes* (3,2 %). Různé druhy koaguláza-negativních stafylokoků jsou hlavním typem bakterií způsobujících mastitidu koz. Mastitidy vyvolané těmito mikroorganismy se nemusí projevovat vysokým nárůstem PSB (Bogdaničová et al. 2016). Koaguláza-negativní stafylokoky pocházejí z pokožky vemene a z vnějšího prostředí, proto je jejich výskyt v kozím mléce způsoben nesprávnými postupy při strojním dojení.

Klinická mastitida se projevuje u koz, jejichž mléko obsahuje majoritní patogeny, nicméně ne vždy se musí její známky projevit u všech zvířat napadených těmito patogeny. Subklinické záněty mléčné žlázy způsobují oxidační stres, protože tvorba volných radikálů převažuje nad tvorbou antioxidantů. Subklinickou mastitidu způsobují v nejširším měřítku minoritní patogeny. Celková hodnota minoritních patogenů narůstá s postupem laktace. S výskytem patogenních mikroorganismů souvisí rovněž mléčná užitkovost, přičemž platí, že při poklesu těchto nežádoucích bakterií se mléčná užitkovost koz zvyšuje (Bagnicka et al. 2011). Termostabilní enterotoxiny produkované *Staphylococcus aureus* a dalšími majoritními patogeny hrají důležitou roli v alimentárních onemocněních. *Staphylococcus aureus* produkuje leukotoxiny a další virulentní činitele, jako jsou hemolyziny, exfoliativní toxiny a toxiny způsobující syndrom toxického šoku. Kromě toho tyto bakterie mají schopnost tvořit sliz a biofilm v mléce. Termostabilní enterotoxiny a toxiny jsou zodpovědné za subklinickou i klinickou mastitidu. Minoritní patogeny jsou odolnější vůči antimikrobiálním látkám ve srovnání se *Staphylococcus aureus* (Bagnicka et al. 2011).

Významnou skupinou mikroorganismů kontaminující mléko jsou psychrotrofní bakterie. Nejčastějšími rody jsou: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* a *Achromobacter*. Skupiny těchto mikroorganismů mohou představovat i více než 90 % z CPM (Kalhotka et al. 2013). Mnoho psychrotrofních bakterií izolovaných ze syrového mléka je schopno produkovat extracelulární enzymy při chladírenských teplotách. Tyto enzymy způsobují hydrolýzu mléčných bílkovin a lipidů, což má za následek horší mikrobiologické parametry a negativní vliv na kvalitu mléčných výrobků. Zdrojem kontaminace psychrotrofních mikroorganismů v mléce může být voda, půda, vzduch, rostliny, zvířata a člověk (Bendich et al. 2002). Kalantzopoulos et al. (2003) zjistili, že pokud je obsah psychrotrofních bakterií v mléce příliš nízký, poruší se nejen patogenní mikrobiota, ale také nepatogenní, přirozená, jež má zřetelný dopad na vlastnosti mléčných produktů vyrobených ze syrového mléka.

Koliformní bakterie jsou aerobní a fakultativně anaerobní, asporogenní, gramnegativní bakterie, které jsou schopny fermentovat laktózu za vzniku kyseliny a plynů do 48 h při teplotě 32 nebo 35 °C. Tato skupina mikroorganismů zahrnuje rody: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* a *Klebsiella*. Koliformní bakterie jsou indikátorem primární a sekundární kontaminace v mléce (McInnis et al. 2015).

Bakterie mléčného kvašení jsou důležitou skupinou mikroorganismů v syrovém mléce. Tato skupina zahrnuje rody: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* a *Enterococcus*. Tyto mikroorganismy se do mléka dostávají během pastvy a dále sekundárně z prostředí, kde se s mlékem manipuluje. Bakterie mléčného kvašení jsou

klíčové při výrobě fermentovaných mléčných výrobků, ale v syrovém mléce by se jejich aktivita mělo zabránit dodržováním hygienických předpisů a rychlým důkladným zchlazením mléka po jeho nadojení. Enterokoky představují velkou část autochtonních bakterií spojenou s gastrointestinálním traktem savců. Vyskytují se v půdě, vodě a na rostlinách (Kalhotka et al. 2013). Přítomnost enterokoků v mléčných výrobcích lze přisuzovat nevhodným hygienickým podmínkám při získávání či zpracování mléka. Významná kontaminace mléka enterokoky může být způsobena dojícím zařízením a krmivem (Görner & Valík 2004).

3.6 Kritéria pro syrové kozí mléko dle legislativy

Celkový počet mikroorganismů je jediným legislativně podchyceným mikrobiologickým kritériem pro hodnocení syrového kozího mléka v ČR. Výjimku tvoří počet bakterií *Staphylococcus aureus*, který je zřízený Vyhláškou č. 11/2015. CPM stanovuje Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004 o zvláštních hygienických pravidlech pro potraviny živočišného původu definuje syrové mléko jako mléko produkované sekrecí mléčné žlázy hospodářských zvířat, které nebylo zahřáto na teplotu více než 40 °C nebo nebylo podrobena žádnému jinému ošetření s rovnocenným účinkem.

Provozovatelé potravinářských podniků musí podle platné legislativy ES zavést postupy s cílem zajistit, aby mléko splňovalo následující kritéria:

- Syrové kozí mléko určené k výrobě konzumního tepelně ošetřeného mléka nebo tepelně ošetřených mléčných výrobků musí splňovat CPM při teplotě 30 °C na 1 ml < 1 500 000 KTJ ¹
- Pokud je syrové kozí mléko určeno k produkci výrobků postupem, který nezahrnuje žádné tepelné ošetření, musí provozovatelé potravinářských podniků učinit opatření, jimiž zajistí, aby použité syrové mléko splňovalo CPM při teplotě 30 °C na 1 ml < 500 000 KTJ ²

Dodržování požadavků uvedených ve výše zmíněných oddílech musí být kontrolováno na základě namátkového odběru reprezentativního počtu vzorků během svozu v produkčním hospodářství nebo při příjmu syrového mléka do podniku pro ošetření mléka nebo do zpracovatelského podniku (European Parliament and the Council 2004).

V některých evropských státech či regionech dochází k finančnímu prémiování ceny kozího mléka, pokud obsahuje nižší CPM. Například v Norsku se prémiumuje kozí mléko s množstvím CPM nižším než $2,0 \times 10^4$ KTJ/ml. Naproti tomu ve Španělsku jsou hodnoty CPM pro prémiování kozího mléka vyšší a jejich obsah musí být nižší než $5,0 \times 10^5$ KTJ/ml. V USA se tato komodita prémiumuje při výkupu pod podmínkou nižší hodnoty CPM než $1,0 \times 10^5$ KTJ/ml. V Jižní Austrálii činí limit CPM pro výkup $5,0 \times 10^4$ KTJ/ml, na rozdíl od Západní Austrálie, kde tento limit musí dosahovat maximálně $1,5 \times 10^5$ KTJ/ml, přičemž v Brazílii vykazuje národní limit $5,0 \times 10^5$ KTJ/ml (Kuchtík et al. 2015).

¹ Klouzavý geometrický průměr za dvouměsíční období, alespoň dva vzorky za měsíc.

² Klouzavý geometrický průměr za dvouměsíční období, alespoň dva vzorky za měsíc.

PSB v kozím mléce je kritérium, u kterého v EU není doposud stanovena žádná limitní hranice. Naproti tomu limitní hranice PSB u mléka kravského představuje 400 000/ml (European Parliament and the Council 2004).

3.7 Vybrané analytické metody pro stanovení látek s antimikrobiálním a enzymatickým účinkem

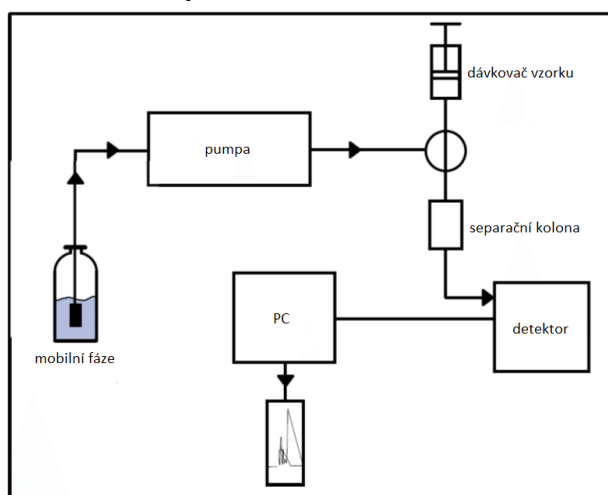
3.7.1 Laktoferin a lysozym

3.7.1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je fyzikálně-chemická separační metoda, jejíž principem je rozdílná distribuce látek mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Mobilní fází bývá nejčastěji kapalina, jež je do systému přiváděna za vysokého tlaku. Stacionární fází může být pevná látka nebo kapalina, která je nemísitelná s fází mobilní. Během analýzy dochází k unášení vzorku mobilní fází skrze kolonu, jež obsahuje stacionární fází (Moldoveanu & David 2016). Na základě interakcí se stacionární fází dochází k postupnému zachytávání a vymývání jednotlivých složek vzorku. Významným parametrem HPLC je počet teoretických pater, který udává účinnost kolony a dále rozlišení, které udává míru oddělení dvou píků od sebe (Wellings 2005).

Detektory kapalinových chromatografů jsou zařízení, která monitorují změny složení mobilní fáze měřením fyzikálních nebo chemických veličin. Existuje mnoho detektorů používaných v HPLC, jejichž výběr závisí na typu analyzované látky. Jako příklady lze uvést detektor diodového pole, UV/VIS detektor a dále fluorescenční, refraktometrický, amperometrický či hmotnostní spektrometr (Wellings 2005).

Ve studiích, které realizovali Dračková et al. (2009), Tsakali et al. (2014) a Maurmayr et al. (2013) byl použit během analýzy laktoferinu v mléce detektor diodového pole či UV/VIS. V případě stanovení koncentrace lysozymu v mléce byla ve studii od Pellegrino et al. (2000) zaznamenána nejvyšší citlivost při použití fluorescenčního detektoru. Zjednodušené schéma HPLC je znázorněno na obrázku č. 2.



Obrázek 2: Schéma vysokoučinné kapalinové chromatografie (Zhang et al. 2016)

3.7.2 Proteolytická aktivita kozího mléka

3.7.2.1 Spektrofotometrické metody

Podstatou této analytické metody je měření vlastností vzorku na základě schopnosti molekul pohlcovat elektromagnetické záření. Přijetím tohoto záření přechází molekuly z roztoku v květě do tzv. excitovaného stavu, kdy dochází k přechodu molekul ze stavu s nižší energií do stavu s energií vyšší. Pomocí této interakce lze zjistit koncentrace hledané látky. Molekuly dokážou absorbovat elektromagnetické záření pouze v určitém rozsahu vlnových délek, dle kterého se spektrofotometrické metody rozdělují na metody, u kterých dochází k výměně energie a metody u kterých nikoliv (polarimetrie, refraktometrie).

U metod, při kterých dochází k výměně energie, probíhá reakce absorpční a emisní. Během absorpční spektrofotometrie prochází záření vzorkem, aniž by se od látky odrazilo. Při emisní spektrofotometrii je nejprve dodána energie látce z důvodu dosažení excitovaného stavu, poté je měřena energie, jež je uvolněna při návratu molekuly na původní energetickou hladinu. Existují tři základní metody absorpčních metod: molekulová absorpční spektrofotometrie ve viditelné oblasti (VIS) elektromagnetického spektra, v ultrafialové oblasti (UV) elektromagnetického spektra a v infračervené oblasti (IR) elektromagnetického spektra (Gupta 2017; Owen 2017).

Spektrofotometrické stanovení je u mléka vhodné téměř na všechny jeho komponenty, přičemž daný typ spektroskopie je dán vlastnostmi měřené látky. Takto lze stanovit např. antioxidační či enzymatickou aktivitu mléka. Současně lze tuto metodu použít ke stanovení proteolytické aktivity mléka, kterou ve svých studiích prověřovali Bendicho et al. (2002), Lopes et al. (2013) a Junior et al. (2020). Bendicho et al. (2002) stanovovali proteolytickou aktivitu mléka při vlnové délce 345 nm, Lopes et al. (2013) tuto aktivitu proměřovali při 340 nm a Junior et al. (2020) dosáhli nejlepších výsledků při vlnové délce dokonce 440 nm. Všichni autoři použili k měření UV/VIS spektrofotometr.

