

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Vliv biologických faktorů na zastoupení mastných kyselin mléčného tuku
(The effect of biological factors on fatty acid composition of milk fat)**

ČESKÉ BUDĚJOVICE

2018

Autor: Ing. ROBERT KALA

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat

Školící pracoviště: Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů

Vedoucí školitel: doc. Ing. EVA SAMKOVÁ, Ph.D.

Pracoviště: Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů, ZF, JU

Školitel specialista: prof. Ing. JINDŘICH ČÍTEK, CSc.

Pracoviště: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné, ZF, JU

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí školitelce paní *doc. Ing. EVĚ SAMKOVÉ, Ph.D.* za vstřícnost, odborné vedení a cenné rady nejen při zpracování disertační práce, ale během celého studia.

Rovněž bych rád poděkoval školiteli specialistovi *prof. Ing. JINDŘICHU ČÍTKOVI, CSc.* za odborné rady při zpracování této práce.

Dále bych rád poděkoval *MVDr. LUCII HASONOVÉ, Ph.D.* za užitečné rady při zpracování disertační práce a přípravě odborných publikací.

Poděkování patří také všem spoluautorům odborných publikací.

V neposlední řadě bych rád poděkoval kolektivu *Katedry potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů* za spolupráci a příjemné pracovní prostředí během celého doktorského studia.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně podle pokynů vedoucích práce a za použití uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejichwebových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací *Theses.cz* provozovanou *Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů*.

.....
Ing. ROBERT KALA

V Českých Budějovicích dne

Seznam zkratek

| | | |
|-------|---|---|
| BTA | - | <i>Bos taurus</i> ; tur domácí |
| CLA | - | <i>conjugated linoleic acid</i> ; konjugovaná linolová kyselina |
| CVD | - | <i>cardiovascular disease</i> ; kardiovaskulární onemocnění |
| DGAT1 | - | <i>diacylglycerol acyltransferase 1</i> ; diacylglycerol acyltransferáza 1 |
| FA | - | <i>fatty acids</i> ; mastné kyseliny |
| LCFA | - | <i>long-chain fatty acids</i> ; mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, uhlíkový řetězec se 14 až 20 atomy uhlíku |
| MCFA | - | <i>middle-chain fatty acids</i> ; mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem, uhlíkový řetězec se 6 až 12 atomy uhlíku |
| MUFA | - | <i>monounsaturated fatty acids</i> ; mononenasyčené mastné kyseliny, s jednou dvojnou vazbou |
| PUFA | - | <i>polyunsaturated fatty acids</i> ; polynenasycené mastné kyseliny, s více dvojnými vazbami |
| QTL | - | <i>quantitative trait loci</i> ; lokusy kvantitativních znaků |
| SCD1 | - | <i>stearoyl-CoA desaturase 1</i> ; stearoyl-CoA desaturáza 1 |
| SCFA | - | <i>short-chain fatty acids</i> ; mastné kyseliny s krátkým řetězcem, uhlíkový řetězec s méně než 6 uhlíky |
| SFA | - | <i>saturated fatty acids</i> ; nasycené mastné kyseliny |
| SNP | - | <i>single nucleotide polymorphism</i> ; jednonukleotidový polymorfismus |
| TAG | - | <i>triacylglycerols</i> ; triacylglyceroly |
| TFA | - | <i>trans fatty acids</i> ; <i>trans</i> mastné kyseliny |

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam zkratk | 5 |
| Obsah | 6 |
| 1. Úvod | 8 |
| 2. Literární přehled | 9 |
| 2.1 Charakteristika mléčného tuku a mastných kyselin | 9 |
| 2.2 Význam mléčného tuku a mastných kyselin z technologického hlediska | 11 |
| 2.3 Význam mastných kyselin z nutričního hlediska | 14 |
| 2.4 Faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin mléčného tuku | 16 |
| 2.4.1 Vliv výživy | 17 |
| 2.4.2 Vliv biologických faktorů | 18 |
| 2.4.3 Genetické aspekty syntézy mléčného tuku | 19 |
| 2.4.3.1 <i>DGATI</i> | 23 |
| 2.4.3.2 <i>SCD1</i> | 24 |
| 2.5 Metody stanovení mastných kyselin a genotypizace | 24 |
| 2.5.1 Stanovení mastných kyselin | 24 |
| 2.5.2 Genotypizace vybraných genů metodou polymerázové řetězové reakce s následnou analýzou polymorfismu délky restrikčních fragmentů | 29 |
| 3. Cíl práce | 32 |
| 4. Materiál a metodika | 34 |
| 5. Výsledky a diskuze | 35 |
| 5.1 Faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin mléčného tuku | 35 |
| 5.1.1 Publikace vztahující se k danému tématu (viz kapitola 12. Přílohy) | 35 |
| 5.1.2 Komentář k problematice | 35 |
| 5.2 Polymorfismus genů souvisejících s obsahem a složením mléčného tuku | 40 |
| 5.2.1 Publikace vztahující se k danému tématu (viz kapitola 12. Přílohy) | 40 |
| 5.2.2 Komentář k problematice | 40 |
| 5.3 Metody stanovení mastných kyselin mléčného tuku | 46 |
| 5.3.1 Publikace vztahující se k danému tématu (viz kapitola 12. Přílohy) | 46 |
| 5.3.2 Komentář k problematice | 46 |
| 6. Závěry | 50 |
| 7. Souhrn | 52 |

| | | |
|------|---|----|
| 8. | Summary..... | 53 |
| 9. | Literatura | 54 |
| 10. | Seznam tabulek, grafů a obrázků..... | 75 |
| 11. | Prohlášení spoluautorů | 77 |
| 12. | Přílohy | 78 |
| 12.1 | Publikace ve vědeckém časopise s IF..... | 78 |
| 12.2 | Publikace ve vědeckých recenzovaných časopisech | 78 |
| 12.3 | Aplikované výsledky | 82 |

1. Úvod

Mléko má nezastupitelnou úlohu v lidské výživě. V podmínkách České republiky je konzumováno především mléko kravské, které je zdrojem plnohodnotných a dobře stravitelných bílkovin, vitaminů, dobře vstřebatelného vápníku a dalších bioaktivních látek.

