

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

Martin Sýkora

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Antioxidační vlastnosti sýrů

Martin Sýkora

Bakalářská práce

2019

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Antioxidant properties of cheeses

Martin Sýkora

Bachelor work

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martin Sýkora**
Osobní číslo: **C14057**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Antioxidační vlastnosti sýrů**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Práci zpracujte jako rešerši. Definujte, co jsou to antioxidanty a uveďte přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity/kapacity.
2. Provedte literární rešerši s využitím databází vědeckých periodik a zjistěte, co je zdrojem antioxidačních vlastností sýrů (fortifikace krmiva, fortifikace při výrobě, bílkoviny syrovátky aj.).
3. Získané výsledky kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **20. února 2017**
Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2019

Martin Sýkora

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval panu doc. Ing. Liborovi Červenkovvi, Ph.D. za jeho pomoc a trpělivost při odborném vedení, ochotu a poskytnutí cenných informací při konzultacích vedoucí k sestavení této práce. Rovněž chci poděkovat mé rodině za podporu při studiu a také blízkým přátelům kteří mě inspirovali.

ANOTACE

Tato bakalářská práce přináší formou literární rešerše teoretický přehled o antioxidačních vlastnostech mléka a sýrů, včetně úvodu do obecné technologie sýrů a pojednání o jejich nutričním významu. Zaměřuje se na zdroje antioxidačních účinků, dále uvádí možnosti, kterými lze ovlivnit faktory vedoucí k obohacení potravy o látky zvyšující tento benefit a také popisuje nejběžnější stanovení antioxidační aktivity formou jednotlivých metod.

KLÍČOVÁ SLOVA

antioxidanty, aktivita, radikál, sýry, mléko, obranyschopnost, fortifikace

TITLE

Antioxidant properties of cheeses

ANNOTATION

This bachelor thesis brings a literary research of the theoretical overview of antioxidant properties of milk and cheeses, which includes basic cheese technology with a discussion on their nutritional importance. The present paper aims at the sources of antioxidant effects, simultaneously, the paper presents options which might influence surrounding factors leading to the increase of this benefit, the total food efficiency and also describes the most common determinations of antioxidant activity, which is achieved by selected methods.

KEYWORDS

antioxidants, activity, radicals, cheeses, milk, defences, fortification

OBSAH

ÚVOD.....	12
1 ROZDĚLENÍ (KLASIFIKACE) SÝRŮ.....	13
2 NUTRIČNÍ SLOŽENÍ SÝRŮ.....	14
3 TECHNOLOGICKÉ POSTUPY VÝROBY SÝRŮ.....	16
3.1 Čištění, tepelné ošetření a sterilizace mléka.....	17
3.2 Koagulace a přidání mlékařských kultur.....	18
3.3 Solení a zrání.....	19
4 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ANTIOXIDANTŮ.....	20
4.1 Oxidační stabilita v souvislosti s antioxidační aktivitou v mléce.....	21
4.2 Oxidační reakce.....	22
4.2.1 Autooxidace vzdušným kyslíkem.....	22
4.2.2 Oxidace katalyzovaná kovy.....	24
4.2.4 Inhibitory oxidační reakce.....	24
5 ZDROJE ANTIOXIDAČNÍCH VLASTNOSTÍ SÝRŮ.....	25
5.1 Antioxidační substráty.....	26
5.2 Antioxidační enzymy a ostatní hydrofilní antioxidanty.....	31
5.2.1 Antioxidační vlastnosti kaseinu.....	31
5.2.2 Antioxidační vlastnosti syrovátkových proteinů.....	31
5.2.3 Antioxidační enzymy.....	31
6 FORTIFIKACE ANTIOXIDANTY.....	34
6.1 Fortifikace při výrobě sýrů.....	34
6.2 Fortifikace krmiv.....	35
7 ZÁKLADNÍ METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY.....	37
7.1 Metody antioxidační aktivity založené na eliminaci radikálů.....	37
7.1.1 TEAC metoda (označovaná také jako ABTS).....	37
7.1.2 Metoda využívající DPPH.....	38
7.1.3 ORAC metoda.....	39
7.1.4 Metoda hodnotící eliminaci lipidové peroxidace (TBA-MDA).....	40
7.2 Metody antioxidační aktivity založené na hodnocení redoxních vlastnostech sloučenin.....	41
7.2.1 FRAP metoda.....	41
7.2.2 Cyklická voltametrie.....	41
7.2.3 HPLC s elektrochemickou detekcí.....	41
8 ZÁVĚR.....	43
9 POUŽITÁ LITERATURA.....	44

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Zjednodušené schéma výroby sýrů ^[3]	16
Obrázek 2: Vliv přidavku antioxidantu na průběhu antioxidační reakce ^[7]	20
Obrázek 3: Rovnováha mezi mléčnými antioxidanty a volnými radikály ^[11]	25
Obrázek 4: Chemická struktura kyseliny linolové a jejího konjugovaného izomeru ^[12]	26
Obrázek 5: Molekula retinolu (vitamínu A) ^[15]	29
Obrázek 6: Chemická struktura β -karotenu ^[15]	29
Obrázek 7: Schéma ochrany antioxidačních enzymů ^[17]	33
Obrázek 8: Chemická reakce TEAC (ABTS) metody ^[25]	37
Obrázek 9: Chemická reakce DPPH radikálu s antioxidantem ^[25]	38
Obrázek 10: Vyjádření inhibiční koncentrace v grafické podobě ^[25]	39
Obrázek 11: Hodnoty ORAC některých potravin vykazujících antioxidační aktivitu ^[27]	40
Tabulka 1: Klasifikace přírodních sýrů podle obsahu tuku v sušině ^[4]	13
Tabulka 2: Klasifikace přírodních sýrů dle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra ^[4]	13
Tabulka 3: Klasifikace přírodního sýra dle zrání ^[4]	13
Tabulka 4: Porovnání hodnot složení mléka různého původu [%] ^[3]	14
Tabulka 5: Příklady obsahu nutričních složek ve 100 g sýru ^[3]	14
Tabulka 6: Obsah CLA a jejího nejaktivnějšího izomeru v různých typech sýru ^[2]	27

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK:

α TTP (z angl. Alpha-Tocopherol Transfer Protein) – alfa tokoferolový transferový protein

AAPH – 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

ABTS^{•+} – (2,2'-azino-bis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát))

ATP – adenosintrifosfát

β -PE (z angl. beta-Phycoerythrin) – beta-fykoerytrin

CAT (z angl. Catalase) – kataláza

CLA (z angl. Conjugated Linoleic Acid) – konjugovaná kyselina linolová

Cu/Zn-SOD – forma superoxiddismutázy vázaná mědí a zinkem jako kofaktory

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

Fe-SOD – forma superoxiddismutázy vázaná železem jako kofaktorem

FRAP (z angl. Ferric Reducing Antioxidant Potential) – stanovení antioxidační aktivity založené na redukci železitých iontů

GPx (z angl. Glutathion Peroxidase) – glutathion peroxidáza

GSH – tripeptid glutathion nezbytný pro odstraňování reaktivních forem kyslíku

GSSH – glutathion disulfid

HDL (z angl. High-Density Lipoprotein) – lipoprotein o vysoké hustotě

HPLC (z angl. High Performance Liquid Chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC-ECD (z angl. High Performance Liquid Chromatography-electrochemical detection) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

LDL (z angl. Low-Density Lipoprotein) – lipoprotein o nízké hustotě

LPx (z angl. Lactoperoxidase) – laktoperoxidáza

Mn-SOD – forma superoxididismutázy vázaná manganem jako kofaktorem

ORAC (z angl. Oxygen Radical Absorbance Capacity) – absorpční kapacita kyslíkových radikálů

PUFA (z angl. Polyunsaturated Fatty Acids) – polynenasycené mastné kyseliny

Q₁₀ – koenzym Q₁₀

ROS (z angl. Reactive Oxygen Species) – reaktivní formy kyslíku

SOD (z angl. Superoxide Dismutase) – superoxid dismutáza

TAA/TAC (z angl. Total Antioxidant Activity/Capacity) – celková antioxidační aktivita/kapacita

TBA-MDA – metoda stanovení antioxidační aktivity, kde je principem reakce mezi thiobarbiturovou kyselinou a malondialdehydem

TEAC (z angl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) – trolox ekvivalentní antioxidační kapacita

TMR (z angl. Total Mixed Ration) – kompletní krmná směs, která poskytuje odpovídající výživu pro potřeby dojnic

TPC (z angl. Total Phenolic Capacity) – celková aktivita fenolických sloučenin

TPPZ – 2,3,5,6-tetra(2-pyridyl)pyrazin

t. v s. – tuk v sušině

VLDL (z angl. Very Low-Density Lipoprotein) – lipoprotein o velmi nízké hustotě

VVTPH – voda v tukuprosté hmotě sýra

ÚVOD

V souvislosti se správnou životosprávou dnešní doba stále více poukazuje na působení negativních vlivů na lidský organismus. Mléko a z něj vyrobené sýry jsou nedílnou součástí každodenní lidské výživy. Tyto nosiče plnohodnotných bílkovin, vápníku, esenciálních mastných kyselin a vitamínů jsou významnou potravinou ovlivňující biochemické a fyziologické funkce těla. Jejich složení je navíc obohaceno antioxidanty. A právě tyto látky mohou neutralizovat a odstraňovat volné radikály, jež vznikají jako vedlejší produkt metabolismu a vytvářejí škodlivý účinek. Nekontrolovatelná aktivita těchto radikálů může zapříčinit oxidační stres a ten může mít za následek degradaci životně důležitých sloučenin jako jsou lipidy, bílkoviny či DNA. Modifikace buněčných funkcí může způsobovat například předčasné stárnutí buněk a tím dát prostor pro vznik řadě vážnějších chorob. Nadměrnému množství volných radikálů může organismus vzdorovat několika způsoby. Jednak se dokáže bránit tvorbou velkého množství regulovatelných enzymů. Dále to je zachycení a odstranění již vytvořených radikálů, čehož se účastní hlavní přítomné antioxidanty. V případě, že selžou obě předchozí varianty, přicházejí na řadu reparační mechanismy poškozených biomolekul.

V řadě potravin se antioxidační účinky projevují zcela běžně. Zvláště u mléka je pak důležitá jeho oxidační stabilita. Během procesů oxidace se totiž mohou tvořit látky nepříjemné chuti a zápachu. Autooxidace lipidů mléka je ovlivňována souhrou pro-oxidantů a antioxidantů zároveň. Některé z těchto látek jsou také důležitými živinami v lidské stravě a mohou být příčinou dalších fyziologických účinků v trávicím traktu a jiných tkáních. Například lipofilní vitamín E s karotenoidy je přítomen v membránách mléčných tukových globulí, kde se odehrávají hlavní autooxidační reakce ^[1]. Kromě těchto látek je mléko zdrojem i hydrofilních antioxidantů, pod které spadají například kaseinové frakce či syrovátkové proteiny. Další skupinu prospěšných látek tvoří enzymy, jejichž synergický systém zvyšuje antioxidační potenciál v mléce ^[2]. Koncentrace těchto sloučenin v mléce jsou ovlivněny složením krmných dávek, které se podávají dojnícím a také podmínkami pozdějšího skladování mléka ^[1].

Práce se zaměřuje především na zdroje antioxidačních vlastností v sýrech a dále popisuje metody, kterými lze určit míru antioxidační aktivity u jednotlivých druhů tohoto mléčného produktu.

1 ROZDĚLENÍ (KLASIFIKACE) SÝRŮ

Sýry jsou obecně produkovány ve spoustě zemích v různých druzích z mléka, a to nejen kravského. Příčina vysoké obliby u řady spotřebitelů se skrývá především v rozmanitosti organoleptických vlastností a také v hojném gastronomickém využití po celém světě [3]. Podle vyhlášky číslo 397/2016 sbírky se sýry klasifikují řadou základních kritérií jako jsou obsah tuku v sušině (viz Tabulka 1), konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra (jak uvádí Tabulka 2) nebo způsobům zrání sýra (viz Tabulka 3) [4].