4 Metodika

V rámci této diplomové práce byla zvolena metoda pro stanovení antimikrobiálních látek – laktoferinu a lysozymu v kozím mléce dle Dračkové et al. (2009) a Tsakali et al. (2014). Obě látky byly měřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s FLD detektorem. Pro stanovení celkové proteolytické aktivity byla zvolena metoda dle Junior et al. (2020). Proteázy mléka byly měřeny pomocí spektrofotometru. Uvedené metody z literatury byly vhodně optimalizovány tak, aby lépe vyhovovaly testovanému typu matrice, ale rovněž potřebám laboratorní činnosti, ve které bylo stanovení prováděno. V případě laktoferinu a lysozymu byla převzata v rámci optimalizace zejména vyšší teplota a průtok mobilní fáze dle Maurmayr et al. (2013). V případě proteolytické aktivity mléka byla v rámci optimalizace zredukována doba inkubace vzorků při požadované teplotě vodní lázně.

Ve spolupráci s Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. bylo provedeno stanovení celkového počtu mikroorganismů dle ČSN EN ISO 4833-1. Stanovení počtu stafylokoků bylo uskutečněno pomocí kultivace na *Staphylococcus* agar (Sigma-Aldrich). Somatické buňky byly stanoveny přímo na farmě pomocí přístroje DCC (De Laval Cell Counter). Celkový obsah mléčných bílkovin, včetně kaseinů a syrovátkových bílkovin, byl vyhodnocen s využitím přístroje DairySpec FT (Bentley Instruments, Inc.)

4.1 Odběr vzorků

V rámci této práce bylo analyzováno celkem 58 individuálních vzorků kozího mléka od zvířat plemene koza bílá krátkosrstá. Vzorky mléka byly odebrány z ekologické biofarmy v ČR ve dnech 28. 6. a 30. 6. 2021. Jednalo se o večerní nádoj od zvířat na 2. laktaci s porody v březnu v krátkém časovém intervalu. První odstříky mléka byly odděleny a následovala dezinfekce hrotu struku lihovou utěrkou. Vzorky mléka byly odebrány do sterilních vzorkovnic, poté byly co nejrychleji zchlazeny na teplotu 4 – 5 °C a následně zamrazeny až do doby analýz.

4.1.1 Koza bílá krátkosrstá

Koza bílá krátkosrstá je české národní plemeno chované převážně pro výrobu sýrů. Vyznačuje se vysokou dojitostí, dobrou plodností, odolností a ranou březostí. Plemeno dosahuje středního až většího tělesného rámce. Srst je čistě bílá, krátká, hladká a bez pigmentace. Koza bílá krátkosrstá byla vyšlechtěna mezi lety 1900 a 1930, převážně v moravských oblastech, křížením místních koz se sánskými kozly dovezenými ze Švýcarska za účelem zlepšení produkce mléka. Z tohoto důvodu jsou tato zvířata řazena do skupiny sánských plemen. V současné době se lze setkat s chovem rohatých i bezrohých jedinců. Vzhled plemena znázorňuje obrázek č. 3 (Vostra-Vydrova et al. 2020).



Obrázek 3: Koza bílá krátkosrstá

4.2 Chemikálie

- Acetonitril (99,9%, Fisher Chemical, UK)
- Trifluoroctová kyselina ($\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- Azokasein (Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorid vápenatý (p. a., Lachema, ČR)
- Trispufr (min. 99%, Sigma-Aldrich, Německo)
- Trichloroctová kyselina (min 99,5 %, Merck, Německo)
- Hydroxid sodný (99,6%, Lach-Ner, s. r. o., ČR)
- Kyselina chlorovodíková (35%, Lach-Ner, s. r. o., ČR)
- Demineralizovaná voda

4.2.1 Standardy

- Laktoferin z kravského mléka ($\geq 85\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- Lysozym ze slepičího bílku ($\geq 90\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- Proteáza z bakterie *Bacillus sp.* (Sigma-Aldrich, USA)

4.3 Používané přístroje

- Chromatografický systém Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA) včetně vysokotlaké pumpy, autosampleru, termostatu kolon a FLD či UV/VIS detektoru (Ultimate 3000)
- Kolona Arion® C4-BIO 5 µm, 250 mm x 4,6 mm (Arion Bio, Chromservis s.r.o., ČR)
- Spektrofotometr (Helios GAMA UV, Chromspec, ČR)
- Centrifuge Eppendorf 5810 R (Merci s. r. o., Německo)
- Vacuum pump ME 2C NT (Vacuubrand, Německo)
- Analytická digitální váha (Kern 770, 4 desetinná místa)
- Analytická digitální váha (Ohaus, Explorer semi-micro balances, 5 desetinných míst, USA)
- pH metr (Schott, Německo)
- Magnetické míchadlo (IKA, Německo)
- Vodní lázeň (GFL, Německo)
- Ultrazvuková čistička PS 04000 (Notus-Powersonic s. r. o. VRABLE; Slovenská republika)
- Millipore zásobník na demineralizovanou vodu (18 µΩ)

4.4 Pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatické pipety (SOCOREX)
- HPLC vialky (Chromservis, Německo)
- Mikrofiltry (acetát celulóza, 0,45 µm, 25 mm, VWR, USA)
- Centrifugační zkumavky (eppendorf, 50 ml, VWR, USA)
- UV kyvety macro (VWR, Německo)

4.5 Příprava k analýze

4.5.1 Stanovená obsahu laktoferinu a lysozymu

Příprava k analýze byla provedena u 58 individuálních vzorků kozího mléka ve třech opakováních. Vzorky mléka byly nejprve pozvolně rozmrazeny ve studené vodě. Následně byly převedeny do centrifugačních zkumavek eppendorf a zcentrifugovány po dobu 10 minut při teplotě 8 °C a 3000 rcf. Kaseinové bílkoviny byly v mléce vysráženy pomocí 35% kyseliny chlorovodíkové na hodnotu izoelektrického bodu (pH 4,6). Poté byly vzorky opět zcentrifugovány za stejných podmínek. Po centrifugaci byl vzniklý supernatant převeden do skleněných vialek, ze kterých byl pomocí injekční stříkačky odebrán 1 ml vzorku do HPLC vialky přes mikrofiltr (acetát celulóza, 0,45 µm). Připravené vzorky byly důkladně promíchány a měřeny pomocí HPLC/FLD.

4.5.1.1 Příprava kalibračních roztoků

Pro standard lysozymu byla vytvořena sedmibodová kalibrační křivka s rozsahem (0,025 – 10 µg/ml) a pro laktoferin osmibodová kalibrační křivka s rozsahem (0,025 – 25 µg/ml).

4.5.2 Stanovení proteolytické aktivity mléka

K laboratornímu pokusu byl připraven 100 mM roztok Tris pufru, který obsahoval chlorid vápenatý o dané koncentraci. Dále byl použit 1% azokasein, 500 mM roztok NaOH a trichloroctová kyselina o dané molaritě (110 mM). Připravené roztoky azokaseinu a Tris pufru byly vloženy do vodní lázně, která byla nastavena na teplotu 37 °C. Za těchto podmínek zůstaly během celého laboratorního procesu. Dále bylo upraveno pH roztoku Tris pufru, které bylo sníženo na hodnotu 8 pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové za uvedené teploty vodní lázně.

Celkem bylo připraveno 58 vzorků kozího mléka, které byly analyzovány ve třech opakováních. Vzorky byly nejprve pozvolně rozmrazeny ve studené vodě. Následně byly převedeny do centrifugačních zkumavek eppendorf a zcentrifugovány po dobu 5 minut při teplotě 8 °C a 3000 rcf. Vzniklý supernatant byl odebrán do skleněných zkumavek a připraven k analýze. Dále byly nachystány skleněné vialky pro každý vzorek kozího mléka ve třech opakováních. Do každé vialky bylo odpipetováno 450 µl roztoku Tris pufru, 750 µl roztoku azokaisenu a 300 µl kozího mléka. Vzorek byl následně důkladně promíchán a vložen do vodní lázně. Po uplynutí 8 minut byl vzorek vyndán a 1 ml jeho objemu byl převeden do skleněné vialky spolu s 1 ml kyseliny trichloroctové (110 mM). Vzorek byl důkladně promíchán a poté byl zcentrifugován po dobu 5 minut při teplotě 20 °C a 3000 rcf. Následně byl znovu odebrán 1 ml supernatantu do skleněné vialky spolu s 1 ml roztoku hydroxidu sodného (500mM). Vialka byla důkladně promíchána a vzorek byl převeden do UV kvety a proměřen na spektrofotometru.

5.5.1.1 Příprava kalibračních roztoků

Pro standard proteázy byla připravena šestibodová kalibrační křivka s rozsahem (100 mU, 200 mU, 300 mU, 400 mU, 500 mU a 600 mU). Kalibrační roztoky byly připraveny stejným způsobem jako jednotlivé vzorky kozího mléka v kapitole 5. 5. 2. Rozdílem byla záměna přídávku 300 µl kozího mléka za 300 µl kalibračního roztoku o dané koncentraci.

4.6 Analýza a vyhodnocení dat

4.6.1 Laktoferin a lysozym

Podmínky měření pro provedení analýzy u laktoferinu a lysozymu byly dány požadavky HPLC kolony Arion® C4-BIO. Průtok mobilní fáze představoval 0,5 ml/min po celou dobu měření. Složení mobilní fáze se měnilo s časem (gradientová eluce) jak ukazuje tabulka č. 4.

V koloně byla udržována teplota 60 °C. Objem nástřiku vzorku byl 10 µl. Výsledky byly detekovány pomocí fluorescenčního detektoru (FLD), přičemž excitace dosahovala hodnoty 280 nm a emise 340 nm. Tyto výsledky bylo možné stanovit také na UV detektoru při 205 nm, ale FLD detektor vykazoval vyšší citlivost. Doba analýzy jednoho vzorku byla stanovena na 19 minut.

Výstupem byly chromatogramy jednotlivých vzorků kozího mléka, jejichž píky byly porovnány s chromatogramy standardů. Z důvodu odstranění chyb automatického hodnocení byla v programu Chromeleon provedena ruční úprava integrace píků.

- Složení mobilních fází:
 - A: 100% acetonitril (ACN)
 - B: 95 % ACN + 5 % H₂O + 0,1 % trifluoroctová kyselina (TFA)
 - C: 5 % ACN + 95 % H₂O + 0,1 % TFA

Tabulka 4: Gradientová eluce v HPLC

Retence (min)	Průtok (ml/min)	%B (95% ACN + 0,1TFA)	%C (5% ACN + 0,1 TFA)	%A (ACN)
0,0	0,5	20,0	80,0	0,0
0,5	0,5	30,0	70,0	0,0
6,0	0,5	35,0	65,0	0,0
10,0	0,5	40,0	55,0	5,0
15,0	0,5	50,0	50,0	0,0
16,0	0,5	20,0	80,0	0,0
19,0	0,5	20,0	80,0	0,0

4.6.2 Proteolytická aktivita mléka

Před samotným měřením vzorků byl nejprve vynulován spektrofotometr pomocí roztoku trispufru. Následně byly změřeny kalibrační roztoky standardu proteázy pomocí spektrofotometru při vlnové délce 440 nm. Výstupem byla lineární kalibrační křivka (viz obrázek č. 6), která představovala závislost získanou změřením absorbance sady kalibračních roztoků o vzrůstající koncentraci standardu analytu (v rozsahu 100 – 600 mU). Poté byly měřeny jednotlivé vzorky kozího mléka za stejných podmínek. Získané hodnoty absorbance vzorků byly vloženy do kalibrační křivky.

4.7 Statistická analýza

Statistické šetření bylo provedeno pomocí programu STATISTICA 12.0. a Microsoft Excel. Nejprve byly vyhodnoceny základní údaje laktoferinu a lysozymu pomocí popisné statistiky. Dále byly tyto látky prověřovány použitím nástroje ANOVY s interakcemi. Zde byla zjišťována statisticky významná rozdílnost výsledných efektů mezi jednotlivými vzorky kozího mléka.

Vzhledem k výsledným p-hodnotám byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi vzorky, a proto bylo následně provedeno podrobnější vyhodnocení pomocí Tukeyova testu. Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky laktoferinu a lysozymu jednotlivých vzorků kozího mléka byly vypočteny pomocí programu Microsoft Excel. Jako nástroj pro vyhodnocení celkové proteolytické aktivity mléka byla použita regresní a korelační analýza.

5 Výsledky

V této části práce byl stanoven obsah laktoferinu a lysozymu a celková aktivita proteáz v 58 individuálních vzorcích kozího mléka. Ve spolupráci s externí laboratoří byl proveden mikrobiologický rozbor a stanoven PSB. Všechny tyto vlivy byly zhodnoceny.