Mléčný tuk přežvýkavců, a tedy i dojnic, je svým charakterem tukem nasyceným. Je to způsobeno vyšším zastoupením nasycených mastných kyselin, které jsou ze zdravotního hlediska hodnoceny méně příznivě. Nenasycené mastné kyseliny jsou naopak ze zdravotního hlediska hodnoceny příznivěji. Jejich zvýšení má kromě nutričního hlediska také význam z hlediska technologického (např. lepší roztíratelnost másla).

Změn v zastoupení nenasycených mastných kyselin lze dosáhnout především krmnou dávkou (např. přidávkem olejnatých semen nebo zvýšením podílu čerstvé píče). Další možností je modifikace mléčného tuku využitím znalostí genetické variability.

Cílem disertační práce bylo vyhodnocení vlivu biologických faktorů (plemeno, individualita, pořadí a stádium laktace, výskyt polymorfismu v lokusech souvisejících s mléčným tukem) na změny spektra mastných kyselin mléčného tuku u vybraných plemen skotu (český strakatý a holštýnský), na jehož základě by bylo možné navrhnout praktické postupy k pozitivní modifikaci mléčného tuku – zvýšení obsahu nutričně prospěšných mastných kyselin.

2. Literární přehled

2.1 Charakteristika mléčného tuku a mastných kyselin

Obecně lze lipidy definovat jako sloučeniny mastných kyselin (FA, *fatty acids*) s alkoholy, které jsou vzájemně spojeny esterovou vazbou -CO-O-. Podle názvosloví užívaného v organické chemii se jako FA označují karboxylové kyseliny s více než třemi atomy uhlíku s alifatickým (otevřeným – přímým nebo rozvětveným) uhlíkovým řetězcem, zakončené na jednom konci methylovou (-CH₃), na druhém karboxylovou (-COOH) skupinou (Velíšek a Hajšlová, 2009).

FA jsou obvykle v počtu tří FA vázány na glycerol. Tyto triacylglyceroly (TAG, *triglycerides*) jsou hlavní složkou mléčného tuku a představují okolo 97-98 % z celkového obsahu lipidů (Vieitez *a kol.*, 2016). Ostatní mléčné lipidy jsou diacylglyceroly vzniklé navázáním dvou FA – 1,2-diacylglyceroly nebo 1,3-diacylglyceroly (cca 2 % lipidových frakcí), fosfolipidy (cca 1 %), volné FA (FFA, *free fatty acids*), které tvoří méně než 0,5 % a cholesterol (méně než 0,5 %), který se řadí do tzv. doprovodných látek lipidů, podobně jako karotenoidy nebo vitaminy rozpustné v tucích (Jensen, 1995).

Teplota tání FA se zvyšuje s délkou uhlíkového řetězce (počtem uhlíků). Tato vlastnost se dle Tvrzické *a kol.* (2011) odráží také ve sloučeninách, kde FA představují důležitou složku, např. fosfolipidy nebo TAG. Autoři dále uvádějí, že za fyziologických podmínek jsou dvojně vazby v *cis* konfiguraci, která způsobuje 30° vychýlení uhlíkového řetězce. Toto vychýlení vede k většímu rozprostření v prostoru *cis* nenasyceného řetězce a snížení van der Waalsových interakcí, následkem čehož dochází i ke snížení bodu tání (Gunstone, 1994).

FA jsou nejčastěji rozdělovány na nasycené FA (SFA, *saturated fatty acids*), mononenasycené FA (MUFA, *monounsaturated fatty acids*), polynenasycené FA (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*) a málo se vyskytující FA s trojnými vazbami, cyklické, s kyslíkatými, sirnými nebo dusíkatými funkčními skupinami. FA jsou dále rozlišovány podle délky uhlíkového řetězce, a to na FA s krátkým řetězcem (SCFA, *short-chain fatty acids*), FA se středně dlouhým řetězcem (MCFA, *middle-chain fatty acids*) a FA s dlouhým řetězcem (LCFA, *long-chain fatty acids*).

FA lze díky jejich charakteristikám (*Tabulka 1*) použít jako markery, např. pro autentifikaci mléčných výrobků. Tyto charakteristiky se označují jako profil (nebo fingerprint) FA lipidů (Bittante a Cecchinato, 2013).

Tabulka 1 Vybrané strukturní charakteristiky mastných kyselin.

| Charakteristika | Skupiny |
|---|----------------------|
| délka řetězce | SCFA, MCFA, LCFA |
| nenasycenost (přítomnost dvojně vazby) | SFA, UFA |
| počet dvojných vazeb | MUFA, PUFA |
| funkční skupiny | hydroxy, epoxy apod. |
| poloha/y nenasyčených vazeb v uhlíkovém řetězci | |
| poloha/y funkčních skupin v uhlíkovém řetězci | |
| stereochemie ¹ | |

¹prostorové uspořádání atomů v molekulách, jeho vliv na vlastnosti molekul a průběh chemických reakcí; SCFA – *short-chain fatty acids*, MCFA – *middle-chain fatty acids*, LCFA – *long-chain fatty acids*, SFA – *saturated fatty acids*, UFA – *unsaturated fatty acids*, MUFA – *monounsaturated fatty acids*, PUFA – *polyunsaturated fatty acids*;

Zdroj: upraveno dle Spitzera (1997)