Tabulka 1: Klasifikace přírodních sýrů podle obsahu tuku v sušině [4]

Sýr	Tuk v sušině (v % hmot.)
Vysokotučný	nejméně 60,0
Plnotučný	nejméně 45,0
Polotučný	nejméně 25,0
Nízkotučný	nejméně 10,0
Odtučněný	méně než 10,0

Tabulka 2: Klasifikace přírodních sýrů dle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra [4]

Sýr	% VVTPH*
Vysokotučný	nejvíce 47,0
Plnotučný	47,0 až 54,9
Polotučný	55,0 až 61,9
Nízkotučný	62,0 až nejvíce 68,0
Odtučněný	Více než 68,0

Obsah tuku v sušině v procentech hmotnostních se stanoví podle následujícího vzorce (Rovnice 1):

$$\% \text{ hmotnost tvs} = \frac{\text{hmotnost tuku v g}}{100 - \text{hmotnost vody v g}} \cdot 100 \quad (1)$$

* VVTPH = voda v tukuprosté hmotě sýra, která se stanoví podle následujícího vzorce (Rovnice 2):

$$\% \text{ VVTPH} = \frac{\text{hmotnost vody v g}}{100 - \text{hmotnost tuku v g}} \cdot 100 \quad (2)$$

Tabulka 3: Klasifikace přírodního sýra dle zrání [4]

Sýr	Charakteristika
Sýr čerstvý	nezrající
	termizovaný
Sýr zrající	na povrchu
	s mazem na povrchu
	v celé hmotě
z toho plísňový sýr	s plísní na povrchu
	s plísní uvnitř hmoty sýra
	Dvouplísňový

2 NUTRIČNÍ SLOŽENÍ SÝRŮ

Základní složkou výroby sýra je mléko. Při mechanickém zpracování sýrů se odděluje z mléka vodná složka ve formě syrovátky, v níž zůstává laktóza a minerální látky. Makronutrienty jako bílkoviny a tuky, dále vitamíny a některé z minerálních látek přecházejí do sýrů, které se tak stávají jakýmsi koncentrátem všech významných nutrientů mléka. To, jaké bude mít výsledný mléčný výrobek nutriční složení, závisí mimo jiné i na původu mléka. V Česku se nejčastěji k výrobě používá mléka kravského, ale současný trh nabízí i širokou škálu výrobků z kozího, ovčího či buvolího, jejichž nutriční hodnoty uvádí Tabulka 4 uvedená níže. Typ konkrétního sýru pak udává hlavně poměr bílkovin a tuku v jeho složení (viz Tabulka 5) ^[3].

Tabulka 4: Porovnání hodnot složení mléka různého původu [%] ^[3]

	Kravské	Kozí	Ovčí	Buvolí
Voda	87,3	86,7	81,3	83,1
Laktóza	4,7	4,4	4,6	4,4
Tuk	3,9	4,5	7,5	6,7
Bílkoviny	3,4	3,6	5,6	4,5
Sůl	0,7	0,8	1,0	1,3

Tabulka 5: Příklady obsahu nutričních složek ve 100 g sýru ^[3]

	Bílkoviny [g]	Tuk [g]	Vápník [g]	Energie (KJ)
Měkký tvaroh	19,4	0,3	0,01	417
Tučný tvaroh 40 % t. v s. *	14,1	12,0	0,073	740
Tvarůžky	29,9	0,8	0,150	540
Hermelín	20,2	20,2	0,157	1120
Eidam 30 % t. v s.	29,1	15,6	0,800	1095
Eidam 45 % t. v s.	26,0	26,1	0,733	1435
Čedar	26,0	31,5	0,800	1640
Primátor	27,2	28,8	0,887	1557
Tavený sýr 30 % t. v s.	17,7	10,5	0,420	710
Tavený sýr 70 % t. v s.	11,1	36,4	0,207	1570

* % t. v s. = procentuální zastoupení tuku v sušině

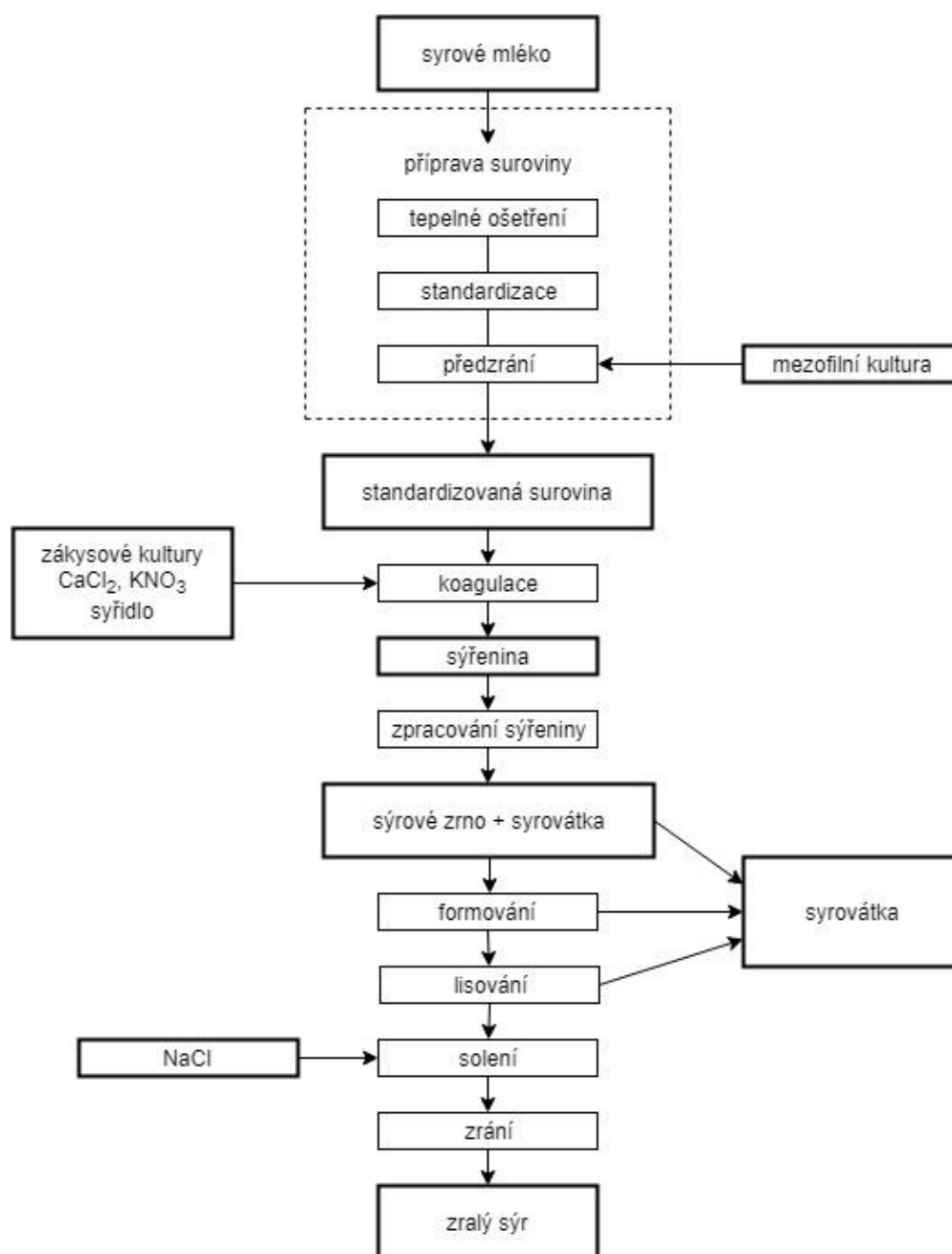
Podstatnou roli hrají sýry především ve výživě obyvatel Evropy, severní Ameriky, Austrálie a Nového Zélandu. Ve Francii, kde se pohybuje tradiční konzumace kolem 27 kg na osobu za rok, sýry pokrývají z 50 % doporučenou denní potřebu vápníku a u mužů až z 30 % doporučenou denní dávku bílkovin. Je tradicí, že se v této evropské zemi často podává po hlavním jídle kousek sýru místo dezertu a bylo potvrzeno, že to má dokonce své opodstatnění. V zažívacím traktu dochází trávením k uvolňování aminokyselin ze sýrů, kde začnou pracovat kyseliny asparagová a glutamová. Jejich role tu má podpůrný účinek na vylučování žaludečních šťáv, čímž se zlepšuje trávení. Navíc mléčné bílkoviny v sýrech vynikají schopností stimulovat tvorbu slin vedoucí ke schopnosti neutralizovat zubní plak a zvyšovat mineralizaci zubní skloviny. V České republice dosáhla v roce 2017 spotřeba sýrů 17,9 kg na osobu, z toho sýry přírodní tvořily 11,3 kg, tvarohy 4,7 kg a tavené sýry 1,9 kg z čehož vyplývá, že mají sýry také u nás významné zastoupení a doplňují tak jídelníček o bohaté nutriční látky.

Z hlediska výživy se sýry stávají nejen bohatým zdrojem tuku ale i vysoce hodnotných bílkovin, jejichž obsah se v hotových produktech pohybuje v intervalu 4 až 40 %. Proteinové složení zahrnuje všechny esenciální aminokyseliny nezbytné pro lidskou výživu, včetně lysinu, který není součástí rostlinných bílkovin. Velmi důležitá je také vysoká stravitelnost bílkovin sýru, jejíž účinnost šplhá až k 95 %. Tato vlastnost také souvisí s tvorbou kratších řetězců peptidů a aminokyselin při zrání sýrů. Sýry jsou nejen kvalitním zdrojem bílkovin, ale i lipofilních vitamínů (A, D, E, K) a minerálů jako je hořčík, vápník a fosfor. V rámci výživových hodnot je zajímavý také obsah biologicky aktivních peptidů, konjugované kyseliny linolové, sfingolipidů (nositelé alifatických aminoalkoholů) a probiotických mikroorganismů [3].

Mimo nutričních složek se sýry projevují velkým množstvím aromatických látek. Podle finálního druhu sýru se obsah těchto látek významně liší, a to kvantitativně i kvalitativně. U typu sýru jako je např. Gouda jsou typickými vonnými komponentami některé druhy esterů (ethyl-buthanoát) či kyselin (octová, máselná, valerová). Sýry, které se vyrábějí za pomoci bakterií propionového kvašení (Ementál) obsahují aromata jako je methyl-thioacetát, propionová kyselina, některé alkoholy nebo nižší mastné kyseliny. Sýry, které se vyznačují mazem na povrchu (Romadur), jsou obohaceny látkami jako je fenol nebo kresol (methylfenol). Aroma plísňových sýrů typu Camembert zase vystihuje přítomnost alkoholu okt-1-en-3-ol, který je cítit po houbách. Květinovou vůni obstarává sýrům 2-fenylethanol, za oříškové aroma je zodpovědný 1,3-dimethoxybenzen. Sirné sloučeniny pak dodávají sýrům česnekové nádechy [5].

3 TECHNOLOGICKÉ POSTUPY VÝROBY SÝRŮ

Podle vyhlášky číslo 397/2016 jsou sýry definovány jako mléčné výrobky, které se vyrábějí vysrážením mléčné bílkoviny (syrovátky) z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním ^[4]. Současná doba nabízí velké množství typů sýrů a jejich variant. Uvedené schéma, znázorňující základní sýrařskou technologii, je proto pouze orientační (viz Obrázek 1).



Obrázek 1: Zjednodušené schéma výroby sýrů ^[3]

Jedním z důvodů, proč se mléko začalo zpracovávat na sýry, je jejich delší trvanlivost. Za prodloužení lhůty trvanlivosti odpovídá hlavně fermentace laktózy, a to především na kyselinu mléčnou. Dále k ní přispívá snížení vodní aktivity a hodnoty pH společně s přidavkem soli. Sýry získané oddělením syrovátky po koagulaci mléka s různou tučností představují již tradiční produkty, které člověk poznal už v době před několika tisíci lety, kdy se začala domestikovat zvířata. Už tenkrát dokázal člověk zpracovávat jejich mléko na mléčné výrobky, a to i s tehdejšími vědomostmi a zařízeními. Čerstvé nebo vyzrálé výrobky od bílé po nažloutlou barvu v sobě koncentrují základní složky sušiny mléka, především kasein a mléčný tuk. Do syrovátky přestupuje větší část vody, laktóza, bílkoviny syrovátky, komplex vitamínů B, minerály (hořčík, vápník, fosfor) a části soli. Na výrobu 1 kg sýra se pak spotřebuje asi 10 litrů mléka.

3.1 Čištění, tepelné ošetření a sterilizace mléka

Samotná sýrařská technologie zahrnuje řadu postupů a biochemických přeměn. Po příjmu syrového mléka jsou eventuální mechanické nečistoty odstraněny filtrací nebo centrifugací. Dále následují technologie, kdy se mléko sterilizuje tepelným ošetřením. Termizace potlačuje nežádoucí změny mléka při jeho skladování za chladu. Pasterizace je zase zodpovědná za zdravotní nezávadnost sýrů. Pro výrobu se nejčastěji využívá tzv. šetrné pasterizace, která se provádí při teplotě asi 72 °C po dobu 15–30 s. S vyššími pasteračními záhřevy se pracuje zřídka, jelikož se při nich zhoršují důležité vlastnosti mléka jako je například syřitelnost nebo dochází k nekvalitnímu oddělování syrovátky.

Přítomnost některých druhů bakterií a spor může ve výsledku způsobit vady u zrajících sýrů. Proto se také využívá metod baktofugace či mikrofiltrace, kterými lze odstranit drtivou většinu nechtěných mikroorganismů. Princip baktofugace je obdobou centrifugace, kdy se k odstranění sporotvorných bakterií pracuje s odstředivými silami. Mikrofiltrace zase využívá průtok membránou s póry dosahující velikosti kolem 0,5 μm. Každý sýr je charakterizován určitou hodnotou tuku v sušině, proto se v průběhu tepelného ošetření provádí také standardizace mléka, kdy dochází ke smíchání části smetany s odstředěným mlékem v takovém poměru, aby bylo dosaženo požadované tučnosti mléka. Další operací je homogenizace vedoucí ke zmenšení tukových kuliček, které představují dispergovaný mléčný tuk. Je vhodná pro výrobu některých čerstvých sýrů, u těch zrajících se zpravidla neprovádí.