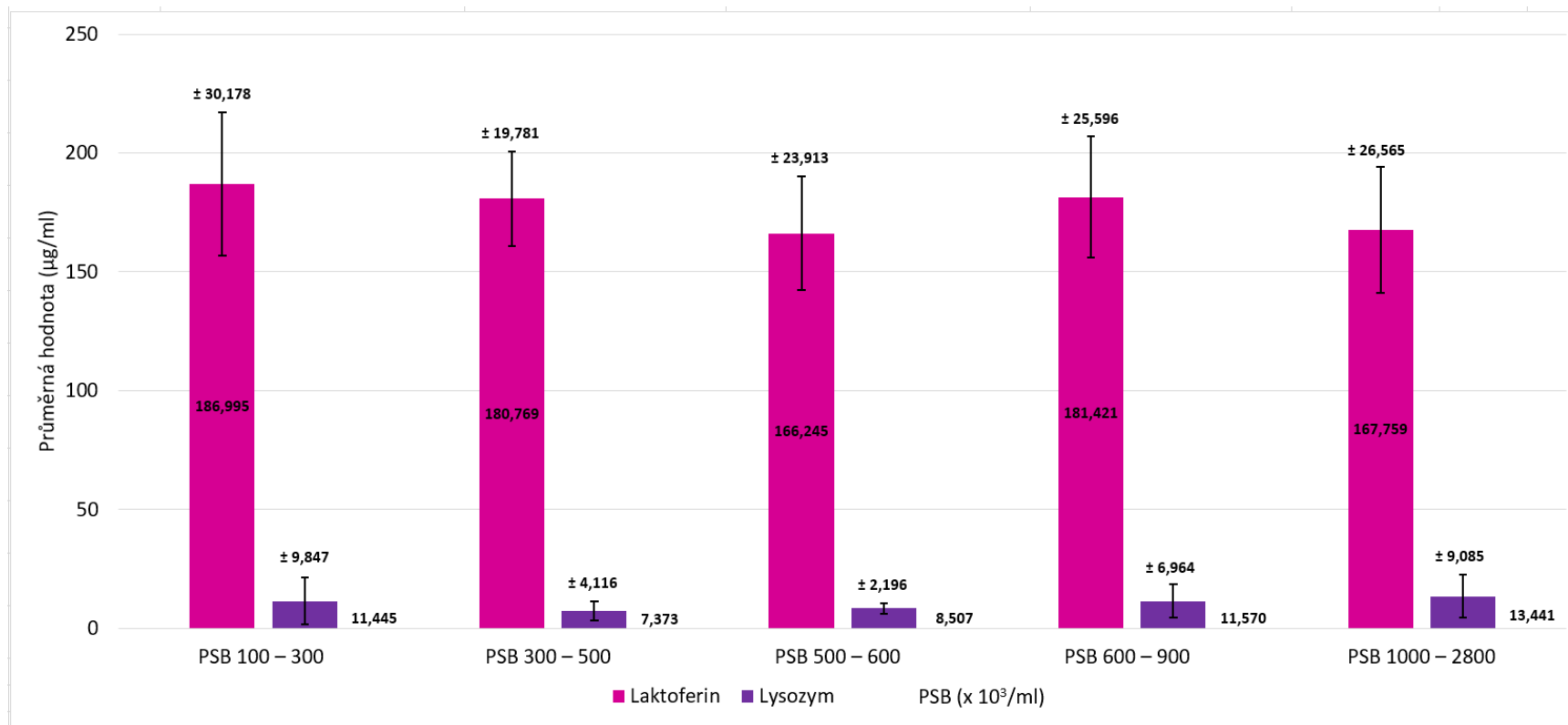
5.1 Laktoferin a lysozym

Obsah laktoferinu a lysozymu byl stanoven téměř v 60 individuálních vzorcích kozího mléka. Průměrná hodnota laktoferinu představovala 180,327 $\mu\text{g/ml}$, zatímco průměrná hodnota lysozymu byla pouze 11,007 $\mu\text{g/ml}$. Směrodatná odchylka laktoferinu dosahovala hodnoty 27,953, u lysozymu byla tato hodnota 8,018. Minimální obsah laktoferinu představoval 118,175 $\mu\text{g/ml}$, v případě lysozymu 0,208 $\mu\text{g/ml}$. Maximální hodnota činila 233,677 $\mu\text{g/ml}$ u laktoferinu a 42,523 $\mu\text{g/ml}$ u lysozymu (viz tabulka č. 5).

Tabulka 5: Vyhodnocení popisné statistiky laktoferinu a lysozymu v individuálních vzorcích kozího mléka

Proměnná	N platných	Průměr ($\mu\text{g/ml}$)	Minimum ($\mu\text{g/ml}$)	Maximum ($\mu\text{g/ml}$)	Rozptyl	Směrodatná odchylka
Laktoferin	165	180,327	118,175	233,677	781,396	27,953
Lysozym	165	11,007	0,208	42,523	64,289	8,018

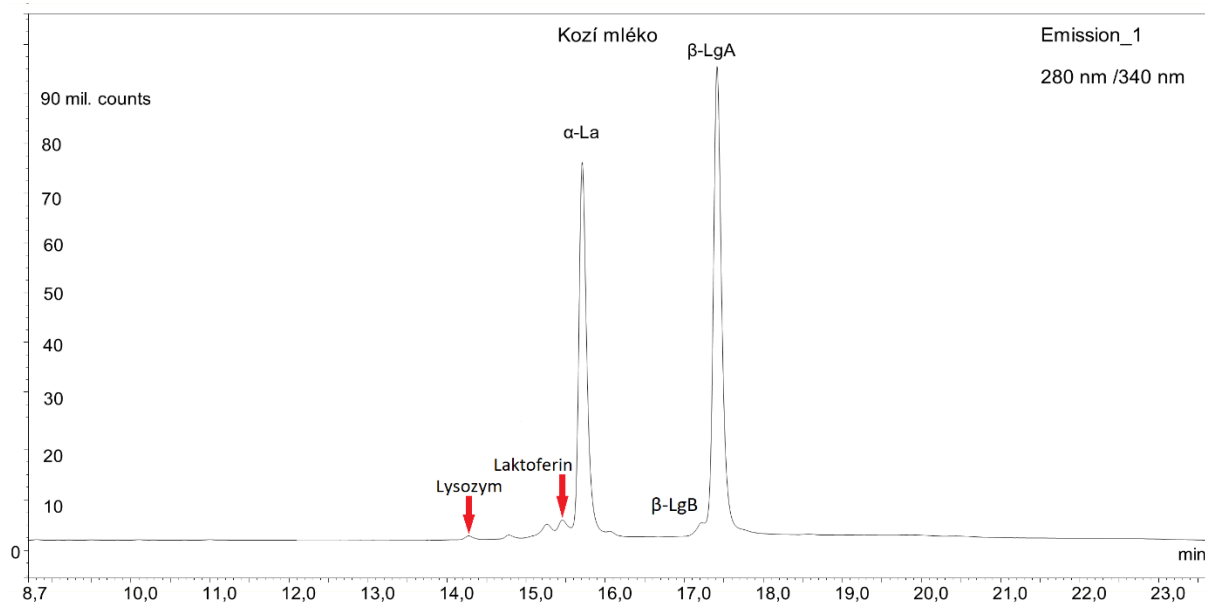
Na obrázku č. 4 jsou znázorněny průměrné hodnoty laktoferinu a lysozymu v 53 individuálních vzorcích kozího mléka v jednotlivých skupinách PSB ($100 \times 10^3 - 300 \times 10^3/\text{ml}$, $300 \times 10^3 - 500 \times 10^3/\text{ml}$, $500 \times 10^3 - 600 \times 10^3/\text{ml}$, $600 \times 10^3 - 900 \times 10^3/\text{ml}$, $1000 \times 10^3 - 2800 \times 10^3/\text{ml}$). Některé vzorky byly vyřazeny, jelikož byla jejich hodnota zaznamenána pod mezí detekce. Na obrázku jsou zobrazeny rovněž chybové úsečky, kterým odpovídají průměrné hodnoty směrodatných odchylek náležitých vzorků kozího mléka. Dle obrázku byl nejvyšší obsah laktoferinu (186,995 $\mu\text{g/ml}$) zaznamenán ve skupině s PSB $100 \times 10^3 - 300 \times 10^3/\text{ml}$. Naproti tomu nejnižší obsah této látky (166,245 $\mu\text{g/ml}$) se vyskytoval ve skupině PSB $500 \times 10^3 - 600 \times 10^3/\text{ml}$. Maximální hodnota lysozymu (13,441 $\mu\text{g/ml}$) se nacházela ve skupině PSB $1000 \times 10^3 - 2800 \times 10^3/\text{ml}$, minimální hodnota (7,373 $\mu\text{g/ml}$) ve skupině PSB $300 \times 10^3 - 500 \times 10^3/\text{ml}$.



PSB = počet somatických buněk

Obrázek 4: Průměrné hodnoty laktoferinu a lysozymu (µg/ml) v jednotlivých skupinách PSB (x 10³/ml)

Znázorněné píky laktoferinu a lysozymu byly identifikovány pomocí retenčních časů standardů o známém kvalitativním složení. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno využitím kalibračních závislostí, tedy porovnáním ploch píků standardů a samotných vzorků. Vrchol píku lysozymu odpovídal retenčnímu času 14,3 minut. Vrchol píku laktoferinu odpovídal retenčnímu času 15,5 minut. Na chromatogramu byly zobrazeny rovněž píky syrovátkových bílkovin α -laktalbuminu a β -laktoglobulinu A B. Ve srovnání s těmito proteiny byl obsah laktoferinu a lysozymu v kozím mléce mnohonásobně menší. Chromatogram analyzovaného vzorku kozího mléka je uveden na obrázku č. 5.



α -La = α -laktalbumin; β -LgB = β -laktoglobulin B; β -LgA = β -laktoglobulin A

Obrázek 5: Chromatogram vzorku kozího mléka

5.2 Proteolytická aktivita mléka

Celková proteolytická aktivita (CPA) byla stanovena v 53 individuálních vzorcích kozího mléka ve třech opakováních. Některé vzorky byly vyřazeny z důvodu nedostatku matrice. Průměrná hodnota CPA představovala 181,698 mU/ml. Hodnota směrodatné odchylky byla poměrně vysoká ($\pm 85,577$). Minimální hodnota CPA byla stanovena na 7,275 mU/ml a maximální hodnota na 397,676 uM/ml (viz tabulka č. 6).

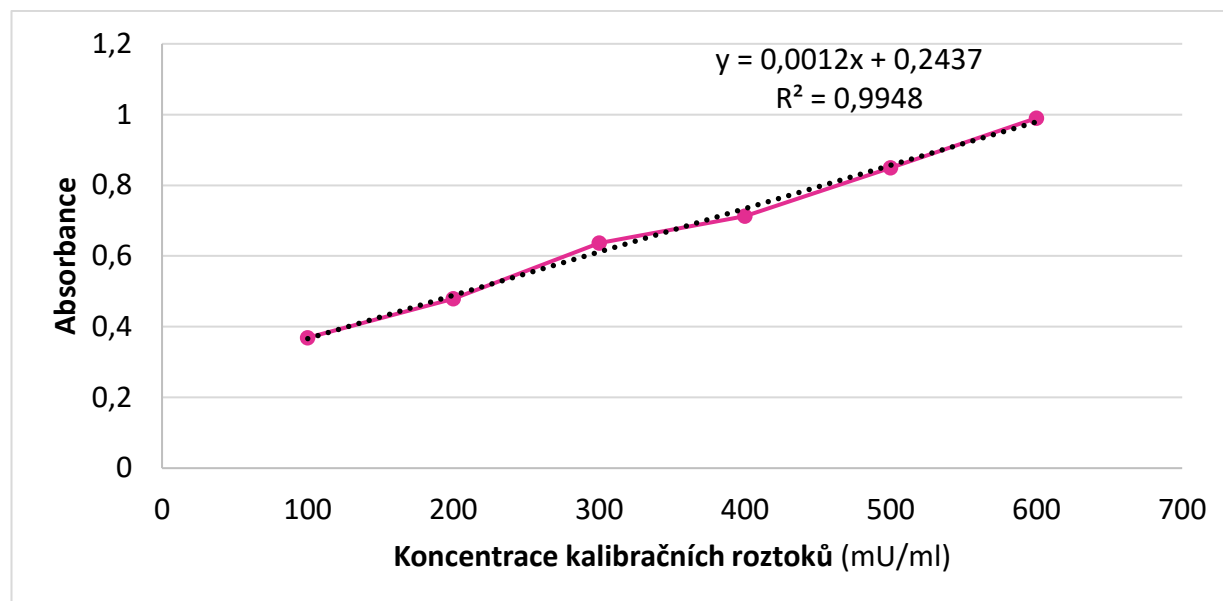
Tabulka 6: Vyhodnocení popisné statistiky celkové proteolytické aktivity kozího mléka

	N platných	Průměr (mU/ml)	Minimum (mU/ml)	Maximum (mU/ml)	Rozptyl	Směrodatná odchylka
CPA	159	181,698	7,275	397,676	7323,338	85,577

CPA = celková proteolytická aktivita

Na obrázku č. 6 je znázorněna šestibodová kalibrační křivka, která představovala závislost získanou změřením absorbance sady kalibračních roztoků o vzrůstající koncentraci standardu analytu (v rozsahu 100 – 600 mU). Vhodnost zvoleného modelu potvrdila vysoká

hodnota koeficientu determinace (0,9948). Tato hodnota byla optimální, jelikož se blížila číslu 1 (100 %). Z této skutečnosti lze konstatovat, že přibližně 99,48 % bodů leželo na kalibrační křivce.