SFA jsou tvořeny dlouhými přímými řetězci, v nichž jsou obsaženy atomy převážně o sudém počtu uhlíků (od 4 do 60 atomů). V řetězci MUFA je navíc obsažena jedna dvojná vazba. Jednotlivé FA jsou od sebe odlišovány polohou a konfigurací dvojně vazby (*Tabulka 2*). Mezi PUFA patří FA dienové se dvěma dvojnými vazbami, trienové se třemi dvojnými vazbami, dále tetraenové (4 dvojně vazby), pentaenové (5 dvojných vazeb) až hexaenové (6 dvojných vazeb). Stejně jako u MUFA jsou i v této skupině polohové a prostorové izomery. Navíc se PUFA rozlišují podle polohy první dvojně vazby od methylové skupiny na n-6 (ω -6) a n-3 (ω -3) FA. *Trans* FA (TFA, *trans fatty acids*), přesněji *trans* izomery nenasyčených FA jsou mastné kyseliny, které mají alespoň jednu dvojnou vazbu v *trans* konfiguraci. Zvláštní význam mají FA s konjugovanými dvojnými vazbami (dvojně vazby jsou odděleny jednou vazbou jednoduchou), které se svou reaktivitou podstatně liší od FA s izolovanými dvojnými vazbami (mezi dvojnými vazbami se nachází dvě a více jednoduchých vazeb) a mají také odlišné fyziologické účinky (Velíšek a Hajšlová, 2009). Jako příklad lze uvést izomery konjugované kyseliny linolové (CLA, *conjugated linoleic acid*). Polohové a geometrické izomery CLA (C18:2n9c11t a C18:2n10t12c) vznikají přirozeně jako meziproducty při biohydrogenaci FA z krmné dávky (tj. z C18:2n6c a C18:3n3c) prostřednictvím

mikroorganismů v bacheru. V mléčném tuku je zastoupen především izomer C18:2n9c11t, který je nazýván rumenová kyselina (RA, *rumenic acid*).

Tabulka 2 Názvosloví hlavních mastných kyselin mléčného tuku.

| Triviální název | Počet atomů uhlíku | Poloha dvojných vazeb | Konfigurace dvojných vazeb | Sumární vzorec |
|-----------------------------|--------------------|-----------------------|----------------------------|----------------|
| nasycené | | | | |
| máselná | 4 | - | - | C4:0 |
| kapronová | 6 | - | - | C6:0 |
| kaprylová | 8 | - | - | C8:0 |
| kaprinová | 10 | - | - | C10:0 |
| laurová | 12 | - | - | C12:0 |
| myristová | 14 | - | - | C14:0 |
| palmitová | 16 | - | - | C16:0 |
| stearová | 18 | - | - | C18:0 |
| arachová | 20 | - | - | C20:0 |
| nenasycené monoenové | | | | |
| olejová | 18 | 9 | <i>cis</i> | C18:1n9c |
| trans-monoenové | | | | |
| palmitelaidová | 16 | 9 | <i>trans</i> | C16:1t |
| petroselaidová | 18 | 6 | <i>trans</i> | C18:1n6t |
| elaidová | 18 | 9 | <i>trans</i> | C18:1n9t |
| vakcenová (VA) | 18 | 11 | <i>trans</i> | C18:1n11t |
| cetelaidová | 22 | 11 | <i>trans</i> | C22:1n11t |
| brassidová | 22 | 13 | <i>trans</i> | C22:1n13t |
| nenasycené polyenové | | | | |
| rumenová (RA) | 18 | 9, 11 | <i>cis, trans</i> | C18:2n7c,t |
| n-6 | | | | |
| linolová (LA) | 18 | 9, 12 | <i>cis, cis</i> | C18:2n6c |
| γ-linolenová (GLA) | 18 | 6, 9, 12 | <i>all-cis</i> | C18:3n6c |
| arachidonová | 20 | 5, 8, 11, 14 | <i>all-cis</i> | C20:4n6c |
| n-3 | | | | |
| α-linolenová (ALA) | 18 | 9, 12, 15 | <i>all-cis</i> | C18:3n3c |
| timnodonová (EPA) | 20 | 5, 8, 11, 14, 17 | <i>all-cis</i> | C20:5n3c |
| cervonová (DHA) | 22 | 4, 7, 10, 13, 16, 19 | <i>all-cis</i> | C22:6n3c |

Zdroj: upraveno dle Velíška a Hajšlové (2009)

2.2 Význam mléčného tuku a mastných kyselin z technologického hlediska

Mléko je složitý disperzní systém s několika typy disperzních soustav, přičemž mléčný tuk je v mléce obsažen ve formě emulze (typ olej ve vodě). Stav disperze mléčného tuku má vliv na optické, reologické a technologické parametry

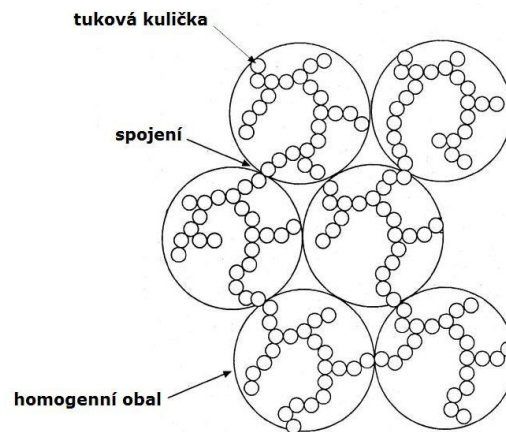
mléka jako jsou barva, viskozita, vodivost, rychlost separace, stabilita emulze a vhodnost pro výrobu různých mléčných produktů (Barłowska *a kol.*, 2011).

Jednou z neodmyslitelných vlastností kravského mléka je vyvstávání mléčného tuku, které je spolu s koncentrací aglutininů určující k jeho rozptýlení. Aglutininy jsou látky, které podobně jako protilátky či lektiny (bílkoviny především rostlinného původu jsou schopné vázat určité struktury obsahující cukr – glykoproteiny, polysacharidy), způsobují shlukování buněk nebo bakterií (Vokurka a Hugo, 2015). Pokud je kravské mléko ponecháno delší dobu v klidu, většina mléčného tuku vyvstane na povrch, především z důvodu odlišné měrné hmotnosti mléčného tuku v porovnání s mléčnou plazmou. Dalšími faktory, které vyvstávání ovlivňují, jsou velikost tukových kuliček a přítomnost nativních proteinů – imunoglobulinů M (IgM), které se vysráží na povrchu ochlazovaných tukových kuliček. IgM jsou díky této vlastnosti nazývány kryoglobuliny. Velké tukové kuličky vyvstávají zvýšenou rychlostí a při shlukování mohou vytvářet agregáty. Celý proces je katalyzován kryoglobulinem (Fox, 2003).

Tukové kuličky mají dále vliv na složení mléčného tuku. Couvreur a Hurtaud (2017) zkoumali charakteristiku tukových kuliček (průměr, povrch membrány) a zjistili souvislost s ukazateli mléčné užitkovosti (obsah tuku – %, poměr tuku a bílkovin) a zastoupením FA (PUFA).