3.2 Koagulace a přidání mlékařských kultur

Důležitou kapitolou v průběhu výroby sýra je koagulace neboli srážení mléčné bílkoviny, a to konkrétně kaseinu. Kasein se z mléka sráží jednak při snížení pH působením kyselin (díky bakteriím mléčného kvašení) na hodnotu izoelektrického bodu, jednak pomocí enzymů. V prvním případě je řeč o takzvaném kyselém srážení, které se uplatňuje jen u několika málo nezralých sýrů, především u tvarohů nebo třeba u výroby jogurtů. V dalším případě se využívá sladkého (enzymatického) srážení, tedy koagulace mléka za pomoci syřidla ^[6].

Při srážení mléka syřidlem nebo snížením pH se kaseiny shlukují do malých kulovitých částic (tzv. micel), přičemž jádro micely tvoří alfa (50 %) a beta (30 %) kaseiny a povrch obklopují kaseiny s označením kappa (20 %). Kappa kaseiny tedy určují to, zda bude možné z mléka vyrobit sýr, v jakém množství a kvalitě. Rychlost sýření mléka a spotřebu mléka na výrobu sýra pak výrazně ovlivňuje původ genotypu kappa kaseinu. Nejvýhodněji jsou na tom dojnice s genotypem BB, horší výtěžnost sýru z mléka pak mají dojnice nesoucí alelu (konkrétní forma genu) A. Vůbec nejhorší je alela typu E, přesněji mléko od dojnic s genotypem EE, které není možné ani srážet ^[8].

Aktivní složkou sýření je proteolytický trávicí enzym chymosin. Ten útočí na specifickou část proteinů v mléce, konkrétně na kappa kaseiny čímž dojde k rozdělení molekuly kaseinu na dvě části. První část je hydrofobní, druhá je ve vodě rozpustná a přechází do syrovátky. Kaseinová micela tak ztrácí svoji hydrofilní část a nastává koagulace. Syřidlo může být živočišného, rostlinného nebo mikrobiálního původu. Co se výroby sýrů týče, lze použít syřidlo např. Laktochym, Fromase či Mikroren. Do sýrařského mléka se přidává mimo jiné chlorid vápenatý (10 g/100 kg mléka), kde působí jako aditivum zlepšující syřitelnost a zvyšující pevnost dále vznikajícího gelu.

Při pasterizaci mléka se zahříváním ztrácí vápník, který se nahrazuje přidáním chloridu vápenatého. Pokud není v mléce přítomen vápník v dostatečném množství, mléko se bude špatně srážet. Na výrobu sýru s nižší kyselostí (např. tvarůžky) se přidává dusičnan draselný (15 g/100 kg mléka), jež zabraňuje procesu duření, které způsobují koliformní bakterie.

Vpravení kyselých kultur bakterií mléčného kvašení je nezbytným předpokladem výroby všech tvarohů a sýrů. Kultury se podílejí na úpravě kyselosti mléka před sýřením. Svou úlohu plní také při fermentaci laktózy a tvorby kyseliny mléčné během procesu koagulace a zpracování sraženiny. Dále se podílejí při proteolytických či lipolytických aktivitách v průběhu zrání a zároveň utvářejí sensorické vlastnosti (specifickou chuť dodává např. přirozeně se vyskytující diacetyl). V neposlední řadě mají kultury vliv na konzistenci a texturu sýra, jako je například známá tvorba ok vznikajících při produkovaném oxidu uhličitým v průběhu fermentace. Průběh srážení pak vede k vytvoření sýrových zrn a k oddělení potřebného množství syrovátky ze struktury gelu. Následují operace jako krájení, míchání, dohřívání, dosoušení a praní sýrového zrna. Všechny tyto fáze podporují synerezi sýřeniny, jinými slovy procesy smršťování a uvolňování sraženiny směřované k formování zrna.

3.3 Solení a zrání

V následujícím kroku se sýry solí chloridem sodným (kuchyňskou solí), který je zaručeným konzervačním ale i chuťovým činidlem. Solení zlepšuje stravitelnost bílkovin a do jisté míry ovlivňuje aktivitu kultur a enzymů při zrání sýrů. Mimo to, že sůl zpevňuje povrch sýrů, je také odpovědná za zvýšený osmotický tlak mezi zrny. Působením na bílkoviny zvyšuje množství uvolněné syrovátky.

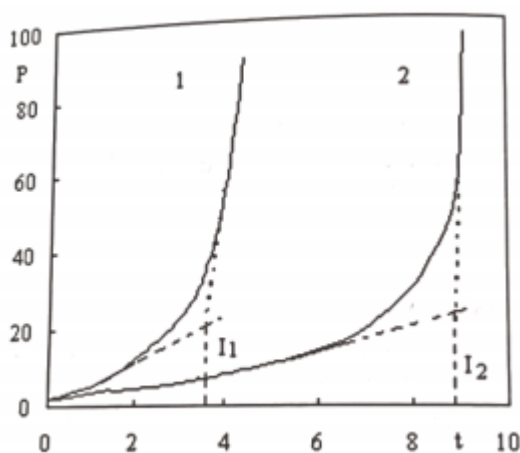
Kromě čerstvých sýrů podstupují snad všechny typy proces zrání. Jde o komplexní souhrn změn mikroflóry založených na enzymatických reakcích. Požadované změny se následně projeví v chuti, vůni, barvě i konzistenci. Vznik aromatických složek je dán primárně biochemickými procesy jako je glykolýza, lipolýza a proteolýza. Při zrání je hlavní bílkovina kasein rozkládána až na volné aminokyseliny, těkavé kyseliny a další jednodušší látky, které dávají sensorické vlastnosti jednotlivým sýrům ^[6].

4 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ANTIOXIDANTŮ

Látky zvané antioxidanty hrají důležitou roli v rámci ochrany potravin a dokazují to tak, že inhibují oxidační procesy a tím snižují riziko široké škály onemocnění. Svými účinky tak přispívají k podpoře lidského zdraví. Definice pro antioxidanty mohou být různé, po chemické stránce se ale jeví jako látky, které mohou reagovat s volnými radikály autooxidačního řetězce, přednostně s peroxidovými radikály.

Při reakci antioxidantů s volnými radikály vzniklými autooxidací mastných kyselin se vytvoří hydroperoxid nebo jiný neradikálový lipidový produkt. Antioxidant přejde do formy volného radikálu, který však bývá dosti stálý, takže není schopen pokračovat v autooxidační reakci. Při reakci se antioxidant spotřebovává. Ve chvíli, kdy je všechn antioxidant spotřebován, začne autooxidace probíhat tak, jako by žádné antioxidanty přítomny nebyly. Antioxidanty tedy nemohou úplně zastavit autooxidační reakci, pouze ji zpomalit nebo ji v ideálním případě posunout až na rychlost iniciační reakce.

Na níže uvedené ilustraci (viz *Obrázek 2*) je znázorněn průběh reakce bez působení antioxidantu a v jeho přítomnosti. Je zřejmé, že antioxidanty prodlouží indukční periodu (tj. období pomalé autooxidace), ale nemají vliv na rychlost následující rychle oxidace.



Obrázek 2: Vliv přídavku antioxidantu na průběhu antioxičáční reakce ^[7]

Zatímco křivka 1 znázorňuje průběh reakce bez antioxidantu, křivka 2 ukazuje ten samý průběh za jeho přítomnosti. Jde o závislost množství hydroperoxidů mastných kyselin na čase. Je zřejmé, že antioxidanty prodlouží indukční periodu (I_1 , I_2), ale nemají vliv na rychlost následující rychle oxidace. Poměr délky indukční periody inhibované a neinhobované reakce se nazývá protekční faktor a nejčastěji se vyjadřuje v % zvýšení stability ^[7].

Ty nejznámější antioxidanty najdeme často v potravinách, potravinových suplementech a léčích. Představují je vitamíny jako například vitamín A, E, C, B₃ neboli niacin, dále karotenoidy, flavonoidy (rostlinná barviva, včetně karotenoidů, některých polyfenolů a tříslovin), fenolické antioxidanty, polyfenoly, některé sloučeniny selenu, zinku, manganu, mědi, germania a antioxidanty na bázi aminokyselin (glutathion, taurin).

Mezi antioxidantní enzymy a další významné antioxidanty, které chrání organismus, řadíme glutathion peroxidázu (GPx) což je enzym, který ke své aktivaci potřebuje stopové prvky selen, mangan, měď a zinek, přičemž tyto prvky jsou samy o sobě antioxidanty. Jiným příkladem enzymu je superoxid dismutáza (SOD) vyžadující stopové prvky jako mangan, měď a zinek. Dvojici pak doplňuje enzym kataláza (CAT), který pracuje ve spojení se SOD. Za zmínění stojí i v současnosti hojně známý koenzym Q₁₀. Práce pojednává o těchto enzymatických sloučeninách ještě dále, a to v podkapitole týkající se antioxidantních vlastností.

4.1 Oxidační stabilita v souvislosti s antioxidantní aktivitou v mléce

Jak je tomu u jiných potravinářských výrob, tak i mlékárenský průmysl klade důraz na udržování oxidační stability ve své hlavní surovině, tj. v mléce. Oxidační reakce mohou způsobovat jak nežádoucí změnu chuti, tak degradaci nutričních složek odpovídajících za kvalitu mléka. Ve své podstatě se jedná o výsledek křehké rovnováhy mezi anti a pro-oxidačními procesy probíhajícími v mléce. Míra oxidační stability závisí na složení mastných kyselin, koncentraci tokoferolů a karotenoidů, případně na kontaminaci kovovými ionty. Finální zpracování, balení a podmínky skladování – to vše má vliv na rozsah přírodních antioxidantů, které jsou přímo spojeny s oxidační stabilitou pasterizovaného mléka a mléčných výrobků ^[11].

Antioxidantní aktivita mléka a mléčných výrobků je způsobena především přítomností vázané síry v aminokyselinách (cystein, methionin) z nichž jsou sestaveny mléčné bílkoviny. Následně to jsou vitamíny A, E, dále karotenoidy, z prvků zinek a selen, enzymové systémy a v neposlední řadě mléčné oligosacharidy a peptidy, které jsou produkovány během fermentace a zrání sýrů ^[11].

4.2 Oxidační reakce

U reakcí oxidačního charakteru obecně platí, že jsou společným znakem pro volné mastné kyseliny a jejich estery. Jde o reakce uhlovodíkového řetězce, kdy karbonyl mastných kyselin poměrně snadno urychluje rozklad hydroperoxidů a nabízí se i reakce s některými produkty oxidace. V potravinách, u kterých je větší zastoupení lipidů, může docházet hned k několika typům oxidačních reakcí.

4.2.1 Autooxidace vzdušným kyslíkem

Při zpracovávání a také skladování potravin je nejfrekventovanějším typem reakce tzv. autooxidace mastných kyselin. Za běžných teplot oxidují se vzdušným kyslíkem pouze nenasycené kyseliny. K autooxidaci nasycených mastných kyselin se schyluje až při vyšších teplotách. Autooxidace uhlovodíkového řetězce mastných kyselin a také jiných uhlovodíků se jeví jako radikálová řetězová reakce, která probíhá standardně ve třech stupních.

První stupeň představuje vznik volného radikálu mastné kyseliny ($R\cdot$) a vodíkového radikálu neboli atomu vodíku ($H\cdot$), které vznikají homolytickým štěpením kovalentní vazby mezi uhlíkem a vodíkem v řetězci. Zjednodušený reakční mechanismus popisuje následující reakce (Rovnice 3):



Na to, aby molekula mastné kyseliny mohla reagovat, musí získat potřebnou energii z nějakého zdroje. Příkladem je třeba záhřev v podobě tepelné energie, další možností je ozáření radioaktivním nebo ultrafialovým zářením, popřípadě viditelným světlem. Volný radikál mastné kyseliny, který vznikl, je vysoce reaktivní. Snadno se tak sloučí s molekulou kyslíku, která je vlastně tzv. biradikálem. Tím vznikne peroxidový radikál ($R-O-O\cdot$), jehož syntézu představuje níže položená reakce (Rovnice 4).



Ten je opět velmi reaktivní, takže odštěpí atom vodíku z další molekuly nenasycené mastné kyseliny. Produktem je hydroperoxid ($R-O-OH$) a další volný radikál mastné kyseliny ($R\cdot$) (Rovnice 5).