Obrázek 6: Kalibrační křivka proteolytické aktivity kalibračních roztoků

V příloze č. 1 jsou zobrazeny výsledky regresní analýzy se závisle proměnnou CPA. Hodnota p byla menší než hladina významnosti (α 0,05) u laktoferinu a lysozymu. Z testu významnosti regresního koeficientu vyplývá, že v případě závislosti laktoferinu a lysozymu na celkové aktivitě proteáz byla nulová hypotéza zamítnuta a lze proto říci, že existovala statisticky významná závislost. Dle stanoveného determinačního koeficientu je zřejmé, že závisle proměnná je z 11,05 % ovlivněna nezávisle proměnnou, laktoferinem a lysozymem, jednalo se tedy o slabou závislost. Z hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu, jež dosahovala 0,332, lze konstatovat, že se jedná o přímou lineární závislost.

Dále byla provedena korelační analýza vybraných ukazatelů: laktoferinu, lysozymu, PSB, bílkovin a CPA viz tabulka č. 7. Nejsilnější závislost na přísné hladině významnosti ($p < 0,001$) byla zaznamenána mezi celkovým obsahem bílkovin a laktoferinem. Silná závislost na hladině významnosti $p < 0,01$ byla mezi celkovými bílkoviny a lysozymem, dále byla tato závislost potvrzena mezi CPA a laktoferinem. Nejslabší závislost, na hladině významnosti ($p < 0,05$), byla nalezena mezi PSB a laktoferinem, ale přesto byla vyhodnocena jako statisticky významná. Mezi CPA a PSB nebyla potvrzena významná závislost stejně jako mezi CPA a všemi skupinami bílkovin.

Tabulka 7: Korelační analýza laktoferinu, lysozymu, PSB, bílkovin a CPA

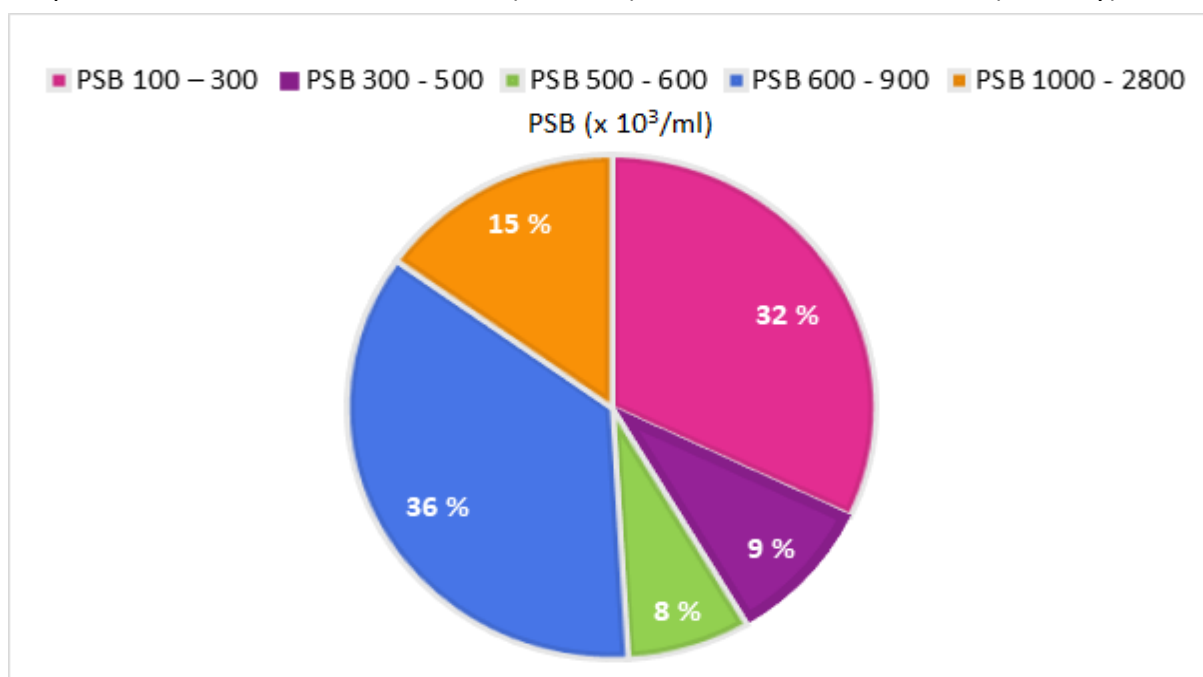
		Průměr	Sm. odch.	Laktoferin	Lysozym	PSB	CPA	Cel. bílkoviny	Kas. bílkoviny	Syr. bílkoviny
	Jednotky			($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\times 10^3/\text{ml}$)	(mU/ml)	(%)	(%)	(%)
Laktoferin	($\mu\text{g/ml}$)	179,940	27,410	1,000	0,156	-0,199*	-0,248**	0,259***	0,249**	0,307***
Lysozym	($\mu\text{g/ml}$)	11,185	8,031	0,156	1,000	0,136	0,130	0,251**	0,254**	0,222**
PSB	($\times 10^3/\text{ml}$)	634,472	576,160	-0,199*	0,136	1,000	0,118	0,093	0,084	0,087
CPA	(mU/ml)	181,698	85,577	-0,248**	0,130	0,118	1,000	0,017	0,022	-0,026
Cel. bílkoviny	(%)	3,243	0,236	0,259***	0,251**	0,093	0,017	1,000	0,991***	0,912***
Kas. bílkoviny	(%)	2,477	0,180	0,249**	0,254**	0,084	0,022	0,991***	1,000	0,851***
Syr. bílkoviny	(%)	0,579	0,064	0,307***	0,222**	0,087	-0,026	0,912***	0,851***	1,000

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Sm. Odch = směrodatná odchylka; PSB = počet somatických buněk; CPA = celková proteolytická aktivita; Cel. bílkoviny = celkové bílkoviny; Kas. bílkoviny = kaseinové bílkoviny; Syr. bílkoviny = syrovátkové bílkoviny

5.3 Obsah laktoferinu a lysozymu v závislosti na PSB, CPM a stafylokokách

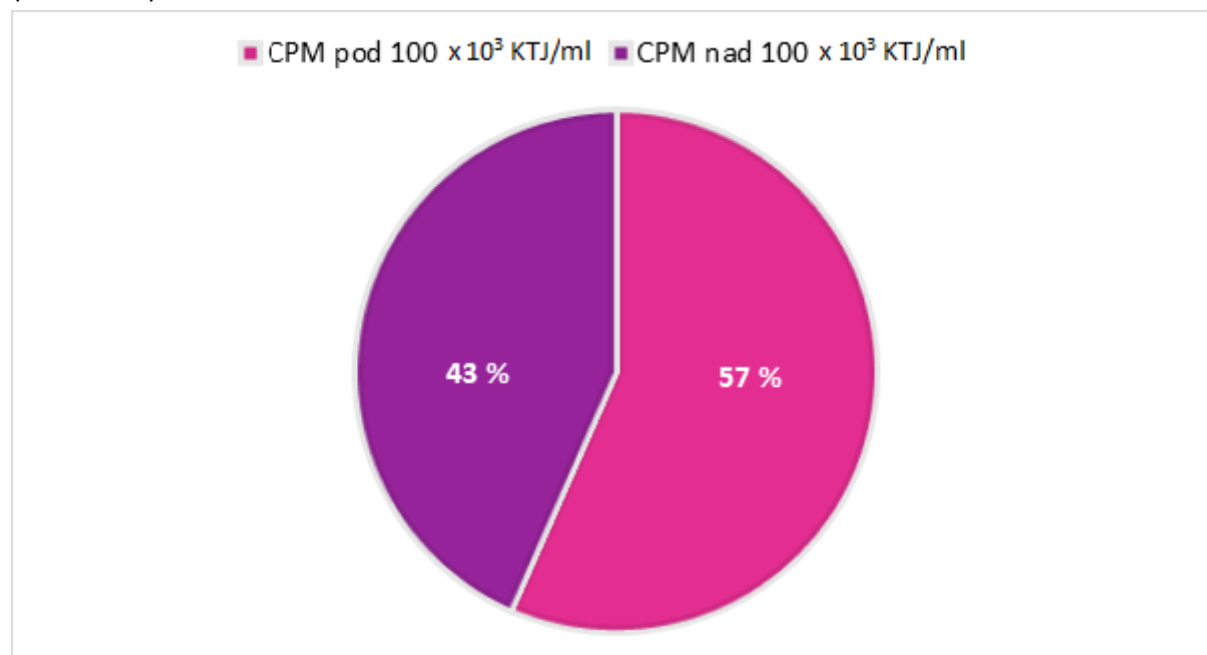
Procentuální zastoupení jednotlivých skupin PSB je znázorněno na obrázku č. 7, kde bylo analyzováno celkem 53 vzorků kozího mléka ve třech opakováních. Některé skupiny PSB byly vyřazeny z důvodu vhodnějšího statistického zpracování. Vzorky, u kterých byla překročena hodnota PSB nad $1\ 000 \times 10^3/\text{ml}$ představovaly 15 %, tedy 8 vzorků. Z toho se 3 vzorky pohybovaly v rozmezí hodnot $2\ 000 \times 10^3 - 2\ 800 \times 10^3/\text{ml}$, 2 vzorky v rozmezí $1\ 500 \times 10^3 - 2\ 000 \times 10^3/\text{ml}$ a 3 vzorky v rozmezí $1\ 000 \times 10^3 - 1\ 500 \times 10^3/\text{ml}$. Skupina PSB s nejnižšími hodnotami $100 \times 10^3 - 300 \times 10^3/\text{ml}$ tvořila přibližně 1/3, tedy 17 vzorků. Majoritní podíl, 36 % neboli 19 vzorků, reprezentovala skupina s PSB $600 \times 10^3 - 900 \times 10^3/\text{ml}$. Téměř totožné zastoupení měly vzorky mléka nacházející se ve skupině s PSB $300 \times 10^3 - 500 \times 10^3/\text{ml}$ (5 vzorků) a $500 \times 10^3 - 600 \times 10^3/\text{ml}$ (4 vzorky).



PSB = počet somatických buněk

Obrázek 7: Procentuální zastoupení skupin PSB (10^3 KTJ/ml) ve vzorcích kozího mléka

Na obrázku č. 8 je zobrazeno procentuální zastoupení skupin CPM, které byly analyzovány rovněž v 53 vzorcích kozího mléka. Vyšší podíl, 57 % (30 vzorků), tvořila skupina CPM pod 100×10^3 KTJ/ml. Skupina CPM nad 100×10^3 KTJ/ml představovala 43 % (23 vzorků).



CPM = celkový počet mikroorganismů

Obrázek 8: Procentuální zastoupení skupin CPM ($\times 10^3$ KTJ/ml) ve vzorcích kozího mléka

Příloha č. 2. byla použita ke znázornění výstupu ANOVY s interakcemi jednotlivých údajů: limitů PSB, CPM a stafylokoků, vůči závisle proměnným laktoferinu a lysozymu. Hodnota p vykazovala menší hodnotu než hladina významnosti (α 0,05). Z této skutečnosti lze konstatovat, že existoval statisticky významný rozdíl mezi závisle proměnnými. Šetření bylo proto podrobena detailnějšímu vyhodnocení pomocí Tukeyova testu, jehož výstupy jsou zobrazeny v tabulkách níže.