Brownův pohyb (náhodný pohyb mikroskopických částic v kapalném nebo plynném médiu) a van der Waalovy síly způsobují, že tukové kuličky suspendované v kapalném tuku se shlukují do trojrozměrných (3D) sítí (**Obrázek 1**), které jsou spojené s kontinuální olejovou fází (de Man and Beers, 1987; Ribeiro *a kol.*, 2009). Shluky mají pravidelný a homogenní obal, který je největším konstrukčním prvkem 3D sítě. Tvar a seskupení tukových kuliček ovlivňuje velikost van der Waalových sil v sítích. Jelikož tukové kuličky nemají stejnou velikost, nemají ani stejné přitažlivé síly.

Obrázek 1 Model 3D sítě tukových kuliček.



Zdroj: upraveno dle Wright *a kol.* (2001)

Tukové kuličky mléka jsou obklopeny membránou, která je tvořena při sekreci tukových kuliček z epiteliálních buněk mléčné žlázy (Lopez *a kol.*, 2008). Membrána kuliček mléčného tuku (MFGM, *milk fat globule membrane*) je bohatá na bílkoviny, glykoproteiny, glycerofosfolipidy, sfingolipidy (zejména sfingomyelin), cholesterol, enzymy a další složky (Jensen, 1995). Fyzikálně-chemické vlastnosti MFGM mají zásadní význam pro stabilitu tukových kuliček v mléce a rovněž působí jako bariéra proti hydrolýze TAG lipolytickými enzymy. Fosfolipidy obsažené v MFGM pak mají emulgační účinky a rovněž vykazují antioxidační aktivitu (Hamzawi, 1990).

Střední průměr tukové kuličky v kravském mléce činí 3,5 μm (s rozsahem 0,9 až 15,8 μm) – Attaie a Richter (2000). Okolo 90 % z celkového obsahu tukových kuliček v kravském mléce má průměr menší než 6,4 μm a zaujímá plochu 17 $\text{cm}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$. Velikost tukových kuliček ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti sýrů (Michalski *a kol.*, 2004). Goudédranche *a kol.* (2000) dále uvádějí, že mléko s menšími tukovými kuličkami je vhodné pro výrobu všech mléčných produktů, kromě másla. Máslo vyrobené z mléka (resp. smetany) s většími tukovými kuličkami má sytější žlutou barvu, měkčí konzistenci (obsahuje více UFA) a lépe se roztírá (Barłowska *a kol.*, 2011). MFGM velkých tukových kuliček jsou navíc snadněji destabilizovatelné, což přispívá k rychlejšímu procesu stloukání. Naopak máslo z mléka s větším podílem menších tukových kuliček je dle Barłowske *a kol.* (2011) charakterizováno zvýšenou koncentrací adsorbované vody a bílkovin, což je nežádoucí, protože je zvyšována pravděpodobnost žluknutí.

Vlastnosti másla, jako je např. textura, jsou mj. ovlivněny zastoupením FA. Vyšší poměr SFA zapříčiňuje při nižších teplotách špatnou roztíratelnost (Ashes *a kol.*, 1997). Naopak zvýšení podílu UFA v mléce umožňuje výrobu másla s lepší roztíratelností. Bobe *a kol.* (2007) uvádějí, že lepší roztíratelnosti může být dosaženo změnou výživy či záměrnou selekcí dojnic. Tyto postupy zároveň umožňují zachovat přirozenou jemnou chuť másla (Hillbrick a Augustin, 2002). Změn vedoucích ke zlepšení roztíratelnosti lze dosáhnout také při výrobě másla, buď frakcionací mléčného tuku (Henning *a kol.*, 2006) nebo dle Wrighta *a kol.* (2001) interesterifikací (chemickou nebo enzymatickou).

Významnou technologickou vlastností je také oxidační stabilita. Ta může být ovlivněna strukturními charakteristikami (počet, konfigurace a pozice dvojných vazeb v řetězci) UFA zastoupených v mléčném tuku (Collomb a Spahni, 1996). FA v *trans* konfiguraci jsou dle autorů méně náchylné k oxidaci než FA v *cis* konfiguraci. Kołakowska (2002) a Rafałowski *a kol.* (2014) dále uvádějí, že FA v pozici sn-2 na skeletu glycerolu jsou méně náchylné k oxidaci než FA v pozici sn-1 či sn-3.

2.3 Význam mastných kyselin z nutričního hlediska

Lipidy a FA mají na buněčné úrovni mnoho funkcí, např. jsou nezbytné pro syntézu membrán, lipoproteinů a glykolipidů nebo pro tvorbu různých strukturních elementů (např. vezikul) v buňkách a tkáních (German a Dillard, 2010). Dále se podílejí na rozpouštění řady nepolárních či špatně rozpustných intracelulárních a extracelulárních složek a zajišťují transport molekul ve vnitrobuněčném prostředí a mezi buňkami, resp. tkáněmi.

Obecná výživová doporučení pro příjem makronutrientů vedoucí ke zlepšení celkového zdraví obyvatelstva jsou zaměřena především na snížení obsahu cholesterolu, SFA a TFA ve stravě (Společnost pro výživu, 2012). Cílená změna složení mléčného tuku přežvýkavců snížením C12:0, C14:0 a C16:0 a naopak zvýšením C18:1n9c a C18:2n9c11t je dle Shingfielda *a kol.* (2013) s ohledem na možné přínosy pro lidské zdraví výhodná.

Hulshof *a kol.* (1999) uvádějí, že mléko a mléčné produkty jsou pro evropskou populaci hlavním zdrojem SFA. Naopak UFA obsažené v mléčném tuku přežvýkavců (např. C18:1n9c, některé izomery CLA či ALA), mohou být pro lidské zdraví prospěšné a působit preventivně proti některým chorobám (Bauman *a kol.*, 2006). Například bylo prokázáno preventivní působení n-3 FA v případě kardiovaskulárních onemocnění (CVD, *cardiovascular diseases*; Baum a Hamm, 2012) či při snížení výskytu rakoviny prsu a prostaty (Stephenson *a kol.*, 2013). CVD jsou ve vyspělých zemích jednou z hlavních příčin úmrtí a jsou spojovány především s nevhodným životním stylem (nesprávná výživa, obezita, stres apod.) a s dalšími chronickými chorobami (např. diabetes mellitus).