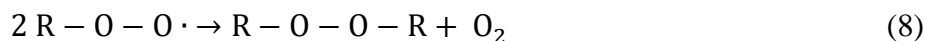
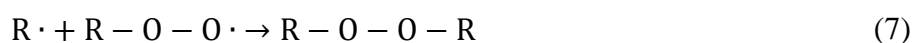
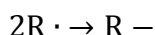


Toto druhé stadium autooxidační reakce se nazývá propagační stupeň neboli propagace. Sled uvedených dvou reakcí propagačního stupně se může opakovat jednou i vícekrát. Důvodem proč se autooxidaci říká řetězová reakce je, že byly objeveny reakce zahrnující více jak tisíc článků. Reakce volného radikálu mastné kyseliny s kyslíkem je mnohem rychlejší než reakce

peroxidového radikálu s uhlovodíkovým řetězcem lipidu. Peroxidový radikál reaguje s molekulou lipidu poměrně pomalu, a tato reakce proto určuje rychlost autooxidace.

Třetím stadiem autooxidace je terminace a proběhne tehdy, pokud je koncentrace přítomných volných radikálů dosti vysoká. Při této situaci je vysoce pravděpodobné, že dva volné radikály spolu začnou reagovat až na neradikálový, stabilnější produkt a tím reakční řetěz ukončí.

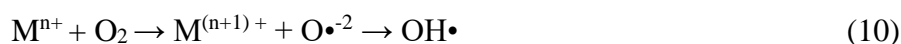
Terminaci lze demonstrovat těmito rovnicemi (Rovnice 6, 7, 8):



Za omezeného přístupu kyslíku, kdy rychlost autooxidace závisí na jeho parciálním tlaku, jsou hlavními radikály v systému radikály mastné kyseliny ($R\cdot$) a hlavní terminační reakcí je jejich rekombinace. Za dostatečného přístupu kyslíku rychlost reakce na jeho parciálním tlaku nezávisí. Vzniká více peroxidových radikálů ($R-O-O\cdot$), hlavními terminačními reakcemi jsou rekombinace radikálů mastných kyselin s peroxidovými radikály a vzájemné rekombinace peroxidových radikálů ^[7].

4.2.2 Oxidace katalyzovaná kovy

Spoustu přírodních olejů obsahuje kovy jako kobalt, železo, měď a hořčík, které vlastní přechodovou valenci, tzn. redukují se přijetím jednoho elektronu. Mají značné pro-oxidační vlastnosti při lipidické oxidační reakci ^[9]. Kovy ve svoji vyšší valenci mají tendenci podněcovat autooxidační reakce, konkrétněji mohou iniciovat oxidaci mastných kyselin reakcí s kyslíkem. Aniont superoxidového radikálu, který následně vznikne, může produkovat ztrátou elektronu singletový kyslík (Rovnice 9) nebo může reakcí s protonem vytvořit hydroxylový radikál, který je podnětem řetězové reakce (Rovnice 10).



4.2.3 Fotooxidace

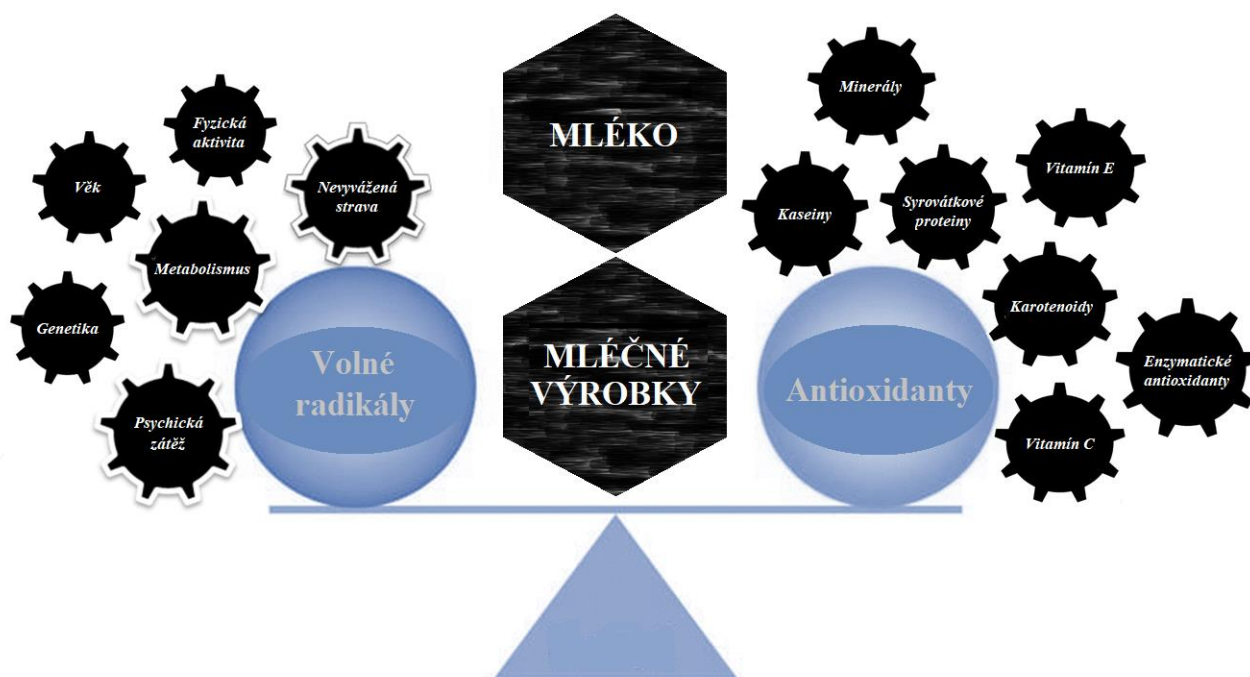
Fotooxidace zahrnuje přímou reakci světlem aktivovaného singletového kyslíku s nenasycenými mastnými kyselinami a následnou tvorbu hydroperoxidů. V nejstabilnější tripletové podobě není kyslík velmi reaktivní s nenasycenými složkami. Fotosenzibilní autooxidace tak zahrnuje reakci dvojně vazby a singletového kyslíku produkovaného světlem v přítomnosti látek, ve kterých působením světla probíhají fyzikální či fotochemické změny jako je např. chlorofyl nebo erytrosin. Oxidace singletovým kyslíkem se liší od autooxidace v tom, že se nejedná o radikálovou řetězovou reakci ^[9].

4.2.4 Inhibitory oxidační reakce

Jistým preventivním opatřením lze minimalizovat či zpomalit oxidaci lipidů. Mezi taková opatření se řadí minimalizace přítomnosti kyslíku a nežádoucích katalytických kovů nebo snížení účinnosti těchto faktorů ^[9]. Jako inhibitory oxidačních reakcí se prezentují všechny látky se schopností snížit rychlost oxidace bez ohledu na mechanismus jejich působení. Tyto látky tak lze zařadit mezi antioxidanty. Příkladem takových sloučenin jsou látky chelatovného charakteru anebo takové, jež rozkládají hydroperoxy neradikálovou cestou. Snižovat reakční rychlost mohou také látky, které dokáží hydroperoxy stabilizovat a tím tak inhibovat tvorbu volných radikálů ^[7].

5 ZDROJE ANTIOXIDAČNÍCH VLASTNOSTÍ SÝRŮ

Vlastnost potravinu označovanou přívlastkem antioxidantní lze definovat jako charakteristiku látky skládající se ze složek, jež přímo atakují nežádoucí formy kyslíku radikálové povahy. Za produkcí samotných volných radikálů stojí řada faktorů, kterým je lidský organismu vystaven prakticky denně a mnohdy je nelze nijak ovlivnit. Na straně druhé pak existují látky čelící těmto radikálům, a to jsou antioxidanty, které vytváří v těle rovnováhu (Obrázek 3). Klíčovou roli v udržování pro-oxidační a antioxidantní homeostázy v lidském těle hrají mléčné antioxidanty, které se mohou objevit jak v lipofilní, tak v hydrofilní formě.



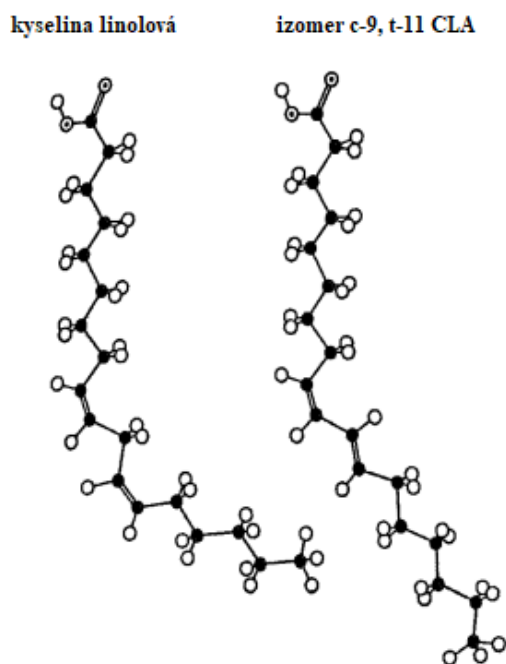
Obrázek 3: Rovnováha mezi mléčnými antioxidanty a volnými radikály ^[11]

Lipofilní antioxidanty se projevují vysokou tepelnou stabilitou a jsou aktivně přítomny ve všech mléčných produktech. Oba typy antioxidantů (rozpuštěné v tucích i ve vodě) interagují v procesu deaktivace reaktivních sloučenin kyslíku a konečných produktů peroxidace lipidů ^[2].

5.1 Antioxidační substráty

Majoritními látkami spadajícími pod tuto podkapitulu jsou antioxidační substráty lipofilního a hydrofilního charakteru. Mezi hlavní lipofilní antioxidanty v mléčném tuku se řadí **konjugovaná kyselina linolová** (CLA, z anglického conjugated linoleic acid), vitamín A, vitamín E, dále β -karoten a koenzym Q₁₀. Dalšími látkami s antioxidačními vlastnostmi, ale s menším efektem, jsou vitamín D₃ nebo fosfolipidy ^[2].

Nejvíce aktivním antioxidantem v mléčném tuku je konjugovaná kyselina linolová. Tato unikátní sloučenina je odvozená od mastné kyseliny linolové, která ve své molekule obsahuje dvě konjugované dvojné vazby. Jejím běžným výskytem je mléko, mléčné produkty a také hovězí maso nebo například slunečnicový olej ^[10]. Konjugovaná kyselina linolová je termínem používající se pro směs polohových a geometrických izomerů linolové kyseliny s dvojnými vazbami mezi atomy uhlíku, zahrnující všechny možné kombinace konfigurací cis a trans izomerů. Existuje jich celkem 28, avšak největší biologickou aktivitu vykazují mezi izomery cis-10 a trans-12 nebo cis-9 a trans-11 (viz *Obrázek 4*). CLA je přirozeně se vyskytující látkou v potravinách. Její zdroje spadají pod živočišný původ, konkrétně pochází z přežvýkavců. Typickým příkladem jejího výskytu je již zmíněné hovězí maso nebo sýry, u nichž postupné zpracování (zrání) vede k nárůstu obsahu CLA ^[12].



Obrázek 4: Chemická struktura kyseliny linolové a jejího konjugovaného izomeru ^[12]

Tabulka 6: Obsah CLA a jejího neaktivnějšího izomeru v různých typech sýru ^[2]

Produkt	CLA (mg/g tuku)	Izomer cis-9, trans-11 CLA (% CLA)
Plnotučné mléko	3,4–6,8	82-97
Kondenzované mléko	6,3–7,0	82
Čedar	4,0–5,3	78-82
Feta sýr	4,9	81
Cottage	4,5–5,9	83
Mozzarella	3,4–5,0	78-95
Parmezán	3,0	90
Ricotta	5,6	84
Tavený sýr	4,1–10,7	75

Další významnou látkou, která hraje roli antioxidantu, je vitamín E. Přestože se v mléce neprojevuje v nijak velkém množství (0,3–0,8 µg/ml), svoji antioxidační vlastnost nezapře. Jeho hlavním úkolem je chránit mléčný tuk před autooxidací. Vitamín E se nachází v membránách tukových globulí a s větší pravděpodobností nežli v mléce, by se hledal v másle, tam je totiž jeho obsah daleko vyšší (18–35 µg/g tuku). Obsah vitamínu E je stanoven tokoferolem obsaženým v krmivech. Mléko od krav krmených tzv. zeleným krmivem vyniká mnohem vyšším množstvím tohoto vitamínu než od dojníc, kterým je podávána klasická krmná směs (TMR, z anglického Total mixed ration). V krmivech a potravinách rostlinného původu je přítomen vitamín E ve formě osmi chemických sloučenin, konkrétně čtyř typů tokoferolů a čtyř tokotrienolů, značených α , β , γ , δ . Mléčný tuk obsahuje pouze α -tokoferol, který vykazuje nejvíce antioxidační aktivity.

Oproti ostatním typům je jeho biologická aktivita 10 – 100krát silnější. Biologická aktivita vitamínu E je porovnávána pouze u α -tokoferolu, zatímco zbývající izomery (i když jsou plně absorbovány), nejsou v lidském těle převedeny na aktivní α -tokoferol. Za tímto faktem stojí tokoferolový transferový protein α TTP, který se váže v játrech. Odtud transportuje a zásobuje α -tokoferol na různá místa v těle. Zbývající tokoferoly a tokotrienoly odvozené hlavně z rostlinných tuků (obsažených v lidské stravě), jsou vylučovány žlučí. Protein α TTP se podílí na procesu vazby α -tokoferolu s lipoproteiny VLDL a jejich uvolnění do krevního oběhu. V krvi jsou VLDL transformovány do LDL a HDL, α -tokoferol je tedy přítomen ve všech lipoproteinech přispívajících k distribuci a účinkům vitamínu E v organismu ^[2].