Z hodnot, jež jsou popsány v tabulce č. 8 plyne skutečnost, že byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi PSB s limitem 300×10^3 /ml a 400×10^3 /ml ve srovnání s ostatními skupinami PSB vůči závisle proměnné laktoferinu. Obsah laktoferinu nekoreloval s PSB a jeho obsah tedy nenarůstal se zvyšujícím se PSB. V případě lysozymu byl nalezen statisticky významný rozdíl při PSB limitu 300×10^3 /ml vůči ostatním skupinám. Obsah lysozymu nekoreloval s PSB, proto neplatí tvrzení, že se zvyšujícím se PSB narůstal obsah lysozymu.

Tabulka 8: Vyhodnocení limitů PSB vůči závisle proměnné laktoferinu a lysozymu

PSB limit ($\times 10^3$ /ml)	Laktoferin ($\mu\text{g/ml}$)	PSB limit ($\times 10^3$ /ml)	Lysozym ($\mu\text{g/ml}$)
2800	$180,327^b \pm 27,953$	500	$10,210^{cd} \pm 8,352$
800	$181,347^{bc} \pm 27,697$	600	$10,213^d \pm 7,832$
900	$181,459^{bc} \pm 27,137$	800	$10,515^{bcd} \pm 8,035$

PSB limit (x 10 ³ /ml)	Laktoferin (µg/ml)	PSB limit (x 10 ³ /ml)	Lysozym (µg/ml)
2000	181,496 ^{bc} ± 27,206	1500	10,519 ^{bcd} ± 7,613
1500	181,967 ^{bc} ± 27,447	400	10,520 ^{bcd} ± 9,011
700	182,020 ^{bc} ± 27,656	900	10,557 ^{bcd} ± 7,863
1000	182,466 ^c ± 27,708	1000	10,592 ^{bcd} ± 7,782
500	182,605 ^c ± 28,272	700	10,753 ^{abcd} ± 7,973
600	182,826 ^c ± 28,411	2000	10,825 ^{abc} ± 8,047
400	185,580 ^a ± 28,138	2800	11,007 ^{ab} ± 8,018
300	186,995 ^a ± 30,178	300	11,445 ^a ± 9,847

PSB = počet somatických buněk

Jak ukazuje tabulka č. 9, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán mezi CPM nad a pod 100 x 10³ KTJ/ml vůči oběma závisle proměnnými (laktoferin a lysozym). Z této tabulky je patrná korelace hodnoty laktoferinu, která se zvyšovala při CPM nad 100 x 10³ KTJ/ml. V případě lysozymu tato korelace nebyla potvrzena.

Tabulka 9: Vyhodnocení CPM vůči závisle proměnné laktoferinu a lysozymu

CPM (x 10 ³ KTJ/ml)	Laktoferin (µg/ml)	CPM (x 10 ³ KTJ/ml)	Lysozym (µg/ml)
CPM < 100	180,480 ^a ± 29,955	CPM > 100	8,928 ^b ± 7,147
CPM > 100	184,562 ^b ± 23,224	CPM < 100	11,812 ^a ± 8,739

CPM = celkový počet mikroorganismů

Dle tabulky č. 10 byl prokázán rozdíl mezi všemi skupinami CPM a množstvím stafylokoků vůči závisle proměnné laktoferinu. Obsah laktoferinu byl nejvyšší u vzorků s CPM nad 100 x 10³ KTJ/ml. Nicméně obsah laktoferinu a hodnoty stafylokoků spolu nekorelovaly a nelze proto tvrdit, že koncentrace laktoferinu narůstala při překročení hodnoty stafylokoků nad 50 x 10³ KTJ/ml.

Tabulka 10: Vyhodnocení CPM a stafylokoků vůči závisle proměnné laktoferinu

CPM (x 10 ³ KTJ/ml)	Stafylokoky (x 10 ³ KTJ/ml)	Laktoferin (µg/ml)
CPM < 100	> 50	169,538 ^d ± 17,815
CPM < 100	< 50	181,742 ^c ± 31,538
CPM > 100	> 50	182,917 ^b ± 25,974
CPM > 100	< 50	185,628 ^a ± 25,133

CPM = celkový počet mikroorganismů

Na následující tabulce č. 11 byl vyhodnocen CPM a počet stafylokoků vůči závisle proměnné lysozymu, kde existoval statisticky významný rozdíl mezi CPM nad 100 x 10³ KTJ/ml, pokud byly stafylokoky nad a pod 50 000 KTJ/ml. Naproti tomu nebyl zaznamenán rozdíl mezi CPM pod hodnotu 100 x 10³ KTJ/ml, pokud byly stafylokoky nad a pod 50 x 10³ KTJ/ml. Obsah lysozymu byl zvýšený při počtu stafylokoků nad 50 x 10³ KTJ/ml

a CPM pod 100×10^3 KTJ/ml. U ostatní hodnot nebyla nalezena korelace se zvyšujícím se množstvím lysozymu a CPM a počtu stafylokoků.

Tabulka 11: Vyhodnocení CPM a stafylokoků vůči závisle proměnné lysozymu

CPM ($\times 10^3$ KTJ/ml)	Stafylokoky ($\times 10^3$ KTJ/ml)	Lysozym ($\mu\text{g/ml}$)
CPM > 100	> 50	7,729 ^b ± 6,309
CPM > 100	< 50	9,705 ^a ± 7,652
CPM < 100	> 50	11,684 ^c ± 8,909
CPM < 100	< 50	11,827 ^c ± 8,677

CPM = celkový počet mikroorganismů

Výstup ANOVY s interakcemi jednotlivých ukazatelů: PSB, CPM, stafylokoků vůči obsahu, laktoferinu a lysozymu v mléce je zobrazen v příloze č. 3. Hodnota p vykazovala menší hodnotu než hladina významnosti (α 0,05). Lze tedy konstatovat, že existoval statisticky významný rozdíl mezi závisle proměnnými a bylo proto nutné podrobnější vyhodnocení pomocí Tukeyova testu, jehož výstupy jsou znázorněny v tabulkách níže.

V tabulce č. 12 byl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu laktoferinu mezi skupinou s PSB $300 \times 10^3 - 500 \times 10^3$ /ml a CPM pod 100×10^3 KTJ/ml vůči ostatním skupinám.

Tabulka 12: Vyhodnocení skupin PSB a CPM vůči závisle proměnné laktoferinu

Skupiny PSB ($\times 10^3$ /ml)	CPM skupina ($\times 10^3$ KTJ/ml)	Laktoferin průměr ($\mu\text{g/ml}$)
PSB 500 – 600	CPM > 100	164,894 ^b ± 28,796
PSB 1000 – 2800	CPM < 100	165,221 ^b ± 34,281
PSB 1000 – 2800	CPM > 100	169,282 ^b ± 21,937
PSB 500 – 600	CPM < 100	170,298 ^b ± 4,954
PSB 600 – 900	CPM < 100	179,755 ^b ± 17,565
PSB 300 – 500	CPM > 100	180,769 ^b ± 19,781
PSB 100 – 300	CPM < 100	182,414 ^b ± 33,286
PSB 600 – 900	CPM > 100	186,087 ^b ± 17,565
PSB 100 – 300	CPM > 100	197,989 ^b ± 17,298
PSB 300 – 500	CPM < 100	180,769 ^a ± 19,781

CPM = celkový počet mikroorganismů; PSB = počet somatických buněk

Dle tabulky č. 13 byl v případě lysozymu rovněž prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinou s PSB $300 \times 10^3 - 500 \times 10^3$ /ml a CPM pod 100×10^3 KTJ/ml vůči ostatním skupinám.

Tabulka 13: Vyhodnocení skupin PSB a CPM vůči závisle proměnné lysozymu

Skupiny PSB ($\times 10^3$ /ml)	CPM skupina ($\times 10^3$ KTJ/ml)	Lysozym průměr ($\mu\text{g/ml}$)
PSB 300 – 500	CPM > 100	7,373 ^c \pm 4,116
PSB 500 – 600	CPM > 100	7,418 ^{bc} \pm 1,111
PSB 1000 – 2800	CPM < 100	7,910 ^{bc} \pm 4,480
PSB 100 – 300	CPM > 100	10,186 ^{bc} \pm 5,064
PSB 600 – 900	CPM > 100	10,251 ^{bc} \pm 7,319
PSB 500 – 600	CPM < 100	11,777 ^{bc} \pm 0,451
PSB 100 – 300	CPM < 100	11,970 ^{bc} \pm 11,282
PSB 600 – 900	CPM < 100	12,042 ^{bc} \pm 6,862
PSB 1000 – 2800	CPM > 100	16,760 ^b \pm 9,626
PSB 300 – 500	CPM < 100	7,373 ^a \pm 4,116

CPM = celkový počet mikroorganismů; PSB = počet somatických buněk

Vyhodnocením jednotlivých skupin PSB (100×10^3 – 300×10^3 /ml, 300×10^3 – 500×10^3 /ml, 500×10^3 – 600×10^3 /ml, 600×10^3 – 900×10^3 /ml, 1000×10^3 – 2800×10^3 /ml), CPM ($> < 100 \times 10^3$ KTJ/ml) a stafylokoků ($> < 50 \times 10^3$ KTJ/ml) vůči závisle proměnné laktoferinu i lysozymu nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl.

6 Diskuze

V současné době tvoří mléko a mléčné výrobky nepostradatelnou složku lidské výživy, přičemž spotřeba kozího mléka ve světě neustále narůstá. Vyjma nutričně hodnotných makro a mikronutrientů obsahuje kozí mléko rovněž antimikrobiální látky – laktoferin a lysozym. Zvýšené koncentrace těchto látek mohou poukazovat na zánět mléčné žlázy a informovat o zdravotním stavu zvířete. Významnou složkou mléka jsou rovněž enzymy, jež mohou mít značný vliv na kvalitu a sensorické vlastnosti mléka a mléčných produktů. Účinky endogenních i exogenních enzymů zapříčiňují degradaci proteinů včetně prospěšných látek s antimikrobiálním účinkem. Následkem toho dochází k narušení doby trvanlivosti, chuti, vůně a ke vzniku technologických vad mléka během jeho skladování. Nejrelevantnější skupinou těchto látek pro mléčný průmysl jsou enzymy produkované psychrotrofními bakteriemi, které disponují termostabilitou a mají největší dopad na znehodnocení mléčných výrobků. Přítomnost těchto bakterií v mléce je podmíněna nevhodnými hygienickými podmínkami farmy. Celkovou kvalitou mléka, obsah a zastoupení proteolytických enzymů a antimikrobiálních látek může ovlivňovat počet somatických buněk, mikrobiologická kvalita mléka, ale také faktory jako je způsob a frekvence dojení, krmná dávka, stádium laktace, plemenná příslušnost či zdravotní stav zvířete.

Teoretická část této práce byla napsána s cílem popsat antimikrobiální účinky laktoferinu a lysozymu a celkovou proteolytickou aktivitu v kozím mléce. Cílem praktické části bylo stanovit vybrané látky s enzymatickým a antimikrobiálním účinkem – laktoferin a lysozym, a posoudit jejich vztah k celkové kvalitě mléka, zejména bílkovin. Současně byly zohledněny faktory, které mohly tyto vlastnosti ovlivňovat a také byla provedena optimalizace vybraných metod stanovení.