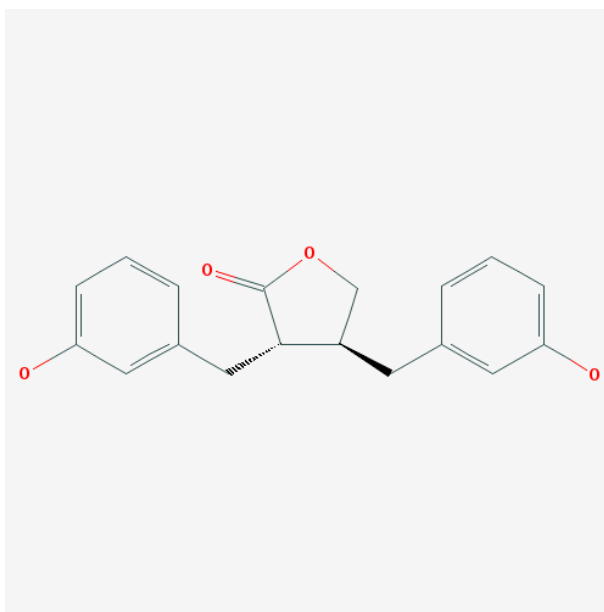
Omezením příjmu cholesterolu a SFA snížením konzumace živočišných produktů (včetně mléčných produktů) by mohlo vést dle Siurany a Calsamiglie (2016) ke snížení výskytu CVD. Oproti tomu jiné epidemiologické studie (např. Gibson *a kol.*, 2009) nezjistily přímou spojitost mezi příjmem SFA, cholesterolem, rozvojem aterosklerotických změn a CVD. Elwood *a kol.* (2010) provedli celkem 11 prospektivních epidemiologických studií zaměřených na různé faktory (index tělesné hmotnosti, konzumace alkoholu, kouření, pravidelné cvičení), ze kterých vyplynulo, že konzumace mléka a mléčných produktů naopak výskyt CVD snižuje.

Protektivní vlastnosti mléka v souvislosti s CVD jsou spojovány mj. s obsahem CLA. Studie provedené na zvířatech (hlodavcích) potvrdily pozitivní účinky CLA spočívající v inhibici karcinogeneze, ve snížení rozvoje aterosklerózy, hypocholesterolemických účincích apod. (Pariza *a kol.*, 2001). Nicméně epidemiologické studie provedené u lidí nejsou jednoznačné a použitá metodika je v jejich případě mnohdy sporná (Whigham *a kol.*, 2007). Tetens (2010) dospěl k závěru, že konzumace ekvimolární směsi izomerů C18:2n9c11t a C18:2n10t12c nemá žádný vliv na udržení nebo dosažení optimální tělesné hmotnosti, zvýšení citlivosti na inzulin nebo ochranu DNA, proteinů a lipidů před oxidačním poškozením.

I přes některé negativní závěry související se zdravotním významem CLA mají producenti mléčných produktů stále snahu uvádět na trh produkty obohacené o CLA, a proto i nadále přetrvává zájem o studium faktorů, které by CLA v mléčném tuku zvyšovaly. Nutriční hodnotu živočišných produktů lze pozitivně ovlivnit také zvýšením skupiny PUFA, zejména n-3 (Kouba a Mourot, 2011). Petit (2002) ve své

studii uvádí, že přídavek lněného semena bohatého na ALA do krmné dávky (KD) snižuje podíl SCFA a MCFA a naopak zvyšuje obsah PUFA. Přídavek lněného semena má navíc kromě změny zastoupení FA také další pozitivní účinky – je přirozeným zdrojem rostlinných lignanů (např. matairesinol; reg. č. CAS 580-72-3), které jsou považovány za zdroj antioxidantů. Mikrobiota v bachoru dojníc dokáže přeměnit tyto rostlinné lignany na tzv. „savčí lignany“ (terminus technicus), tedy produkty metabolismu rostlinných lignanů (Kasper, 2014). Mezi savčí lignany je řazen např. enterolakton (reg. č. CAS 78473-71-9), který je postupně vstřebáván a lze ho nalézt v moči, krvi a také mléce (Gagnon *a kol.*, 2009). Enterolakton má dle Prasada (2000) dokonce vyšší antioxidační aktivitu než vitamin E. **Obrázek 2** znázorňuje chemickou strukturu enterolaktonu.

Obrázek 2 Chemická struktura enterolaktonu (hydroperoxy methyl-formiát).



Zdroj: NCBI – National Center for Biotechnology Information (2010)

2.4 Faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin mléčného tuku

Změny jak v obsahu mléčného tuku, tak i v jeho složení, ovlivňuje množství různých faktorů. Mechanismus působení těchto faktorů je důležité znát s ohledem na potřeby modifikace profilu FA. Snahy o změny v zastoupení FA jsou nejčastěji vyvolané v důsledku zdravotních účinků jednotlivých FA (Haug *a kol.*, 2007), ale

příčinou může být i ovlivnění technologických (Barłowska *a kol.*, 2011) či senzorických (Chilliard a Ferlay, 2004) vlastností mléčného tuku.

2.4.1 Vliv výživy

Výživa je bezesporu velmi významným faktorem, který ovlivňuje zastoupení FA mléčného tuku. V našich podmínkách jsou základem KD pro dojnice objemná krmiva (pastva, čerstvá píče, konzervované krmivo – senáže a siláže) a jadrná krmiva (obiloviny a luštěniny). Pastva je tvořena smíšenou vegetací různých druhů rostlin o různém podílu, např. traviny (čeleď lipnicovité), luskoviny (čeleď bobovité) a rostliny z dalších čeledí (např. hvězdnicovité či růžovité) s variabilním zastoupením FA (Kalač a Samková, 2010). Elgersma *a kol.* (2006) charakterizují pastvu jako čerstvou píči obsahující 1-3 % FA (50-75 % těchto FA tvoří ALA), s nejvyššími hodnotami během jara a na podzim. Konzervovaná krmiva jsou v některých chovech jediným předkládaným objemným krmivem nebo jsou využívány pouze v období vegetačního klidu (zimní období).