Vitamín E je nejaktivnějším lipofilním antioxidantem v lidském těle a může za to jeho chemická struktura. Ta totiž zahrnuje chromanový kruh s tzv. hlavou a koncem (isoprenoidní postranní řetězec). Přítomnost tohoto hydrofobního řetězce podporuje rozpustnost tuku, přičemž aromatický kruh je zodpovědný za polární charakter vitamínu E. Chemická struktura také usnadňuje jeho umístění v lipidové dvojvrstvě buněčných membrán, kde je hydrofobní řetězec vložen mezi uhlíkaté řetězce patřící lipidům a polární část (hlava) je vystavena hydrofilnímu prostředí.

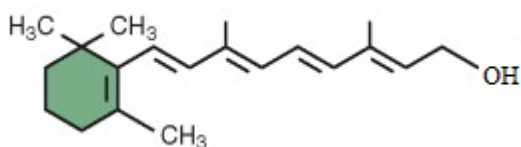
Mezi hlavní funkce vitamínu E v těle patří prevence oxidace lipidů buněčných membrán, případně i plazmatických lipoproteinů a vylučování volných radikálů společně s reaktivními formami kyslíku. Dále zvyšuje aktivitu antioxidantních enzymů, jako je peroxidáza nebo transferáza, závislých na GSH (tripeptid podílející se na odstraňování ROS). Důležitá je antioxidantní schopnost samotného α -tokoferolu, zejména narušení lipidového peroxidového řetězce. Během peroxidace lipidů (v biologických membránách a lipoproteinech) interaguje α -tokoferol s peroxidovými radikály za vzniku relativně málo reaktivních a stabilních tokoferolových radikálů (TOC-O \cdot). Tyto radikály mohou interagovat s jinými volnými radikály nebo se vázat s radikály peroxidu, které reakce volných radikálů ukončují.

Kromě zachování integrity buněčné membrány vitamín E ovlivňuje aktivitu enzymů jako je fosfolipáza A₂, cyklooxygenáza a proteinkinázy B a C. Dále se podílí na přenosu signálu a genové expresi. Pomáhá vitamínu A při deaktivaci ROS a vstupuje do synergických reakcí se selenem za účelem ochrany buněčných membrán před negativními účinky lipidové peroxidace. Při expozici oxidačnímu působení regeneruje β -karoten a chrání vitamín A. Tokoferolový radikál se regeneruje na metabolicky aktivní formu vitamínu E v přítomnosti glutathionu, vitamínu C, koenzymu Q₁₀ a β -karotenu. Nízké hladiny výše zmíněných antioxidantů pak zvyšují poptávku po vitamínu E.

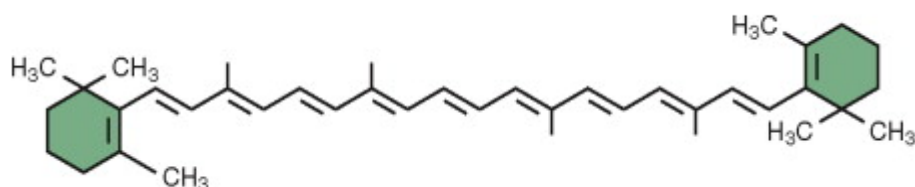
Jako silný antioxidant přispívá vitamín E k optimální struktuře a permeabilitě buněčných membrán, což vede ke zlepšení funkcí buněk a tkání, které jsou nejvíce vystaveny oxidačnímu stresu (např. erytrocyty). Nedostatek vitamínu může urychlit stárnutí a zvýšit riziko kardiovaskulárních či neurodegenerativních chorob. Ovšem příjem syntetického vitamínu E je spojen se zvýšením rizikem infarktu myokardu a dalšími onemocněními srdce. Důvodem proč vitamín E může projevovat známky toxicity je, že má větší afinitu ke strukturám buněčných membrán a vylučuje přírodní antioxidanty.

Mléčné produkty jsou bohaté pro karotenoidy a také v sobě ukrývají biologicky dostupný vitamín A, jehož nejvyšší obsah (0,15–1,5 mg/100 g) je možné zaznamenat v sýrech a máslech. Zatímco samotné mléko a produkty jako je tvaroh nebo jogurty disponují výrazně nižšími hodnotami (0,15–1,5 mg/100 g). Koncentrace vitamínu A spolu s β -karotenem závisí na složení stravy, která je podávána dobytku. Podobně jako tomu je u jiných karotenoidů, i β -karoten je rozkládán střevním enzymem karoten dioxygenázou na retinol, což je aldehyd, který je redukován na retinol nebo kyselinu retinovou. Esterifikovaný retinol je pak transportován krví do mléčných žláz. Karoten dioxygenáza je enzym o nízké aktivitě a při velkých množstvích β -karotenu jsou používány společně s krmivem. V mléce se pak objevují v nezměněné podobě [2].

Retinal a kyselina retinová představují hlavní biologicky aktivní formy vitamínu A. Retinal přispívá ke zdravějšímu zraku a kyselina retinová má na starost regulaci buněčného dělení a růstu. Tato kyselina navíc přímo ovlivňuje epitel a regeneruje pokožku, rohovku a sliznice v gastrointestinálním, urinálním, reprodukčním a respiračním systému. Dále stimuluje imunitní systém a produkci bílých krvinek (granulocytů a leukocytů). Antioxidační aktivita je jednou z nejdůležitějších biologických funkcí karotenoidů, kdy proti volným radikálům zasahují vitamín A společně s jeho prekurzorem β -karotenem, označovaného také jako provitamin A. Blízký vztah mezi nimi dokazuje i jejich chemická struktura (Obrázek 5,6). V reakcích totiž z jedné molekuly β -karotenu vznikají dvě molekuly vitamínu A.



Obrázek 5: Molekula retinolu (vitamínu A) [15]



Obrázek 6: Chemická struktura β -karotenu [15]

Jejich antioxidační vlastnosti slouží jako prevence před oxidací frakce LDL cholesterolu a inhibují peroxidaci lipidů ve tkáních s nízkým parciálním tlakem kyslíku. Za těchto podmínek karotenoidy zachycují singletový kyslík a peroxidy lipidů účinněji než vitamíny A, E a C. Naopak při vysokém parciálním tlaku kyslíku, např. v dýchacím epitelu, mohou mít β -karoten s vitamínem A pro-oxidační účinek a jejich autooxidace inicializuje peroxidaci strukturních lipidů.

Jako antioxidanty s nízkou molekulovou hmotností se oba podílejí na prevenci proti ateroskleróze a rakovině. Za jejich antikarcinogenní účinky může přítomnost mnoha konjugovaných dvojných vazeb v jejich molekulách, hlavně u karotenoidů se schopností absorbovat singletový kyslík. To je důležité hledisko při prevenci určitých typů rakoviny kůže vyvolaných UV zářením. Vzhledem ke své schopnosti absorbovat singletový kyslík, karotenoidy účinně chrání i DNA před oxidací. Vitamín A (zejména kyselina retinová) chrání tělo před ranými stadii rakoviny, zatímco β -karoten brání neoplastické progresi. Podobně jako předchozí antioxidanty, tak i vitamín D₃ je součástí neenzymatického antioxidačního systému mléka. Jeho nejaktivnější forma klacitriol uplatňuje antioxidační účinky při inhibici peroxidace lipidů. Ač je v letním období toho vitamínu v kravském mléce nejvíce, jeho obsah bývá nižší než 0,002 mg/ 100 g mléka. Mnohem bohatším zdrojem D₃ je mléčný tuk, který se nachází ve zrajících sýrech, másle či smetaně. V lidském těle je vitamín D₃ zodpovědný za regulaci rovnováhy vápníku a fosforu a udržování homeostázy vápníku. Tento vitamín navíc ovlivňuje vstřebávání posledních dvou zmíněných prvků v tenkém střevě. D₃ je navíc nutný pro správné fungování příštítných tělísek a ledvin.

Mléčný tuk obsahuje také malá množství koenzymu Q₁₀. Ten má své zastoupení v elektronovém transportu a podílí se na syntéze ATP, která zlepšuje energickou výkonnost v buňkách a tkáních. Koenzym Q₁₀ je vysoce aktivní antioxidant a jeho redukováná forma ubichinon chrání buněčné membrány a LDL cholesterol proti oxidaci účinněji než α -tokoferol nebo β -karoten. Ubichinon podporuje antioxidační účinky vitamínu E (inhibuje peroxidaci pouze ve fázi propagace) a zároveň zabraňuje iniciaci a progresi peroxidace lipidů a fosfolipidových PUFA v membránách mitochondrií. Vazbou na proteiny stabilizuje tyto membrány a zajišťuje jejich soudržnost [2].

5.2 Antioxidační enzymy a ostatní hydrofilní antioxidanty

Hydrofilní antioxidanty tvoří poměrně velkou skupinu sloučenin. Jsou jimi syrovátkové proteiny, kaseinové frakce, bioaktivní peptidy, nízkomolekulární sloučeniny dusíku a kyselina močová. Podstatně důležitější skupinou antioxidantů jsou ale enzymy, mající za úlohu neutralizovat volné radikály v mléce. Patří sem superoxid dismutáza (SOD), kataláza (CAT), glutathion peroxidáza (GPx) a méně známá laktoperoxidáza (LPx). Tyto enzymy vytvářejí synergický systém, který zvyšuje antioxidační potenciál mléka [2].

5.2.1 Antioxidační vlastnosti kaseinu

Kaseiny vytvářejí hlavní proteinovou složku mléka ve formě makromolekulárních agregátů. Jak se ukázalo, mléčné proteiny mají schopnost zachycovat vysoce reaktivní formy kyslíku. Studie také potvrdily, že kasein inhiboval lipidickou autooxidaci, která byla katalyzována lipoxygenázou, což je enzym oxidující obecně látky tukového charakteru. Samotné volné aminokyseliny nemají sílu tlumit účinky volných radikálů ani je vychytávat, avšak primární struktura kaseinových molekul působí jako lapač [11].

5.2.2 Antioxidační vlastnosti syrovátkových proteinů

V posledních letech je využití syrovátky výrazně na vzestupu, a to především díky rostoucí produkce syrovátkového proteinu u sportovců. Se svojí biologickou hodnotou se uplatňuje nejen jako stavební kámen pro růst a regeneraci svalové hmoty, ale vyniká i svou antioxidační aktivitou, a to inhibovat nežádoucí oxidaci u lipidů. Tato aktivita je zapříčiněna mnohostranně účinným laktoferinem, což je glykoprotein schopný vázat a přenášet volné železo v organismu a mimo jiné se vyznačuje svými antimikrobiálními vlastnostmi. Jeho využití lze najít i v léčbě chronické hepatitidy typu C a kožních infekcí. Laktoferin má příznivý vliv na růst bifidobakterií v zažívacím ústrojí. Další příčinou antioxidační povahy syrovátkového proteinu je přítomnost aminokyselin obsahujících ve svých molekulách (v postranních řetězcích) síru, která je schopná vychytávat volné radikály. Konkrétně jsou jimi methionin a cystein [11].

5.2.3 Antioxidační enzymy

Tělo neustále ochraňuje komplexní antioxidační spektrum látek, ať už enzymatické nebo neenzymatické povahy. Jejich molekuly společně působí proti radikálům, aby odolávaly škodlivým účinkům, které následně postihují životně důležité biomolekuly a tělesné tkáně. Antioxidační enzymy se řadí do tzv. přední linie antioxidantů, bez kterých by se organismus těžko obešel. V biologických systémech velice rychle zasahují a neutralizují jakoukoliv molekulu, která vykazuje i sebemenší radikálový potenciál.

Hlavními představiteli těchto enzymů jsou superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza a jejich společným znakem je, že účinně rozkládají pro tělo jedovatý peroxid vodíku a hydroperoxydy a na neškodné molekuly. Třída enzymů také zahrnuje proteiny, které vážou ionty kovů ve svých molekulách a následně tak brání v tvorbě volných radikálů. Příkladem takového proteinu je transferin.