Dračková et al. (2009) stanovovali laktoferin pomocí HPLC s diodovým detektorem v syrovém mléce od českých koz. Naměřené hodnoty laktoferinu se pohybovaly v rozmezí od 98 ± 17 až 149 ± 19 $\mu\text{g/ml}$ v průběhu laktace od dubna do listopadu. Ve srovnání s touto prací, kde průměrný obsah laktoferinu tvořil $180,327 \pm 27,953$ $\mu\text{g/ml}$, byly stanovené hodnoty nižší. Vyjma typu detektoru, se studie od Dračkové et al. (2009) lišila také teplotou kolony (45 °C) a průtokovou rychlostí mobilní fáze (1 ml/min). Další česká studie laktoferinu byla uskutečněna Raškovou et al. (2015), která provedla separaci jednotlivých bílkovin v mléce pomocí iontově výměnné chromatografie. Výsledné frakce byly měřeny spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm. Naměřené hodnoty obsahu laktoferinu představovaly $120 \pm 0,04$ $\mu\text{g/ml}$. Oproti této práci byl obsah laktoferinu rovněž nižší, nicméně ve studii nebyl uveden druh analyzovaného mléka. Další studie, zabývající se stanovením obsahu laktoferinu, byla realizována Tsakalim et al. (2014) pomocí HPLC s detektorem diodového pole. Ve srovnání s touto prací byly hodnoty laktoferinu podstatně vyšší (248 ± 13 až $19\,302 \pm 16$ $\mu\text{g/ml}$). Ve studii však byly analyzovány vzorky kravského mléka, z čehož lze konstatovat, že kozí mléko této práce obsahovalo přirozeně nižší množství laktoferinu. Rachman et al. (2015) měřili obsah laktoferinu pomocí elektroforézy u 3 různých plemen koz. Jejich výsledky poukazyvaly na změnu obsahu laktoferinu během počátečních

dnů laktace, přičemž první den vykazoval obsah laktoferinu $156,36 \pm 107,66$ $\mu\text{g/ml}$ u prvního plemene, $197,39 \pm 58,94$ $\mu\text{g/ml}$ u druhého plemene a $207,39 \pm 58,94$ $\mu\text{g/ml}$ u plemene posledního. Při osmém dni laktace obsahy laktoferinu dramaticky poklesly. Mléko od prvního plemene obsahovalo $41,24 \pm 1,22$ $\mu\text{g/ml}$ laktoferinu, druhé plemeno pouze $25,22 \pm 2,21$ $\mu\text{g/ml}$ a třetí plemeno $32,25 \pm 2,20$ $\mu\text{g/ml}$ laktoferinu. Výsledky této studie z prvního dne laktace všech tří plemen se přibližně shodovaly s výsledky této práce. Hiss et al. (2008) kvantifikovali laktoferin v kozím mléce a kolostru za pomoci kompetitivního enzymového imunotestu za použití techniky dvojité protilátky. Maximální koncentrace laktoferinu, 387 ± 69 $\mu\text{g/ml}$, obsahovaly vzorky kolostra. Průměrné hodnoty laktoferinu ve vzorcích kozího mléka obsahovaly pouze 107 ± 19 $\mu\text{g/ml}$. V porovnání s touto prací byly hodnoty laktoferinu v kozím mléce nižší. Současně lze konstatovat, že kolostrum obsahuje přirozeně vysoké množství laktoferinu z důvodu imunologické ochrany mláďat, jež mléko potřebují zejména v prvních dnech života. Pellegrino et al. (2000) stanovovali obsah lysozymu v syrovém mléce pomocí HPLC, přičemž poukázali na zaznamenání vyšší citlivosti při využití fluorescenčního detektoru. Koncentrace lysozymu, jež byla proměřena v této studii, představovala 4 ppm (4 $\mu\text{g/ml}$). V této práci dosahovaly průměrné hodnoty lysozymu v individuálních vzorcích kozího mléka $11,007 \pm 8,018$ $\mu\text{g/ml}$ a byly analyzovány rovněž na fluorescenčním detektoru.

Mezi významný faktor, jež může souviset s obsahem laktoferinu a lysozymu a má významný vliv na jakost mléka, patří počet somatických buněk. Silanikove et al. (2010) ve své studii uvádějí doporučenou hodnotu PSB $300 \times 10^3/\text{ml}$, která by se měla vyskytovat v mléce zdravých koz by. Pokud se PSB pohybuje v rozmezí $840 \times 10^3 - 1\,200 \times 10^3/\text{ml}$, je dle studie možno předpokládat, že se až u 50 % koz ve stádě může vyskytovat subklinická bakteriální infekce. Silanikove et al. (2010) a Leitner et al. (2008) uvádějí, že pokud je hodnota PSB $1\,600 \times 10^3 - 3\,500 \times 10^3/\text{ml}$, lze předpokládat subklinickou bakteriální infekci až u 75 % koz. Obě studie dále uvádějí, že kozí mléko s PSB překračujícím $3\,500 \times 10^3/\text{ml}$ není vhodné pro výkup z důvodu vysoké pravděpodobnosti výskytu patogenních mikroorganismů. Leitner et al. (2004) stanovili doporučenou hodnotu průměrného PSB u zdravých koz, která by měla dosahovat $417 \times 10^3/\text{ml}$, zatímco u koz s mastitidou by tato průměrná hodnota PSB měla představovat $1\,750 \times 10^3/\text{ml}$. Cílem výzkumu, který realizovali Podhorecká et al. (2021) bylo objasnit, jak se liší úroveň PSB (600, 700, 800 a $1\,000 \times 10^3/\text{ml}$) ovlivňující kvalitativní, kvantitativní a technologické vlastnosti mléka od zdravých koz. Nejvýraznější rozdíly byly zjištěny u PSB vyšší než $1\,000 \times 10^3/\text{ml}$, přesto se však určité rozdíly objevily již u vzorků s PSB nad $600 \times 10^3/\text{ml}$. Je třeba zmínit, že tato studie dbala na omezení vlivů faktorů, které působí na PSB. Proto byla zvířata ustájena na stejné farmě a krmena stejným krmivem, splňovala stejné fáze laktace, nevykazovala zjevné problémy s vemenem či struky a současně bylo stádo koz vyšetřeno na přítomnost bakterií způsobující mastitidy, přičemž mikrobiální kolonizace mléčné žlázy splňovala požadavky legislativy a všechny vzorky mléka měly dobrý hygienický standard. Ve srovnání této práce s výše zmíněnými studiemi PSB lze konstatovat, že analyzované vzorky kozího mléka splňovaly poměrně vysoký hygienický standard, jelikož PSB překračující $1\,000 \times 10^3/\text{ml}$ představoval 15 % (8 vzorků), z čehož se pouze 3 vzorky

pohybovaly v rozmezí hodnot $2000 \times 10^3 - 2800 \times 10^3/\text{ml}$, 2 vzorky v rozmezí $1500 \times 10^3 - 2000 \times 10^3 /\text{ml}$ a 3 vzorky v rozmezí $1000 \times 10^3 - 1500 \times 10^3 /\text{ml}$. Studie se shodují na tom, že má na PSB vliv mnoho faktorů, přičemž je však nutno zmínit, že vyšší hodnoty PSB nemusí být vždy způsobeny infekčními faktory. Na PSB se mohou podílet rovněž faktory neinfekční jako je způsob a frekvence dojení, čas mezi dojeními, stádium laktace, plemeno a věk zvířete, krmivo či stres. Mezi další činitele ovlivňující PSB v kozím mléce lze řadit také metody měření, konzervace a chlazení vzorků mléka.

Dalším významným faktorem, podílejícím se na možném zvýšeném obsahu laktoferinu a lysozymu, je mikrobiologická kvalita mléka. CPM v kozím mléce závisí na mnoha faktorech a jsou proto poměrně proměnlivé. Řada studií uvádí rozdílné hodnoty CPM. Například studie pocházející z českých farem, ve kterých uskutečnili svůj výzkum Přidalová et al. (2009), vykazovala $2,7 \times 10^4 - 6,2 \times 10^4$ KTJ/ml CPM v individuálních vzorcích kozího mléka v průběhu laktace. Kouřimská & Dvořáková (2008) zjistili průměrnou hodnotu CPM kozího mléka v České republice $1,1 \times 10^5$ KTJ/ml v průběhu laktace. Nejvyšší hodnoty CPM pro ČR zjistili Kalhotka et al. (2013). Naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí $1,4 \times 10^4$ až $3,5 \times 10^6$ KTJ/ml. Velmi vysoké hodnoty měly vzorky kozího mléka pocházející z řeckých a portugalských farem ze studie, kterou uskutečnili Morgan et al. (2003). V Řecku se průměrný CPM pohyboval v rozmezí $1,4 \times 10^7 - 6,4 \times 10^7$ KTJ/ml, v Portugalsku vykazoval průměrný CPM $4,0 \times 10^7$ KTJ/ml. Poměrně vysoké hodnoty měla rovněž studie realizovaná ve Švýcarsku Zweifelem et al. (2005), kde byl stanoven průměrný CPM v bazénových vzorcích řádově 10^6 KTJ/ml. Delgado-Pertinez et al. (2003) ve svých studiích zjistili, že obsah CPM z farem ve Španělsku dosahoval od $9,0 \times 10^4$ do $6,2 \times 10^5$ KTJ/ml v průběhu laktace. Dle Ying et al. (2004) byly hodnoty CPM v individuálních vzorcích kozího mléka $1,7 \times 10^4$ KTJ/ml na počátku laktace, zatímco na konci laktace byly tyto hodnoty o jeden řád vyšší ($2,5 \times 10^5$ KTJ/ml). Studie od Kyozaire et al. (2005) ukazuje, že CMP u individuálních vzorků kozího mléka byl stanoven na $1,6 \times 10^4$ do $4,8 \times 10^4$ KTJ/ml v závislosti na způsobu dojení. Obecně bylo zjištěno, že nejnižší CPM obsahovalo mléko strojně dojené a nejvyšší CPM mléko získané ručním dojením. D'Amico & Donnelly (2010) uvedli průměrný CPM v případě bazénových vzorků kozího mléka v rozmezí řádově 10^3 až 10^4 KTJ/ml. Průměrná hodnota u studie od Ramsahoi et al. (2011) byla $5,6 \times 10^3$ KTJ/ml. Ze všech uvedených studií vykazoval nejnižší hodnoty CPM výzkum, který realizovali Vacca et al. (2010). V tomto výzkumu byly průměrné hodnoty CPM v individuálních vzorcích kozího mléka nižší než 300×10^3 KTJ/ml. V této práci tvořila skupina CPM pod 100×10^3 KTJ/ml téměř 60 % vzorků individuálních vzorků kozího mléka. Skupina CPM nad 100×10^3 KTJ/ml představovala přibližně 43 % vzorků. Z této skutečnosti lze konstatovat, že oproti většině výše uvedeným studiím, byly hodnoty CPM této práce velmi uspokojivé.

Studie od Palomba et al. (2017), která se zabývala vývojem laboratorní techniky pro vyhodnocení proteolytické aktivity kozího mléka, využívala spektrofotometrickou metodu. Měření probíhalo při vlnové délce 345 nm. Výsledná maximální hodnota celkové proteolytické aktivity v této studii představovala 0,567 mU/ml a minimální hodnota 0,497 mU/ml. Inkubace vzorků mléka probíhala po dobu 15 minut při teplotě vodní lázně 35,5 °C.

Bendicho et al. (2002) měřili proteolytickou aktivitu v mléce spektrofotometricky při 345 nm a jejich výsledný kvantifikační limit celkové proteolytické aktivity dosahoval průměrné hodnoty 7,64 mU/ml. Inkubace vzorků mléka probíhala rovněž po dobu 15 minut při teplotě vodní lázně 35,5 °C. V této práci byla průměrná celková proteolytická aktivita mléka 181,698 mU/ml. Vysoké hodnoty a rozdílnost výsledků této práce oproti oběma uvedeným studiím lze vysvětlit rozdílnými podmínkami pokusu. U obou studií probíhala inkubace vzorků mléka ve vodní lázni mnohem déle ve srovnání s touto prací, kde byla reakce ukončena po 8 minutách. Současně byla teplota vodní lázně u obou studií nastavena na 35,5 °C. V této práci probíhala inkubace vzorků při teplotě 37 °C. Dalším rozdílem byla odlišná vlnová délka použitá při měření, přičemž u obou prací činila 345 nm. V této práci byly nejlepší hodnoty celkové proteolytické aktivity mléka zaznamenány při vlnové délce 440 nm.

Přestože některé výsledky této práce, zejména výsledky celkové proteolytické aktivity, nebyly v souladu s odbornou literaturou, může být tato práce odrazovým můstkem pro další zkoumání kozího mléka v této oblasti. Z důvodu snadnější interpretace výsledků by bylo vhodné se při dalších analýzách co nejadekvátněji přiblížit k podmínkám přípravy vzorků ostatních autorů. Jelikož dle dostupných studií spotřeba kozího mléka ve světě neustále narůstá, bude zapotřebí tuto komoditu zkoumat více, a to zejména v oblasti faktorů, jež ovlivňují kvalitu a bezpečnost mléka.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se antimikrobiálních a enzymatických vlastností kozího mléka. V rámci praktické části diplomové práce byly stanoveny látky s antimikrobiálním účinkem – laktoferin a lysozym, pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s FLD detektorem, a celková proteolytická aktivita kozího mléka pomocí spektrofotometrické metody. Zpracováno bylo celkem 58 individuálních vzorků kozího mléka, přičemž každý vzorek byl analyzován ve třech opakováních pro přesnější vyhodnocení a možnost kvalitní interpretace statisticky prověřených dat.