Kukuřičná siláž je jedním z hlavních energeticky bohatých krmiv pro dojnice v intenzivních produkčních systémech. Je bohatá na C18:1n9c a LA, a naopak chudá na ALA (Ferlay *a kol.*, 2006). Využívanými zdroji bílkovin jsou dle AbuGhazaleha *a kol.* (2007) především luskoviny (vojtěška, jetel apod.), které zvyšují obsah zejména n-3 FA. Roy *a kol.* (2006) uvádějí, že KD založená na kukuřičné siláži snižuje např. obsah FA s rozvětveným řetězcem (BCFA, *branched-chain fatty acids*) a naopak zvyšuje zastoupení LA a CLA (C18:2n9c11t a C18:2n10t12c).

Obsah CLA izomerů lze rovněž zvýšit doplněním KD o semena olejnin nebo rostlinné oleje obohacené o LA (Dhiman *a kol.*, 2005). Další možností je ochrana CLA izomerů před biohydrogenací v bacheru buď aplikací syntetické směsi izomerů nálevem přímo do slezu (Chouinard *a kol.*, 1999; Shingfield *a kol.*, 2010), nebo aplikací izomerů ve formě monofosfátu ionoforu do KD (Dhiman *a kol.*, 1999). Změny ve strategii krmení dojnic obvykle mění v různé intenzitě zastoupení jednotlivých FA i jejich skupin, jak uvádí **Tabulka 3**.

Tabulka 3 Strategie krmení a její vliv na zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku dojnic.

| FA | Strategie | Výsledek ¹ |
|---------------------------|---|-------------------------|
| C4:0-C16:0 | nízký podíl píce a vysoký podíl jaderných krmiv v KD | min-prům ↑ % FA v mléce |
| C18:1n9c | zvýšení podílu jaderných krmiv nebo prodloužení času na pastvě | prům ↑ % FA v mléce |
| C18:2n9c11t C18:2n7c,t | vysoký podíl LA, ALA nebo PUFA v KD (vysoký podíl pastvy) | max ↑ % FA v mléce |
| C18:2n6c | vysoký podíl jaderných krmiv, kukuřice nebo pastvy (vysoká účinnost přenosu především z pastvy) | prům ↑ % FA v mléce |
| C18:3n3c | vysoký podíl jaderných krmiv především z olejnatých semen, např. lněná semena | prům ↑ % FA v mléce |

¹min – mírná změna (<25 %), prům – průměrná změna (25-100 %), max – velká změna (>100 %); FA – *fatty acids*, KD – krmná dávka; ↑ – zvýšení; výsledek je vyjádřen jako relativní změna jednotlivých mastných kyselin v porovnání s původním krmným režimem;

Zdroj: upraveno dle Elgersma (2015)

Z literárních zdrojů tedy vyplývá, že změny ve složení mléčného tuku způsobuje např. podíl objemných a jaderných krmiv (Dewhurst *a kol.* 2006), podíl čerstvé píce (Elgersma *a kol.*, 2006) a podíl konzervovaných krmiv (Chilliard *a kol.*, 2007). Změny v profilu FA v důsledku úpravy KD nastupují obvykle velmi rychle a týkají se především LCFA, což vyplývá ze zákonitostí syntézy FA (*de novo* vs. FA přiváděné krví z KD nebo tkáňových rezerv).

Bauman a Griinari (2003) dále uvádějí, že profil FA mléčného tuku je ovlivněn také biohydrogenací v bachoru a konverzí prostřednictvím enzymu Δ -9 desaturázy (C18:0 na C18:1 – viz kapitola 2.4.3).

2.4.2 Vliv biologických faktorů

K biologickým faktorům ovlivňujícím FA mléčného tuku jsou řazeny genetické založení (plemeno a individualita dojnice), pořadí a stadium laktace a mléčná užitkovost. Změny v zastoupení FA související s těmito faktory jsou poměrně často studovány (Pešek *a kol.*, 2005; Soyeurt *a kol.*, 2006a; Conte *a kol.*, 2010; Kirchnerová *a kol.*, 2013; Toušová *a kol.*, 2013; Kadlecová *a kol.*, 2014).

Za významný faktor ovlivňující složení FA mezi jednotlivými plemeny či dojnicemi je považována produkce tuku za den (Samková *a kol.*, 2012). Rozdíly jsou

vysvětlovány odlišným zaměřením – mléčný, masný nebo kombinovaný užitkový typ (Milanesi *a kol.*, 2008), či jako důsledek polymorfismu – stav, kdy v populaci existují pro určitý znak minimálně dvě alely – genetické varianty (Schennink *a kol.*, 2008). Blíže v kapitole 2.4.3.

Z dosud provedených studií vyplývá, že složení mléčného tuku souvisí také s laktací. Mléko získané od dojnic na první laktaci má ve srovnání s mlékem získaným od dojnic na druhé a dalších laktacích vyšší obsah UFA oproti SFA. Důvodem mohou být odlišné metabolické nároky organismu dojnic na druhé a dalších laktacích v porovnání s dojnicemi na první laktaci (Lake *a kol.*, 2007) nebo negativní energetická bilance, která přímo ovlivňuje zastoupení UFA (Penasa *a kol.*, 2015).

Složení mléčného tuku dojnic závisí dále na metabolickém stavu dojnice během laktace. Samková *a kol.* (2012) uvádějí, že nejvyšší obsah UFA v mléce je na začátku laktace, uprostřed klesá a ke konci se opět mírně zvyšuje. Naopak zastoupení SFA je nejvyšší uprostřed laktace. Stoop *a kol.* (2009a) zjistili, že zastoupení SFA, zejména C6:0 až C14:0 vrcholí kolem třetího měsíce laktace. V porovnání s pořadím laktace ovlivňuje stadium laktace zastoupení FA více. FA jsou sledovány většinou pouze ve třech obdobích – na začátku, uprostřed a na konci laktace, přičemž za nejvýznamnější z hlediska změn v zastoupení FA je považována první třetina laktace.