Superoxidové radikály ($\cdot O_2^-$) nebo singletové kyslíky (1O_2), které se generují metabolicky v tkáních či buňkách, jsou katalyticky přeměněny na peroxid vodíku a molekulární kyslík superoxid dismutázou. Peroxid vodíku je ale při větším nashromáždění pro tkáň toxický. Aby se tomuto jevu předešlo, přítomný enzym kataláza, kterého je v peroxizomech (buněčných organelách plazmatického retikula) dostatečná zásoba, rozkládá zmíněný peroxid na vodu a kyslík, což vede ke snížení rizika poškození buněk. V mitochondriích ale kataláza chybí a úlohu za ni přebírá enzym glutathion peroxidáza, který má schopnost převést redukující peroxid vodíku spolu s lipidickými peroxidy až na příslušné alkoholy. Superoxid dismutáza (SOD, z anglického superoxide dismutase) je nejsilnějším enzymatickým antioxidantem v buňce, který zároveň detoxikuje. Tento endogenní enzym účinkuje jako složka ochranného systému prvního řádu proti reaktivním druhům kyslíku (ROS). V živých organismech katalyzuje dismutaci dvou molekul superoxidového aniontu na peroxid vodíku a kyslík, což demonstruje následující rovnice (Rovnice 11):

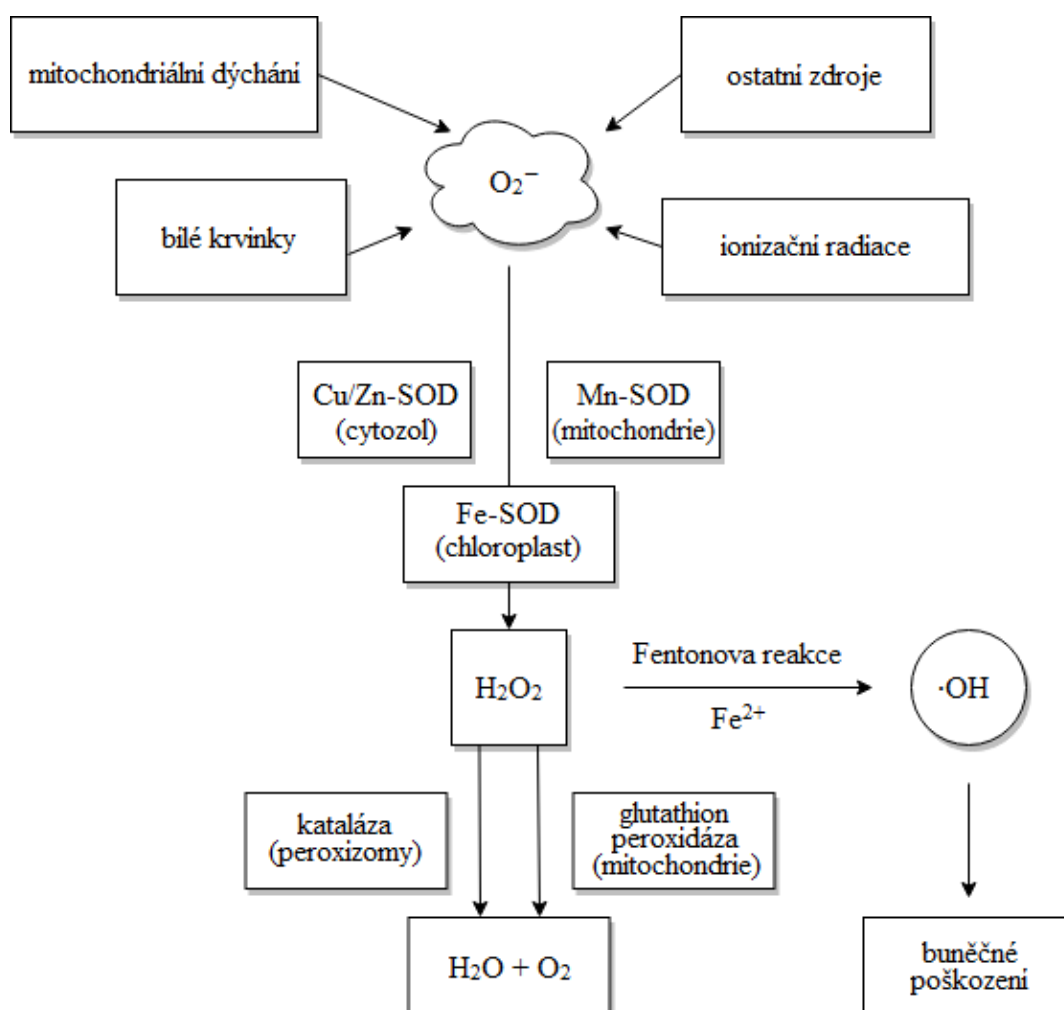


To následně činí potencionálně škodlivý aniont méně nebezpečný. SOD je metaloenzym a to znamená, že pro svoji aktivaci potřebuje metalofaktor. Na základě typu kovového iontu, který je vyžadován jako kofaktor SOD, existují různé formy enzymu. Kovové ionty, jež jsou běžně vázány SOD systémem, se rozdělují do tří forem. Fe-SOD se přirozeně vyskytuje v prokaryotických organismech a chloroplastech některých rostlin, Mn-SOD převládá v prokaryotech a mitochondriích eukaryot a Cu/Zn-SOD přítomný v eukaryotických buňkách. Superoxid dismutáza se výhradně objevuje v odstředěném kravském mléce o koncentracích kolem 0,15–2,4 mg/l mléka. Kataláza (CAT, z anglického catalase) je protein tetramerní struktury a jako enzym působí běžně ve všech živých tkáních využívajících kyslík. Kataláza využívá jako svůj kofaktor buď železo nebo mangan a katalyzuje degradaci či redukci peroxidu vodíku na vodu a kyslík, následkem čehož dochází k dokončení detoxikačního procesu podobného jako tomu je u SOD enzymu. Kataláza dosahuje vysoce efektivního účinku, za pouhou sekundu dokáže zničit miliony molekul peroxidu vodíku.

Enzym kataláza je lokalizován primárně v peroxizomech, ale chybí v mitochondriích savčích buněk, tzn. rozpad peroxidu vodíku je přenechán přítomnému enzymu známým jako glutathion peroxidáza (GPx, z anglického glutathione peroxidase). Tento intracelulární enzym doplňuje dvojici předchozích enzymů a spolu tvoří enzymatický systém. Během redukce peroxidu a hydroperoxidu generuje glutathion disulfid (Rovnice 12).



Rozkládá také peroxid vodíku, ale i lipidické peroxidy, kdy konečným produktem jsou příslušné alkoholy. Celý děj probíhá hlavně v mitochondriích, případně v cytosolu. V inhibici lipidické peroxidace hraje roli množství selenu jakožto kofaktoru, který se na enzym glutathion peroxidázu fixuje^[17]. Enzymatickou ochranu v podobě stručného schématu uvádí níže popsána ilustrace. (Obrázek 7).



Obrázek 7: Schéma ochrany antioxidantními enzymy^[17]

6 FORTIFIKACE ANTIOXIDANTY

6.1 Fortifikace při výrobě sýrů

S cílem zvýšení přejímky zpracovaných sýrových výrobků spotřebiteli výrobci často hledají nové způsoby, jak zvýšit jejich takzvanou funkčnost, jinými slovy snaží se potravinu obohatit něčím, co povede ke zlepšení jejich nejen organoleptických vlastností. Funkční potraviny jsou tedy potraviny vyrobené z přirozeně se vyskytujících složek, u kterých je kladen důraz na zvýšení jejich nutriční hodnoty tak, aby zároveň došlo k nárustu zdraví prospěšných látek. Nejedná se tedy o běžně, pravidelně konzumované potraviny. Hlavní metody fortifikace sýrů začleňují do svých procesů probiotika spolu s prebiotiky.

Jedním ze způsobů, jak zvýšit funkčnost sýra, je začlenění probiotik do konečného produktu. Probiotika jsou ve své podstatě živé kultury mikroorganismů, které jsou při konzumaci v adekvátním množství zdraví prospěšné a mají pozitivní dopad na střevní mikroflóru hostitele. Společně s laktobacily a bifidobakteriemi jsou probiotické bakterie nejběžněji užívané v rámci výrobního procesu potravin s probiotiky ^[13]. Aby byl mléčný produkt považován za probiotický, dle vyhlášky č. 397/2016 Sb. musí splňovat jisté mikrobiologické požadavky. Mléčná mikroflóra 1 g výrobku musí obsahovat nejméně 10^6 živoucích kolonií probiotických bakterií ^[4]. Probiotická životaschopnost mikroorganismů musí být navíc udržována po celou dobu trvanlivosti výrobku.

Látky zvané prebiotika nejsou na rozdíl od probiotik živoucího charakteru. Po chemické stránce se jedná o oligosacharidy či polysacharidy, které jsou jinak pro člověka nestravitelné. Prebiotické sloučeniny podporují aktivitu střevní mikroflóry, jinak řečeno jsou potravou pro zdraví prospěšné střevní bakterie. Jako příklad je možno uvést poměrně známý inulin. Bakterie existující v tlustém střevě získávají energii, a jako produkt biochemických reakcí při tomto ději vznikají organické kyseliny. Tyto kyseliny zase fungují jako zdroj energie pro buňky, které tvoří stěny střeva ^[13]. Prebiotika se mohou nacházet buď v potravinách nebo doplňcích stravy, často v kombinaci s probiotiky. Sloučením obou těchto složek se získá symbiotikum. Pozitivní efekt symbiotik je poté dán vyšší možností přežití pozitivně působících bakterií v lidském střevě. Tyto kombinované přípravky pomáhají například při různých průjemových onemocněních, při zácpě, obecně ke zlepšení imunity a celé řadě dalších pozitivních vlivů na lidský organismus ^[14].

Přestože se většina sýrů vyrábí procesem kvašení, neznámá to, že každý sýr nutně obsahuje probiotika. Proto je důležité pečlivě číst informace na obalech sýrů a ujistit se, že je na něm napsáno, že daný výrobek obsahuje živé a aktivní kultury. Probiotika se nenacházejí ve všech druzích sýrů, ale pouze v některých. Mezi sýry bohaté na probiotické kultury patří čedar, mozzarella nebo gouda. Jinými slovy spadají sem ty, které se vyrábí způsobem umožňující přežití zdraví prospěšných bakterií. ^[16, 18]. Sýry jsou tak obecně podporují správnou funkci organismu a jejich pravidelné zařazení do jídelníčku pomáhá v prevenci srdečních chorob a osteoporózy ^[19].

6.2 Fortifikace krmiv

Jak vyplývá z informací uvedených výše, antioxidační složky mléka (hlavně vitamíny) mohou u pravidelných konzumentů významně podpořit jejich denní příjem potravy. Koncentrace těchto sloučenin v mléce jsou jednak ovlivněny krmnými dávkami určenými pro dobytek a jednak podmínkami pozdějšího skladování mléka ^[1]. Na základě tohoto faktu se pak odráží využitelnost mléka a mléčných výrobků nejen v tržním hospodářství, ale i v nutriční oblasti, kde je původ mléka brán jako faktor ovlivňující funkční složení potravin. Funkční potraviny jsou relativně nově zavedeným pojmem, ale obecně se dají definovat jako potraviny s přidavkem složek, které jsou příčinou příznivého vlivu na zdraví konzumenta ^[22].

To, že jsou mléko a následně vyrobené sýry z něj v posledních letech velice žádanou surovinou u lidí, není žádná novinka. Vzhledem ke svému složení a uznávaným přínosům na lidské zdraví se stávají relativně populární složkou ve výživě. V drtivé většině se používá ke zpracování mléko kravské, ovšem kozí mléko je v mnoha aspektech výhodnější. Vyznačuje se nižší alergicitou na přítomné proteiny, větší stravitelností a také vyšším obsahem bioaktivních látek, díky čemuž dostává mnohdy označení i jako funkční potravina. Složení mléka a vlastně i antioxidační potenciál v první řadě ovlivňuje zvolený krmný systém, jinými slovy druh krmiva, jeho míra fortifikace a koncentrace prekurzorů vitamínu A. Buď se může jednat o pastvu s volným výběhem nebo se zvířata krmí ve stále uzavřených prostorech. Dalšími faktory ovlivňující složení mléka jsou roční období (respektive období sucha a dešťů) a proces tepelného ošetření neboli pasterizace.

Byla provedena studie, kdy byly kozy rozděleny do dvou skupin. V té první byla zvířata krmena v omezeném prostoru a dostávala kontrolovanou stravu, druhá skupina měla pravidelnou a čerstvou pastvu na půdě s převahou keřů a jiné zeleně, kam napršelo až 450 mm srážek. Strava pro obě skupiny byla doplňována každý den o přesně připravených dávkách. Pro obě skupiny bylo mléko odebíráno během dvou sezón (sucha a deště). Pro každou sezónu byla polovina vzorků mléka pasterizována a polovina zůstala bez tepelného ošetření. Stejně vzorky byly použity i k výrobě sýrů a syrovátky, kdy se vytvořily třídy po osmi kusech a bylo provedeno tzv. faktoriální uspořádání 2 x 2 x 2. Experimentální jednotky tak berou všechny možné kombinace napříč všemi ovlivňujícími faktory. Studie tak pracovala celkem s 96 analyty (8 x 3 x 2 x 2). Z každého vzorku pak byla vyhodnocena koncentrace množství fenolických látek (TPC, z anglického Total Phenolic Compounds) a antioxidační aktivita ve vodném extraktu získaném z mléka, syrovátky a sýra. Fenolické látky, zejména flavonoidy jsou přírodní sloučeniny s antioxidačními vlastnostmi. Nejen že zabraňují lipidické peroxidaci, ale vazbou do chelátů inaktivují některé pro-oxidační ionty.