Antimikrobiální aktivitu v mléce tvoří zejména laktoferin, lysozym, laktoperoxidázový systém a imunoglobuliny. Všechny tyto komponenty jsou ovlivňovány faktory jako je zdravotní stav zvířete, stádium laktace, hygiena farmy, bakteriální infekce mléčné žlázy či počet somatických buněk.

Hypotéza 1 Zvolené metody pro stanovení lysozymu, laktoferinu a celkové aktivity proteáz budou vhodně optimalizovány.

U obou zvolených metod byla provedena optimalizace tak, aby metody vyhovovaly testovanému typu matrice, ale i možnostem laboratoře a podmínkám, při kterých byly analýzy prováděny. V případě laktoferinu a lysozymu byla v rámci HPLC analýzy upravena zejména teplota kolony a průtok mobilní fáze. Dále byl změněn typ detektoru, přičemž fluorescenční detektor vykazoval lepší citlivost než detektor diodového pole. V případě proteolytické aktivity mléka byl upraven čas inkubace vzorků při požadované teplotě vodní lázně za účelem získání co nejkoherentnějších výsledků.

Hypotéza 2 Obsah lysozymu a laktoferinu se bude lišit v individuálních vzorcích kozího mléka ve vztahu k počtu somatických buněk a celkovému počtu mikroorganismů, zejména mastitidních bakterií.

Hypotéza byla částečně potvrzena. Obsah laktoferinu a lysozymu nenarůstal se zvyšujícím se PSB. Byla potvrzena korelace mezi vzrůstajícím obsahem laktoferinu a celkovým počtem mikroorganismů na hladině významnosti (α 0,05). Nebyla však potvrzena korelace mezi vzrůstajícím obsahem laktoferinu a počtem mastitidních bakterií na hladině významnosti (α 0,05). V případě lysozymu nebyla potvrzena korelace mezi jeho vzrůstajícím obsahem a celkovým počtem mikroorganismů ani počtem mastitidních bakterií na hladině významnosti (α 0,05).

Hypotéza 3 Proteolytická aktivita mléka bude ovlivňovat obsah a zastoupení bílkovin.

Proteolytická aktivita mléka neměla vliv na obsah a zastoupení přítomných bílkovin, korelovala však s obsahem laktoferinu. Vyhodnocení proteolytické aktivity mléka a vybraných druhů bílkovin probíhalo na hladině významnosti (α 0,05).

Hypotéza 4 Celková aktivita proteáz bude vyšší ve vzorcích kozího mléka se zvýšeným počtem somatických buněk.

Nebyla zaznamenána statisticky průkazná závislost mezi celkovou aktivitou proteáz a zvýšeným počtem somatických buněk. Tato hypotéza byla zamítnuta.

Nepotvrzení uvedených hypotéz lze přisoudit faktorům jako je stres, výživa, způsob a frekvence dojení či environmentální podmínky. Významnými faktory je rovněž stádium laktace a plemenná příslušnost. Účinek těchto dvou faktorů však není v rámci této práce relevantní, jelikož byl u všech zvířat totožný. Nepotvrzení některých hypotéz mohly ovlivnit rovněž odlišné podmínky pro všechny vzorky mléka od vybraných zvířat při laboratorním pokusu. Dalším vysvětlením je možná přítomnost proteolytických enzymů psychrotrofních bakterií, jež mohly začít projevoval proteolytickou aktivitu ve vzorcích kozího mléka během jeho zamražení. Mezi další činitele lze řadit také metody měření, konzervace a chlazení vzorků mléka.

I přes neprokázání některých hypotéz lze dle odborné literatury předpokládat významný vliv proteolytické aktivity mléka na obsah a zastoupení přítomných bílkovin. Dle studií lze rovněž konstatovat, že zvýšený obsah laktoferinu i lysozymu úzce souvisí s počtem somatických buněk a mikrobiologickou kvalitou mléka. I přesto, že kozy mají přirozeně vyšší PSB, není v řadě zemí, včetně ČR, stanoven žádný legislativní limit. Mnoho autorů došlo k doporučené hodnotě, kdy lze mléko považovat za nezávadné. Vyšší hodnoty PSB by proto měly být alarmující a poukazovat na možný výskyt subklinické bakteriální infekce ve stádě, v případě extrémně vysokých hodnot dokonce na výskyt patogenních bakterií. V případě celkového počtu mikroorganismů existuje v ČR legislativně vyhrazený limit. Řada studií uvádí rozdílné hodnoty, ale zároveň se shodují na tom, že je celkový počet mikroorganismů základním kritériem pro hodnocení mikrobiologické kvality kozího mléka. Na závěr je nutno konstatovat, že PSB, CPM, laktoferin, lysozym i celková proteolytická aktivita v kozím mléce jsou ovlivňovány řadou faktorů a jejich hodnoty proto nemusí vždy souviset s infekcí mléčné žlázy. Z tohoto důvodu je třeba se touto oblastí dále zabývat.

8 Literatura

- 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. *American Dairy Science Association* **98**: 7587 – 7594.
- Ardö YM. 2021. *Enzymes in cheese ripening*. Springer International Publishing, Switzerland.
- Asselt AJ, Sweere APJ, Rollema HS, Jong P. 2008. Extreme high-temperature treatment of milk with respect to plasmin inactivation. *International Dairy Journal* **18**: 531 – 538.
- Bagnicka E, Winnicka A, Józwick A, Rzewuska M, Strzałkowska N, Kosciuczuk E, Prusak B, Kaba J, Horbanczuk 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.
- Barrionuevo M, Alferes MJM, Aliaga L, Sampelayo MRS, Campos MS. 2002. Beneficial Effect of Goat Milk on Nutritive Utilization of Iron and Copper in Malabsorption Syndrome. *Journal of Dairy Science* **85**: 657 – 664.
- Bendicho S, Martí G, Hernández T, Martín O. 2002. Determination of proteolytic activity in different milk systems. *Food Chemistry* **79**: 245 – 249.
- Boulaaba A, Grabowski N, Klein G. 2011. Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. *Small Ruminant Research* **97**: 117 – 123.
- Ceballos LS, Morales ER, Adarve GT, 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.
- ČSÚ. 2021. *Soupis hospodářských zvířat*. Český statistický úřad, Praha. Available from <https://www.czso.cz/csu/czso/soupis-hospodarskych-zvirat-2021> (accessed November 2021).
- D'Amico DJ, Donnelly CW. 2010. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: Effect of farm characteristics and practices. *Journal of Dairy Science* **93**: 134 – 147.
- Deeth HC. 2021. Heat-induced inactivation of enzymes in milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal* (e105104) DOI: 10.1016/j.idairyj.2021.105104.
- Delgado-pertinez M, Alcalde MJ, Guzmán-guerrero JL, Castel JM, Mena Y, Caravaca F. 2003. Effect of hygienic sanitary management on goat milk quality in semi-extensive systems in Spain. *Small Ruminant Research* **47**: 51 – 61.
- Dračková M, Borkovcová I, Janštová B, Naiserová M, Přidalová H, Navrátilová P, Vorlová L. 2009. Determination of Lactoferrin in Goat Milk by HPLC Method. *Czech Journal Food Science* **27**: 102 – 104.
- European Parliament and the Council. 2004. Regulation (EC) No 853/2004 of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Luxembourg.

- Glantz M, Rosenlow M, Lindmark-Månsson H, Johansen LB, Hartmann J, Hojer A, Waak E, Lofgren R, Saedén KH, Svensson C, Svensson B, Lindau J, Rauh V, Paulsson M. 2020. Impact of protease and lipase activities on quality of Swedish raw milk. *International Dairy Journal* (e 09586946) DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104724.
- Görner F, Valík L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívateľín. Malé centrum, Bratislava.
- Gupta VP. 2017. *Molecular and Laser Spectroscopy: Advances and Applications*. Elsevier, Neatherlands.
- Haenlein GFW. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* **51**: 155 – 163.
- Hisham RI, Ahmen SA, Takeshi M. 2017. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Jornal of Advanced Research* **8**: 63 – 71.
- Hiss S, Meyer T, Sauerwein H. 2008. Lactoferrin concentrations in goat milk throughout lactation. *Small Ruminant Research* **80**: 87 – 90.
- Hodulová L, Vorlová V, Kostrhounová R, Klimešová M, Hanuš O. 2016. Aktuálny obsah vitamínu A v kravskom a kozom mlieku v ČR. *MLékařské listy* **27**: 7 – 9.
- Horincar G, Bahrim G. 2017. The antimicrobial properties of enzymatic hydrolysates of goat milk fat. *Food technology* **41**: 30 – 40.
- Chen L, Daniel RM, Coolbear T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Internation of Dairy Science* **13**: 255 – 275.
- Chramostová J, Mühlhansová A, Binder M, Strmiska V, Čurda L, Hanuš O, Kopecký J, Klimešová M, Dragounová H, Seydlová R, Němečková I. 2016. Termostabilita syrového ovčieho a kozieho mléka. *MLékařské listy* **27**: 22 – 26.
- Christodoulopoulos G, Solomakos N, Katsoulos PD, Minas A, Kritas SK. 2008. Influence of oestrus on the heat stability and other characteristics of milk from dairy goats. *Journal of Dairy Research* **75**: 64 – 68.
- Junior N, Barros RA, Vital CE, Barbosa SL, Oliveira JV, Rocha GC, Oliveira CN, Marques Gonçalves Assis JV. 2020. Enzymatic Assay of Protease Using Azocasein as Substrate (e 31481) DOI: 10.17504/protocols.io.bayzifx6.
- Kalantzopoulos G, Aktypis A. 2003. Purification and characterization of thermophilin ST-1, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001. *Dairy Science and Technology* **83**: 157 – 160.
- Kalhotka L, Šustová K, Hůlová M, Přichystalová J. 2013. Important groups of microorganisms in raw goat milk and fresh goat cheeses determined during lactation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* **2**: 2314 – 2317.
- Karzis J, Donkin EF, Petzer IM. 2004. Antibiotic residue withdrawal periods in milk of saanen dairy goats and udder tissue irritation: preliminary results. *South African Journal Animal Science* **34**: 262 – 265.
- Kell DB, HEYDEN EL, PRETORIUS T. 2020. The biology of lactoferrin, an iron -binding protein that can help defend against viruses and bacteria. *Frontiers of Immunology* **11**: 126
Small Ruminant Research 130.
- Kilara A, Vaghela MN. 2018. *Proteins in Food Processing*. Elsevier, United States.

- Kimpel F, Schmitt JJ. 2015. Review: Milk Proteins as Nanocarrier Systems for Hydrophobic Nutraceuticals. *Journal of Food Science* **80**: 361 – 365.
- Kouřimská L, Dvořáková B. 2008. Kvalita kozího mléka v průběhu laktačního období. 108 – 109 in *Sborník referátů z konference Den mléka*. ČZU, Praha.
- Kuchtík J, Šustová K, Kalhotka L, Pavlata L. 2015. Celkový počet mikroorganismů a počet somatických buněk v kozím mléce a jejich korelace. *MLékařské listy* **152**: 19 – 24.
- Kyozaire JK, Veary CM, Petzer IM, Donkin EF. 2005. Microbiological quality of goat's milk obtained under different production systems. *Journal of the South African Veterinary Association* **76**: 69 – 73.
- 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, Silanikove N. 2004. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *Journal of Dairy Science* **87**: 1719 – 1726.
- Leitner G, Silanikove N, Merin U. 2008. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research* **74**: 221 – 225.
- Li N, Richoux R, Boutinaud M, Martin P, Gagnaire V. 2014. Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. *Dairy Science & Technology* **94**: 517 – 538.
- Lužová T, Šustová K, Kozelková M, Vyskočil I, Kuchtík J. 2012. Vliv stádia laktace na složení a vlastnosti kozího mléka a kvalitu sýrů vyráběných na farmě. *MLékařské listy* **131**: 5 – 10.
- Maesschalck VD, Gutierrez D, Paeshuyse J, Lavigne R. 2003.
- Marino R, Considine T, Sevi A, McSweeney PLH, Kelly AL. 2005. Contribution of proteolytic activity associated with somatic cells in milk to cheese ripening. *International Dairy Journal* **15**: 1026 – 1033.
- Marková J. 2021. Mýty pod pokličkou. *Výživa a potraviny* **3**: 45 – 46.
- Maurmayr A, Cecchinato A, Grigoletto L, Bittante G. 2013. Detection and Quantification of α S1-, α S2-, β -, κ -casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin and Lactoferrin in Bovine Milk by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **78**: 201 – 205.
- McDougall S, Annis FM, Cullum AA. 2002. Effect of transport stress on somatic cell counts in dairy goats. *Proceedings of new Zealand Society of Animal Health* **62**: 16 – 18.
- McInnis EA, Kalanetra KM, Mills DA, Maga EA. 2015. Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiology* **46**: 121 – 131.
- Mehdid A, Martí-De Olives AM, Fernández ND, 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.
- Moatsou G. 2010. Indigenous enzymatic activities in ovine and caprine milks. *International Journal of Dairy Technology* **63**: 16 – 31.