Mléčná užitkovost rovněž ovlivňuje složení mléčného tuku. Závislost zastoupení FA na mléčné užitkovosti dokládají některé studie zabývající se korelační analýzou (Bastin *a kol.*, 2011; Penasa *a kol.*, 2015). Např. Bastin *a kol.* (2013) zjistili pozitivní korelace mezi FA a produkcí tuku (kg) či obsahem tuku (%) a proteinů (%). Petrini *a kol.* (2016) zjistili nejvyšší hodnoty korelačních koeficientů mezi obsahem tuku (%) a SFA a C16:0.

2.4.3 Genetické aspekty syntézy mléčného tuku

Obsah tuku je podobně jako zastoupení FA významným ukazatelem kvality mléka (Harvatine *a kol.*, 2009). FA mléčného tuku vznikají téměř z 60 % *de novo* syntézou v epiteliálních buňkách mléčné žlázy, zbývající část pak přeměnou FA

přijatých v KD nebo přeměnou z endogenních lipidů (Palmquist *a kol.*, 1993). Gebauer *a kol.* (2007) dále uvádějí, že v mléčné žláze přežvýkavců je téměř 50 % FA mléčného tuku syntetizováno z acetátu a kyseliny β -hydroxymáselné (BHA, *β -hydroxybutyric acid*) resp. z meziprojektu jejího metabolismu – butyrátu (BHB, *β -hydroxybutyrate*). Cirkulací může být acetát transportován z krve do mléčné žlázy, kde je přeměňován na FA. KD může významně ovlivnit zastoupení FA v mléčném tuku změnou poměru mezi acetátem a butyrátem určeného pro *de novo* syntézu v mléčné žláze nebo ovlivněním FA pocházejících z krmiva biohydrogenačními procesy v bachoru (Conte *a kol.*, 2016). Jacobs *a kol.* (2013a) zjistili, že acetát kromě syntézy mléčného tuku ovlivňuje také expresi lipogenních genů.

Yonezawa *a kol.* (2004) ve své studii popisují účinky BHA, která podle nich stimuluje akumulaci TAG v epitelálních buňkách mléčné žlázy, ovšem bez účasti na tvorbě tukových kuliček. Autoři dále uvádějí, že BHA inhibuje expresi leptinu (*LEP*, *leptin*) a syntézu lipidů v epitelálních buňkách mléčné žlázy. Jacobs *a kol.* (2013a) ve své studii také zjistili, že BHA zvyšuje expresi stearoyl-CoA desaturázy 1 (*SCD1*, *stearoyl-CoA desaturase 1*) o 44 %, acetyl-koenzymu A karboxylázy α (*ACACA*, *acetyl-CoA carboxylase α*) o 28 % a syntázy mastných kyselin (*FASN*, *fatty acid synthase*) o 29 %.

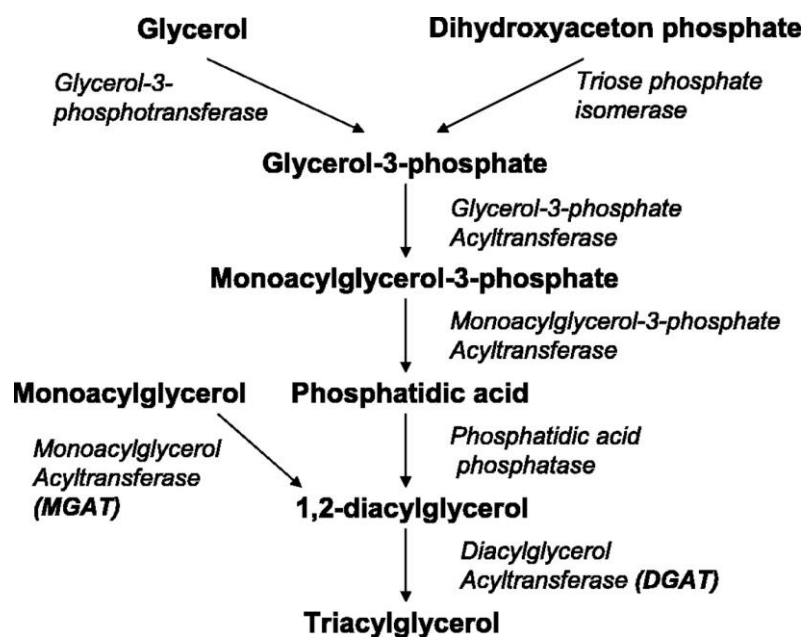
Identifikace biologických drah, genomových oblastí a genů poskytuje v oblasti produkce mléčného tuku cenné informace významné pro změnu složení mléčného tuku. Mach *a kol.* (2013) zjistili, že změny v profilu FA jsou doprovázeny změnami exprese regulačních genů spojených se širokým spektrem metabolických funkcí. Genová exprese je elementární proces, při kterém genotyp jedince v interakci s prostředím určuje fenotyp, tedy výsledný projev daného znaku (např. reálně existující buněčnou strukturu nebo funkci). Exprese genů tedy pravděpodobně souvisí také s metabolismem lipidů, respektive se zastoupením FA v mléčném tuku, a s tím souvisejícími procesy regulujícími sekreci FA mléka.

Expese genů, které kódují enzymy a proteiny potřebné pro *de novo* lipogenezi, je rovněž nápadně zvýšena v mléčné žláze během laktogeneze (proces, kterým alveolární buňky mléčné žlázy získávají schopnost sekrece mléka). Syntéza FA v mléčné žláze vyžaduje účinné absorpční, metabolické a sekreční mechanismy zahrnující koordinovaný a společný účinek více genů (Shingfield *a kol.*, 2010).

Vedle *de novo* syntézy usnadňují metabolismus FA další procesy související s lipidy, jako je transport FA s dlouhým řetězcem a prodloužení a desaturace FA.