Bylo zjištěno, že koncentrace TPC vykazovala o téměř 35 % vyšší hodnotu u mléka, jehož dojnice byly krmeny systémem volného výběhu. Dosažením změn ve složení a přidáním fenolových sloučenin do krmiva je jedním ze způsobů, jak zlepšit kvalitu mléka. Dalším je zvolení volného výběhu jako variantu krmného systému. Koncentrace TPC byla významně vyšší v sýru vyrobeném z nepasterizovaného mléka než v pasterizované formě. Antioxidační aktivita (měřena metodou FRAP) vykazovala větší nárůst u nepasterizované syrovátky a sýra nežli u pasterizace. Technikou DPPH bylo zjištěno že antioxidační aktivita je vyšší v nepasterizovaném mléce i jeho derivátech jako je syrovátka a sýr. Získané výsledky se shodují s odbornou prací od Hilario et al. (2010) ^[20], ve které se zjistilo, že koncentrace TPC a aktivity je výrazně vyšší u sýrů z nepasterizovaného mléka, jehož dojnice se volně pásly. Dále koncentrace TPC byly vyšší ve vzorcích odebraných z období sucha, nikoliv dešťů. Antioxidační kapacita stanovená metodou FRAP činila také vyšší hodnoty při odběru vzorků z období sucha. Koncentrace TPC jsou významně vyšší v nepasterizovaném mléce z pastvin, v syrovátce pak z pasterizovaného mléka v omezeném krmném systému a u všech sýrů z mléka, které bylo odebráno v období sucha ^[21].

7 ZÁKLADNÍ METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

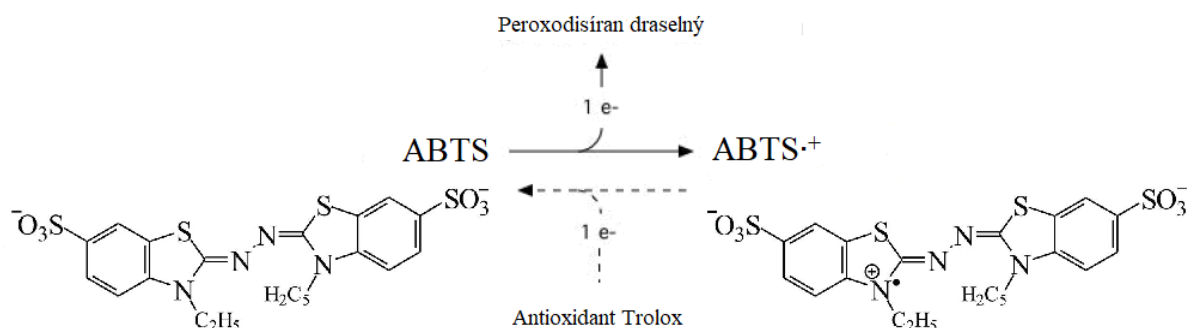
Termín antioxidační aktivita představuje schopnost určité látky omezit účinek volných radikálů a tím bránit biologicky významné sloučeniny před oxidační degradací. Nejčastěji se stanovuje spektrofotometrickými technikami. V rámci antioxidační aktivity by lidé měli rozlišovat pojmy antioxidační kapacita a reaktivita. Kapacita popisuje délku trvání účinků antioxidantů, kdežto reaktivita charakterizuje dynamiku procesu.

Pro porovnání antioxidačních účinků různých sloučenin byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (TAA, z anglického Total Antioxidant Activity), jinde uváděná taky jako TAC (Total Antioxidant Capacity). K jejímu stanovení je možné použít širokou škálu technik, a to z důvodu vysokého počtu rozdílných mechanismů působení antioxidantů. Tyto metody lze klasifikovat do dvou základních skupin. První skupina je tvořena metodami, které posuzují schopnost látek eliminovat radikály, druhá skupina začleňuje postupy založené na redoxních vlastnostech sloučenin [23].

7.1 Metody antioxidační aktivity založené na eliminaci radikálů

7.1.1 TEAC metoda (označovaná také jako ABTS)

Jedná se o nejvíce používanou spektrofotometrickou metodu ke stanovení celkové antioxidační kapacity [24]. ABTS metoda je založena na schopnosti antioxidantu zachytit volný radikálový kationt $ABTS^{\cdot+}$ vytvořený ve vodné fázi a je porovnáván se standardem Trolox, který je v podstatě hydrofilním analogem vitamínu E. $ABTS^{\cdot+}$ se vytváří za použití silného oxidačního činidla jako je peroxidisíran draselný či manganistan draselný se solí ABTS (Obrázek 8) [23].



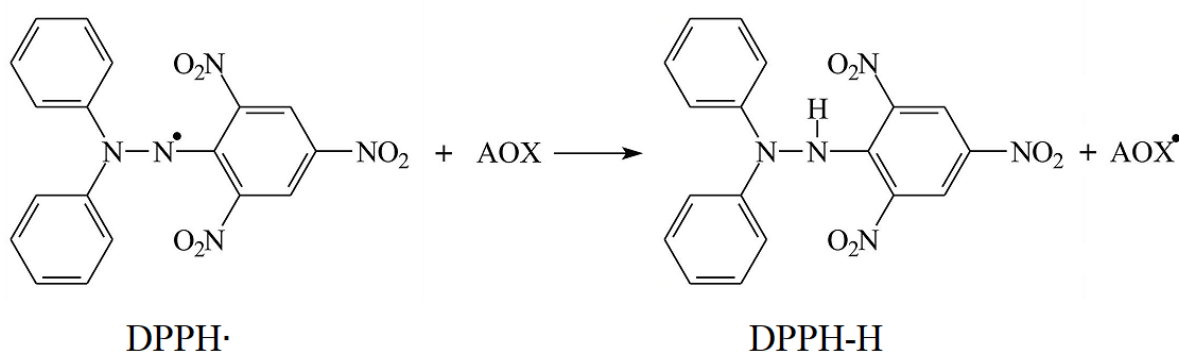
Obrázek 8: Chemická reakce TEAC (ABTS) metody [25]

Vzniklý modrozelený radikál ABTS^{•+} (2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)) je následně zhašen antioxidanty. Při tomto procesu se mění absorbance vzorku, která je nejčastěji měřena cca při 734 nm. Výsledná celková antioxidační kapacita je poté porovnávána s aktivitou synteticky připravené standardní látky, tzv. Trolox. Tato technika vyniká především svou jednoduchostí, rychlostí v provedení a lze ji aplikovat ke zjištění celkové antioxidační kapacity čistých látek i směsí různého původu [24].

7.1.2 Metoda využívající DPPH

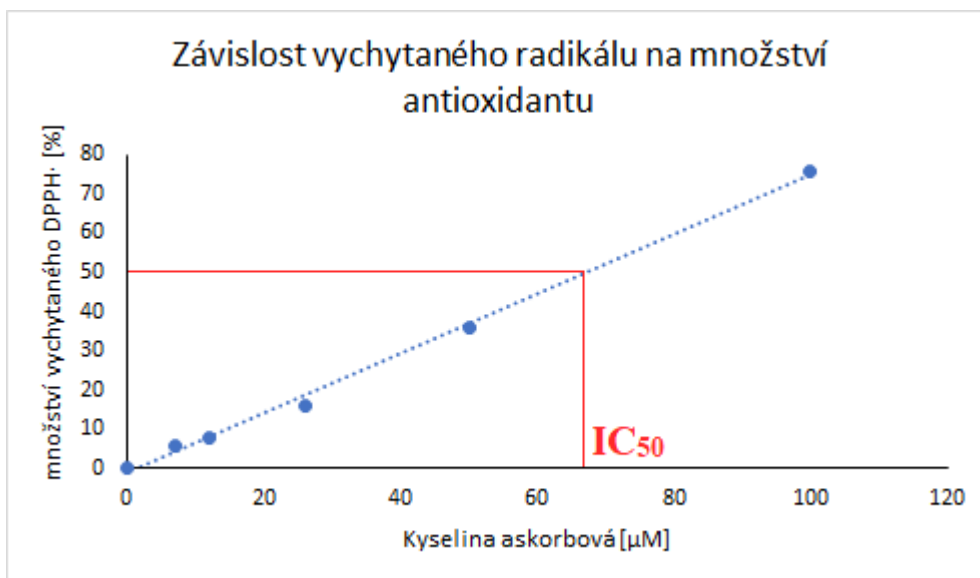
Metoda DPPH je nejjednodušší metodou pro zaznamenávání antioxidační aktivity v potravinách a je velice podobná předchozí metodě TEAC s tím rozdílem, že použitým radikálem je látka zvaná DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) [24].

Principem tohoto měření je pokles absorbance DPPH na jeho absorpční maximum, tj. asi 518 nm, což odpovídá koncentraci volných radikálů přidaných do roztoku. Vstupující intenzivně purpurový DPPH[•] radikál je redukován příslušným antioxidantem (redukujícím činidlem) na odpovídající světle žlutě zabarvený hydrazin, konkrétně difenylpikrylhydrazin (DPPH-H). Průběh reakce je znázorněný níže (viz *Obrázek 9*).



Obrázek 9: Chemická reakce DPPH radikálu s antioxidantem [25]

Antioxidační aktivita je vyjádřena jako inhibiční koncentrace IC₅₀, což je odpovídající množství antioxidantu, které je nezbytné ke snížení koncentrace kontrolního vzorku o 50 % (*Obrázek 10*). Čím vyšší je hodnota IC₅₀, tím i stoupá antiradikálová účinnost. Jediné omezení tohoto stanovení je, že procento zachycených radikálů je závislé na počáteční koncentraci DPPH radikálu. Z toho důvodu je lepší využít odchylky absorbance nebo koncentraci DPPH spotřebovaného v reakci. Hodnota absorbance je poté interpolována v křivce závislosti antioxidační standardní látky jako je Trolox nebo kyselina askorbová. Výsledky jsou poté vyjádřeny jako ekvivalentní koncentrace standardní látky [23].

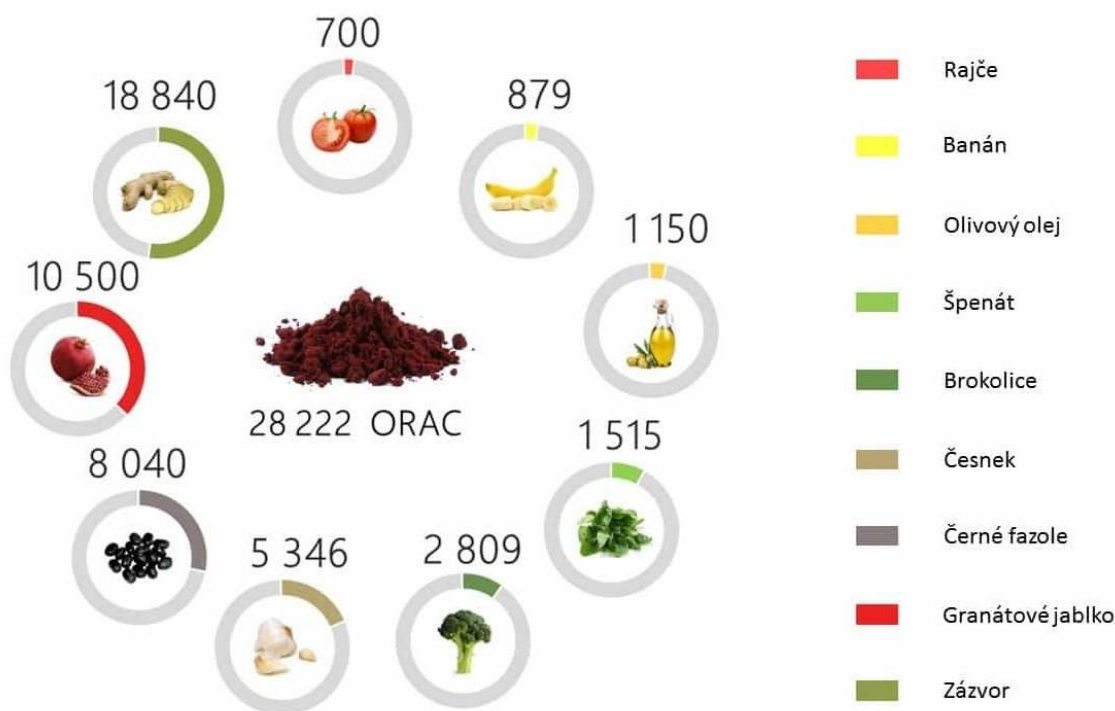


Obrázek 10: Vyjádření inhibiční koncentrace v grafické podobě [25]

7.1.3 ORAC metoda

Doslova kapacita absorbovat volné radikály kyslíku neboli ORAC (z anglického Oxygen Radical Absorbance Capacity) je definována jako metoda hodnotící schopnost analytu (potravin i potravinových suplementů) eliminovat kyslíkové radikály, které jsou ve vzorku za účelem analýzy generovány. Metoda se provádí za použití fluorescenčního proteinu, známého pod zkratkou β -PE (β -fykoerytrinu) nebo fluoresceinu, který je v současnosti využíván více (ORAC_{FL}). Jako tomu bylo u metody TEAC, i tady se užívá jako standardní látka Trolox. Princip je založen na generování peroxylových radikálů za použití látky AAPH (2-2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid) nebo na tvorbě hydroxylových radikálů s využitím systému měďnatých iontů a peroxidu vodíku.