- Moldoveanu SC, David V. 2016. Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis. Elsevier, Neatherlands.
- Morgan F, Massouras T, Barbosa M, Roseiro L, Ravasco F, Kandarakis I, Bonnin V, Fistakorís M, Anifantakis E, Jaubert G., Raynal-Ljutovac K. 2003. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Ruminant Research* **47**: 39 – 49.
- Moroni P, Pisoni G, Van Lier E, Acuña S, Damian JP, Meiker A. 2007. Influence of estrus of dairy goat on somatic cell, milk trait, and sex steroid receptors in the mammary gland. *Journal Animal Research* **90**: 790 – 797.
- Nabrdalik M, Grata K. 2010. Proteolytic aktivita of *Bacillus cereus* strains. *Frontiers in Microbiology* (e 40189) DOI:10.3389/fmicb.2017.00302.
- Navrátilová P, Králová M, Janštová B, Přidalová H, Cupáková Š, Vorlová L. 2012. Hygiena produkce mléka. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno.
- Nidhi B, Baumgard LH, Everett LDD, Harte F, Lean IJ, McNamara JP, Smithers GW, and Tsakalidou E. 2022. *The Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, Neatherlands.
- Owen T. 2017. *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy*. Academic Press, United Kingdom.
- Palomba R, Formisano G, Arrichiello A, Auriemma G, Sarubbi F. 2017. Development of a laboratory technique for the evaluation of protease enzymes activity in goat and sheep milk. *Food Chemistry* **221**: 1637 – 1641.
- Parc AL, Dallas DC, Duaut S, Leonil J, Martin P, Barile D. 2014. Characterization of goat milk lactoferrin N-glycans and comparison with the N-glycomes of human and bovine milk. *Electrophoresis* **35**: 1560 – 1570.
- Park YW, Juarez M, Ramos M, Haenlein GFW. 2007. Physicochemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**: 88 – 113.
- Park YW, Haenlein GFW, Wendorff WL. 2017. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals, Second Edition*. John Wiley & Sons, USA.
- Park YW. 2017. Nutritional and Chemical Composition of Goat Milk. *Goat Milk – Chemistry and Nutrition* **2**: 42 – 73.
- Pellegrino L, Tirelli A. 2000. A sensitive HPLC method to detect hen's egg white lysozyme in milk and dairy products. *International Dairy Journal* **10**: 435 – 442.
- Pereira PC. 2013. *Nutrition*. Elsevier, Portugal.
- Petrotos K, Tsakali E, Goulas P, D'Alessandro AG. 2014. *Milk and Dairy Products as Functional Foods*. John Wiley & Sons, USA.
- Plocková M, Koval D, Horáčková Š. 2020. Přirozené antimikrobiální látky v mléce a některé možnosti jejich aplikací. *Mlékařské listy* **31**: 21 – 23.
- 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*(e1204573) DOI: 10.3390/foods10051046.
- Přidalová H, Janštová B, Cupáková Š, Dračková M, Navrátilová P, Vorlová L. 2009. Somatic Cell Count in Goat Milk. *Folia Veterinaria* **53**: 101 – 105.

- Pulina G, Milán MJ, Lavín MP, Theodoridis A, Morin E, Capote J, Thomas DL, Francesconi AHD, Caja G. 2018. Current production trends, farm structures, and economics of dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science* **101**: 6715 – 6729.
- Rachman AB, Maheswari RRA, Bachroem MS. 2015. Composition and Isolation of Lactoferrin from Colostrum and Milk of Various Goat Breeds. *Procedia Food Science* **3**: 200 – 210.
- Ramsahoi L, Gao A, Fabri M, Odumeru JA. 2011. Assessment of the application of an automated electronic milk analyzer for the enumeration to total bacteria in raw goat milk. *Journal of Dairy Science* **94**: 3279 – 3287.
- Rašková ZK, Šalaková A, Sedlařík V. 2015. Izolace proteinů ze syrovátky s antimikrobiálním účinkem pro kosmetické aplikace. *Mlékařské listy* **153**: 1 – 4.
- Rauh VM, Sundgren A, Bakman M, Ipsen R, Paulsson M, Larsen LB. 2014. Plasmin activity as a possible cause for age gelation in UHT milk produced by direct steam infusion. *International Dairy Journal* **38**: 199 – 207.
- Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccardb P, Guillet I, Chilliardc Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research* **79**: 57 – 72.
- Rubin M, Modai S, Rayman S, Kaplan KM, Mendelson E, Lichtenberg D. 2021. Antiviral properties of goat milk. *Clinical Nutrition Open Science* **37**: 1 – 11.
- Salama AAK, Such X, Caja G, Rovai M, Casals R, Albanell E, Marín MP, Martí A. 2003. Effects of once versus twice milking throughout lactation on milk yield and milk composition in dairy goats. *Journal of Dairy Science* **86**: 1673 – 1680.
- Samková E, Coufalová T, Hasoňová L, Bártová H. 2020. Nabídka kozích a ovčích mléčných výrobků v Jihočeském kraji. *Mlékařské listy* **31**: 8 – 11.
- Seifu E, Buys EM, Donkin EF, Petzer IM. 2004. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against food-borne pathogens in Saanen and South African Indigenous goat milk. *Food Control* **15**: 447 – 452.
- Seifu E, Donkin EF, Buys EM. 2007. Potential of lactoperoxidase to diagnose subclinical mastitis in goats. *Small Ruminant Research* **69**: 154 – 158.
- 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.
- 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.
- Solaiman SG. 2010. *Goat science and Production*. Blackwell Publishing, USA.
- Souzaa FN, Blagitzc MG, Pennaa CFAM, Della Libera AMMP, Heinemannb MB, Cerqueiraa MMOP. 2012. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Ruminant Research* **107**: 65 – 7.
- St-gelais D, Ali OB, Turcot S. 2003. *Composition of Goat's Milk and Processing Suitability*. Food Research and Development Centre **21**: 123 – 124.
- Tedde V, Bronzo V, Grazia GM, Pollera C, Casula A, Curone G, Moroni P, Uzzau S, Addis MF. 2019. Milk cathelicidin and somatic cell counts in dairy goats along the course of lactation. *Journal of dairy research* **86**: 217 – 221.

- Tsakali E, Petrotos K, Chatzilazarou A, Stamatopoulos K, D'Alessandro AG, Goulas P, Massouras T, Impe VJFM. 2014. Short communication: Determination of lactoferrin in Feta cheese whey with reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Science* **97**: 1 – 6.
- Vacca GM, Dettori ML, Carcangiu V, Rocchigiani AM, Pazzola M. 2010. Relationships between milk characteristics and somatic cell score in milk from primiparous browsing goats. *Animal Science Journal* **81**: 594 – 599.
- Vostra-Vydrova H, Hofmanovaa B, Moravcikovac N, Rychtarovab J, Kasardac R, Machovaa K, Brzakovab M, Vostrya L. 2020. Genetic diversity, admixture and the effect of inbreeding on milk performance in two autochthonous goat breeds. *Livestock Science* **240**: 104 – 163.
- Wang J, Shi H, Zhang T, Huang J, Li Z, Ma G, Zhang X. 2018. The lactoferrin content variation and its related factors in milk of Xinong Saanen goats. *Journal of Applied Animal Research* **46**: 1032 – 1035.
- Wellings DA. 2005. *A Practical Handbook of Preparative HPLC*. Elsevier, United Kingdom.
- Yagi Y, Shiono H, Chikayama Y, Ohnuma A, Nakamura I, Yayou KI. 2004. Transport stress increases somatic cell in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows. *The Journal of Veterinary Medical Science* **66**: 381–387.
- Ying CH, Wang HT, Hsu JT. 2004. Relationship of Somatic Cell Count, Physical, Chemical and Enzymatic Properties to the Bacterial Standard Plate Count in Different Breeds of Dairy Goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **17**: 554 – 559.
- Zhang W, Wang J, Mi Z, Su J, Xiangyu Y, Keceli G, Wang Y, Cao R, Lai H. 2016. Extraction and Analysis of Tetrahydrocannabinol, A Cannabis Compound in Oral Fluid. *International Journal of Biology* (e1916968) DOI: 10.5539/ijb.v9n1p30.
- Zweifel C, Muehlherr JE, Ring M, Stephan R. 2005. Influence of different factors in milk production on standard plate count of raw small ruminant's bulk-tank milk in Switzerland. *Small Ruminant Research* **58**: 63 – 70.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ANOVA	analýza rozptylu
CLA	konjugovaná kyselina linolová
COVID-19	coronavirus disease 2019
CPA	celková proteolytická aktivita
CPM	celkový počet mikroorganismů
ČR	Česká republika
FLD	fluorescenční
Gly-Leu-Phe	glycin-leucin-fenylalanin
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
Ig	imunoglobuliny
KTJ	kolonie tvořící jednotka
LDL	low density lipoprotein
LPS	laktoperoxidázový systém
MK	mastná kyselina
PSB	počet somatických buněk
SB	somatické buňky
UHT	ultra high temperature
UV/VIS	ultrafialový/viditelný

10 Samostatné přílohy

N = 159	Výsledky regrese se závislou proměnnou: CPA (mU/ml)					
	R = 0,33240047 R ² = 0,11049007 Upravené R ² = 0,07537784 F (6,152) = 3,1468 p<0,00616 Sm. Chyba odhadu: 82,288					
	b*	Sm. chyba z b *	B	Sm. chyba z b	t(152)	p-hodn.
Absolutní člen			-60,57	214,954	-0,28176	0,778509
Laktoferin	-0,21808	0,089252	-0,68	0,279	-2,443443	0,015693
Lysozym	0,16429	0,080581	1,75	0,859	2,03883	0,043200
PSB (×10³)	0,02448	0,080616	0,00	0,012	0,30360	0,761847
Protein (%)	4,46488	2,829337	1618,10	1025,367	1,57806	0,116630
Kasein (%)	-3,36916	2,210818	-1603,08	1051,932	-1,52394	0,129601
Syr. bílkoviny (%)	-1,20250	0,728238	-1611,61	975,995	-1,65124	0,100753

CPA = celková proteolytická aktivita; R² = koeficient determinace; R = Pearsonův korelační koeficient; Sm. chyba = směrodatná chyba; PSB = počet somatických buněk; Syr. bílkoviny = syrovátkové bílkoviny

Příloha 1: Výsledky regresní analýzy se závisle proměnnou CPA

Závisle Proměnné	Test SČ celého modelu vs. SČ reziduí						
	Vícenás. R	Vícenás. R ²	Upravené R ²	SČ Model	SV Model	PČ Model	SČ Rezid.
Laktoferin	0,989135	0,978387	0,967605	990178,7	438	2260,682	21873,28
Lysozym	0,988742	0,977611	0,966443	83201,1	438	189,957	1905,41

Závisle proměnné	Test SČ celého modelu vs. SČ reziduí			
	SV Rezid.	PČ Rezid.	F	p-hodnota
Laktoferin	878	24,91262	90,74444	0,00
Lysozym	878	2,17017	87,53088	0,00

Příloha 2: Výstup ANOVY s interakcemi (limity PSB, CPM, stafylokoky, laktoferin, lysozym)

Závislý Proměnné	Test SČ celého modelu vs. SČ reziduí						
	Vícenás. R	Vícenás. R ²	Upravené R ²	SČ Model	SV Model	PČ Model	SČ Rezid.
Laktoferin	0,416484	0,173459	0,086759	20590,98	15	1372,732	98117,14
Lysozym	0,467296	0,218365	0,136376	2225,18	15	148,345	7964,98

Závislý Proměnné	Test SČ celého modelu vs. SČ reziduí			
	SV Rezid.	PČ Rezid.	F	p- hodnota
Laktoferin	143	686,1338	2,000676	0,018921
Lysozym	143	55,6992	2,663327	0,001361

Příloha 3: Výstup ANOVY s interakcemi (PSB, CPM, stafylokoky, laktoferin, lysozym)