Následující krok pak představuje měření poklesu fluorescence způsobeného látkami, jež zachycují volné radikály (tzv. lapače). Po přidání AAPH do analyzovaného roztoku je zaznamenána fluorescence a aktivita antioxidantu je vyjádřena jako ekvivalent Troloxu, jehož antioxidační aktivita je známá. Jedna ORAC jednotka odpovídá 1 μ M standardní látky Trolox. Níže jsou uvedené hodnoty některých dnes již běžně užívaných potravin, jejichž antioxidační kapacita byla měřena právě touto metodou (*viz Obrázek 11*).



Obrázek 11: Hodnoty ORAC některých potravin vykazujících antioxidační aktivitu [27]

Studie na laboratorních zvířatech prokázaly, že potraviny s vysokými hodnotami ORAC mohou chránit buňky a jejich složky před negativními oxidačními účinky. Ukázalo se, že laboratorní zvířata, kterým byla podávána strava s vysokým podílem hodnoty ORAC, vykazovala podstatně nižší „biologické“ stáří, než měla ve skutečnosti. Příkladem byla zvýšená výkonnost paměti zvířete. Možná, že není daleko doba, kdy budeme hledat ORAC hodnoty na potravinových výrobcích, tak jako dnes kalorie a obsah tuků [24, 27].

7.1.4 Metoda hodnotící eliminaci lipidové peroxidace (TBA-MDA)

Jednou z nejpoužívanějších metod, co se týče hodnocení schopnosti látek inhibovat lipidovou peroxidaci je metoda TBA-MDA, která je založena na stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace a to malondialdehydu (MDA). S kyselinou thiobarbiturovou (TBA) vykazuje barevnou reakci u které se měří absorbance při 532 nm. Spektrofotometrické stanovení aduktů TBA-MDA je jednoduché a citlivé, avšak nespecifické, zahrnuje stanovení všech látek reagujících s TBA. Výhodou je, že test lze provádět i na mikrotitračních destičkách.

7.2 Metody antioxidační aktivity založené na hodnocení redoxních vlastnostech sloučenin

7.2.1 FRAP metoda

Principem metody FRAP (z anglického Ferric Reducing Antioxidant Potential) je redoxní reakce v průběhu které přítomné antioxidanty ve vzorku redukují komplex železitých iontů Fe^{3+} –TPPZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin). Míra antioxidační aktivity se projevuje nárustem absorbance při 593 nm. Tato hodnota odpovídá množství vzniklého komplexu železnaté soli Fe^{2+} –TPTZ. Omezení tohoto stanovení spočívá v tom, že probíhá v kyselějším prostředí okolo pH 3,6. Při tak nízké hodnotě pH se polyfenolické sloučeniny a thioly, které pomalu reagují s komplexem, vůbec nezachycují. Navíc vznikající železnatý iont je jedním z reaktantů Fentonovy reakce, na jejímž konci vzniká vysoce aktivní a toxický hydroxylový radikál. Metoda FRAP tak ve výsledku poukazuje hlavně na schopnost látek redukovat železité ionty a s celkovou antioxidační aktivitou vzorku nemusí mít ani pozitivní souvztažnost [26, 27].

7.2.2 Cyklická voltametrie

Redoxní vlastnosti sloučenin je možno hodnotit i přes elektrochemické metody. Jednou z nich je cyklická voltametrie, která indikuje látky se schopností odštěpovat elektrony. Na pracovní elektrodu je vkládán potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a zároveň se sledují proudové odezvy v roztoku analyzované látky. Získaný záznam následně na to zachycuje křivka v podobě cyklického voltamogramu. Vyhodnocení redukční schopnosti látek se provádí dvěma různými parametry. Prvním je potenciál anodického oxidačního píku E_A a druhý parametr tvoří jeho anodický proud I_A . Čím je nižší hodnota E_A , tím látka snadněji odevzdává elektrony a může být lepším antioxidantem. Z hodnoty výšky proudu anodického píku I_A je možné určit koncentraci látek. Cyklická voltametrie je vhodná pro získání informace, zda je látka schopna snadno odevzdávat elektrony a poté je možné zvolit určitou metodu na stanovení antioxidační kapacity. Je prokázáno, že v řadě případů hodnoty E_A korelují s antioxidační aktivitou látek určenou jinými metodami, např. s lipoperoxidací, DPPH.

7.2.3 HPLC s elektrochemickou detekcí

Elektroaktivní látky je možno velmi přesně a citlivě detekovat použitím amperometrických nebo coulochemických detektorů při analýze HPLC (HPLC-ECD). Při HPLC-ECD se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Pík látky se projeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Látku je tak možno charakterizovat nejen retenčním časem, ale také potenciálem, při kterém se oxiduje.

To umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu. Při analýze neruší zbarvení směsi, ale je nutné dodržet vysokou čistotu činidel v mobilní fázi (včetně snížení koncentrace stopových prvků). Hodnocení antioxidačních vlastností látek pomocí HPLC-ECD koreluje s různými jinými metodami na testování celkové antioxidační aktivity látek, např. s metodou DPPH ^[27].

8 ZÁVĚR

Hlavním úkolem této bakalářské práce bylo objasnit co to jsou antioxidační vlastnosti sýrů, vysvětlit a uvést co je zdrojem těchto vlastností a jaké jsou možné důsledky mléčných antioxidantů.

Sýry za svou oblibu mezi konzumenty vděčí nejen svoji rozmanitosti, ale i svému bohatému nutričnímu složení, zejména vysokému obsahu bílkovin. Denní příjem těchto výrobků napomáhá v boji proti škodlivým radikálům a zároveň obohacuje jídelníček o vitamíny. Za kvalitu sýrů odpovídá jednak kontrolovaný proces výroby a jednak původ suroviny, ze kterého pocházejí, tedy mléka. Některé antioxidanty se v mléce vyskytují zcela přirozeně, jiné svůj původ nalézají v krmných směsích při spásání dobytka. Celkový obsah antioxidačních látek v sýrech je následně odrazem způsobu krmení a chovu zvířat, ze kterých mléko pochází.

Přes hlavní metody stanovení TEAC a DPPH bylo zjištěno, že roční období ovlivňuje celkový obsah fenolických sloučenin v rostlinách, které jsou spásány přežvýkavci pohybující se ve volném prostoru. Byl také potvrzen nárůst sekundárních metabolitů v rostlinách podléhajících suchému období, kdy sucho v tomto případě představuje stresový faktor. Tento fakt se následně promítne na metabolické odezvě organismu, která se zvyšuje, pokud má organismus nedostatečný příjem vody. Výsledkem je zvýšení obsahu fenolů konzumovaných zvířaty z volného chovu v průběhu suchého období. Významný rozdíl se našel i v antioxidační aktivitě, kdy většina vzorků odebírána metodou FRAP, vykazovala v tomto období nejvíce antioxidační schopnosti. Nejvýrazněji se tak stalo v kozím mléce a z něj vyrobené syrovátce, jež vyniká solidním obsahem komplexu vitamínů B a minerálů jako je třeba hořčík, fosfor nebo vápník. Zjednodušeně se dá říci, že antioxidační vlastnosti sýrů jsou tedy víceméně závislé na životních podmínkách zvířat, ze kterých pochází původní surovina, a tou je mléko. Antioxidanty mléčného tuku jsou obecně zodpovědné za udržování oxidační stability v lidském těle, čímž se ukazuje že pravidelnější spotřeba sýrů napomáhá prevenci před řadou civilizačních chorob. Výhodou některých typů sýrů je obsah probiotických bakterií, které se starají o zkvalitnění mikroflóry ve střevech a zlepšují zažívání.

Jakožto pravidelný konzument sýrů mohu říci, že mi tento produkt skvěle doplňuje hlídané hodnoty bílkovin a tuků, zejména ve večerních hodinách, kdy tělo vyžaduje méně sacharidů a více proteinových složek. Jejich konzumace má velký význam jak u řady sportovců, tak u těch, co se sportu nevěnují. Určitě tedy doporučuji zařadit sýry a vůbec mléčné výrobky do jídelníčku všem lidem věkových kategorií.

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. LINDMARK-MÅNSSON, H., ÅKESSON, B. (2000) Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*. 84 (S1), 103-110. DOI: 10.1017/S0007114500002324.
2. CICHOSZ, G., CZECZOT, H. (2017). Natural antioxidants in milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology*. 70 (2), 165-178. DOI: 10.1111/1471-0307.12359.
3. ŠUSTOVÁ, K. Nutriční aspekty konzumace sýrů. *Mlékařské listy*.
4. ČESKO, Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.
5. VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. (2009). *Chemie potravin II., 3. vydání*, Tábor: Osis, 100-101 s., ISBN: 978-80-86659-16-9.
6. KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M. (2012). *Přehled tradičních potravinářských výrob: Technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 279-286; 291-292 s., ISBN: 978-8-7418-145-0.
7. VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. (2009). *Chemie potravin I., 3. vydání*, Tábor: Osis, 158-160; 183-184 s., ISBN: 978-80-86659-15-2
8. MEDRANO, J. F., AGUILAR-CORDOVA, E. (1990). Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Bio/Technology* 8, 144-146
9. SHAHIDI, F. (2015). *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Cambridge: Elsevier, 134,262,304 s., ISBN: 978-1-7842-097-2.
10. ROUBÍK, L. (2018). *Moderní výživa ve fitness a silových sportech*. Praha: Erasport. 313 s. ISBN 9788090568556.
11. KHAN, I. T., NADEEM, M. (2019). Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease*. DOI: 10.1186/s12944-019-0969-8
12. SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J., PARDOS, S. C. (2000). CLA ¿Antioxidante o prooxidante? *Grasas y Aceites*. 51, 268-269 s. ISSN: 1988-4214
13. TALBOT-WALSH, G., KANNAR, D., SELOMULYA, C. (2018). A review on technological parameters and recent advances in the fortification of processed cheese. *Trends in Food Science and Technology*. 81, 197-200. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.09.023
14. ARDNT, T. (2013). Prebiotika, probiotika, symbiotika... [citováno 17.6.2019]. Dostupné na <https://www.celostnimediceina.cz/prebiotika-probiotika-symbiotika.htm>
15. BOSWORTH, B., LANDZBERG B. (2007) Neurological manifestations of gastrointestinal and hepatic diseases. *Neurobiology of Disease*. 14: 487. DOI: 10.1016/B978-012088592-3/50065-7.
16. GANESAN, B., WEIMER, B. (2014). Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. *Journal of Applied Mikrobiology*. 116 (6), 1642-1656. DOI: 10.1111/jam.12482.

17. IGHODARO, O. M., AKINLOYE, O. A. (2019). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 54 (4), 287-293. DOI: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
18. ORTAKCI, F., BROADBENT, J. R., (2012). Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. *Journal of Dairy Science*. 95 (11), 6274-6281. DOI: 10.3168/jds.2012-5476.
19. VILÍMOVSKÝ, M. (2018). Jaká jsou nejlepší probiotika? Zkuste tyto potraviny! [citováno 17.6.2019]. Dostupné na <https://cs.medlicker.com/1238-potraviny-s-probiotiky>
20. HILARIO, M.C, PUGA, C.D., OCANA, A.N., ROMO, F.P. (2010). Antioxidant activity, bioactive polyphenols in Mexican goats' milk cheeses on summer grazing. *Journal of Dairy Research*. 77, 20–26
21. CHÁVEZ-SERVÍN, J. L., ANDRADE-MONTEMAYOR, H. M., VELÁZQUEZ VÁZQUEZ, C. (2018). Effects of feeding system, heat treatment and season on phenolic compounds and antioxidant capacity in goat milk, whey and cheese. *Small Ruminant Research*. 160, 54-58.
22. BHAT, Z.F.; BHAT, H. (2011). Milk and dairy products as functional foods. A review. *International journal of Dairy Science*. 6, 1-12. DOI: 10.3923/ijds.2011.1.12.
23. BOLIGON, A. (2014). Technical evaluation of antioxidant activity. *Medicinal Chemistry*. 4 (7), 517-522. DOI: 10.4172/2161-0444.1000188. ISSN 21610444.
24. ALAM, M. N., BRISTI, N. J. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21 (2), 143-152. DOI: 10.1016/j.jsps.2012.05.002.
25. BECKER, M., NUNES, G., RIBEIRO, D. (2019). Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 30 (5), 1108-1114. DOI: 10.21577/0103-5053.20190003.
26. ŠULC, M., LACHMAN, J. (2007). Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy*. 101, 584-591.
27. PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E. (2004). In vitro methods for estimation of the antioxidant activity of natural compounds. *Chemické listy*. 98, 174-179.