Biosyntéza TAG (**Obrázek 3**) v epiteliálních buňkách mléčné žlázy probíhá postupným přidáváním aktivovaných FA na glycerol-3-fosfát prostřednictvím acyltransferáz (Coleman a Mashek, 2011). Biochemická dráha syntézy TAG je v první řadě katalyzována glycerol-3-fosfát acyltransferázami (GPAT), které přidávají mastné acylové skupiny do polohy sn-1 glycerol-3-fosfátu, což vede k tvorbě monoacylglycerolů (MAG). Hlavní izoformy *GPAT* jsou glycerol-3-fosfát acyltransferáza (*GPAM*, produkce v mitochondriích) a 1-acylglycerol-3-fosfát acyltransferáza 6 (*AGPAT6*, produkce v mikrozomech; Bionaz a Loor, 2008a). Druhý krok biosyntézy TAG je katalyzován *AGPAT*, která přidává mastné acylové skupiny na skelet glycerolu do polohy sn-2. Díky tomuto kroku jsou MAG přeměněny na diacylglyceroly (DAG, také nazývány jako kyselina fosfatidová nebo kyselina 1,2-diacylglycerol-3-fosforečná). Před závěrečným krokem biosyntézy TAG dochází k defosforylaci DAG odštěpením fosfátové skupiny prostřednictvím enzymu fosfatidát fosfatázy (také nazýván lipin – *LPIN*, hlavní izoforma genu *LPIN1*) – Reue a Brindley (2008). Finální krok cyklu biosyntézy TAG je katalyzován diacylglycerol acyltransferázami, které přidávají mastné acylové skupiny do polohy sn-3 na skeletu glycerolu, což vede k tvorbě TAG (Nafikov *a kol.*, 2014).

Obrázek 3 Hlavní dráhy biosyntézy triacylglycerolů.



Zdroj: Vaziri *a kol.* (2004)

Poziční rozdělení FA mléčného tuku v TAG není náhodné, nýbrž je ovlivněno specifičností různých acyltransferáz pro konkrétní FA (Christie a Clapperton, 1982). Z tohoto faktu lze usuzovat, že mutace v genech acyltransferáz mohou měnit specifitu enzymů, což může vést k předpokladu, že genetický polymorfismus diacylglycerol acyltransferázy 1 (*DGAT1*, *diacylglycerol acyltransferase 1*) a dalších acyltransferáz (např. *AGPAT* aj.) je odpovědný za změnu zastoupení FA mléčného tuku.

Stoop *a kol.* (2009b) a Bouwman *a kol.* (2011) provedli detekci lokusů kvantitativních znaků (QTL, *quantitative trait loci*) u FA mléčného tuku a identifikovali dvě QTL oblasti pro SCFA a MCFA na chromozomu 14 a chromozomu 26 (BTA, *Bos taurus*), které byly pravděpodobně způsobené mutacemi genů *DGAT1* a *SCD1*. Studium QTL umožňuje identifikovat kandidátní polymorfní geny, které vysvětlují variabilitu studovaného znaku. Pomocí jednonukleotidového polymorfismu (SNP, *single nucleotide polymorphism*) lze vysvětlit část genetické variace, např. indexů nenasycenosti FA souvisejících s geny *DGAT1* a *SCD1* (Marchitelli *a kol.*, 2013).

Buitenhuis *a kol.* (2014) identifikovali celkem 1233 významných SNP markerů týkajících se FA (např. C6:0, C8:0, C14:1, C16:1, CLA, C6-C10, C14 index, CLA index) lokalizovaných na 18 chromozomech. Ke studiu autoři využili celogenomovou asociační studii (GWAS, *genome-wide association study*), jejíž výsledky byly využity při vyhledávání genetických rozdílů a podobností mezi různými plemeny, jakož i při vyhledávání biochemických drah, které jsou spojovány např. s obsahem tuku (Subramanian *a kol.*, 2005). **Tabulka 4** uvádí přehled vybraných SNP markerů identifikovaných pomocí GWAS.

Tabulka 4 Přehled vybraných jednonukleotidových polymorfismů identifikovaných pomocí celogenomové asociační studie.

| FA | Počet SNP | Lokalizace na chromozomu |
|---------------|--|--------------------------|
| C6:0 | 32 | BTA9, 12, 25 |
| C14:1 | 83 (7 pro <i>SCD1</i>) | BTA5, 7, 8, 12, 26 |
| C16:1 | 29 (některé SNP přiřazené k <i>DGAT1</i>) | BTA8, 14 |
| CLA | 2 | BTA17 |
| C6-C10 | 11 | BTA9 |

FA – *fatty acids*; SNP – *single nucleotide polymorphism*; BTA – *Bos taurus*; *DGAT1* – *diacylglycerol acyltransferase 1*; *SCD1* – *stearoyl-CoA desaturase 1*;

Zdroj: upraveno dle Buitenhuis *a kol.* (2014)

Při studiu biosyntézy mléčného tuku skotu byly provedeny různé genetické analýzy odhalující určité odlišnosti v závislosti na jedinci (Krag *a kol.*, 2013). Polymorfismus genů *DGATI* či *SCD1* má velký vliv na složení mléčného tuku (Schennink *a kol.*, 2008; Conte *a kol.*, 2010), nicméně nutno podotknout, že biosyntéza mléčného tuku je složitý proces regulovaný mnoha dalšími geny (Bionaz a Looor, 2008b).

2.4.3.1 *DGATI*

Gen *DGATI* byl lokalizován na chromozomu BTA14. Bylo zjištěno, že ovlivňuje kvantitativní vlastnosti mléčného tuku a produkuje mikrozomální enzym (enzym produkovaný hladkým endoplazmatickým retikulem) diacylglycerol O-acyltransferázu (DGAT, EC 2.3.1.20), který katalyzuje poslední krok v procesu biosyntézy TAG a podílí se tak na řízení rychlosti syntézy TAG v adipocytech (Ibeagha-Awemu *a kol.*, 2008). Při studiu enzymu DGAT byla provedena izolace komplementární DNA (cDNA, *complementary DNA*), z níž vyplynulo, že kóduje dvě izoformy tohoto enzymu (DGAT1 a DGAT2) – Cases *a kol.* (1998). cDNA je DNA syntetizovaná z templátu mRNA reverzní transkriptázou (enzym katalyzující přepis – transkripci genetické informace z RNA do DNA). Technika cDNA je využívána pro analýzu genové exprese a potenciálem této technologie je schopnost provádění expresního profilu celého genomu, tedy analýzy tisíců genů v jednom experimentu (Khan *a kol.*, 1999).

Polymorfismus *DGATI* je popsán v několika studiích. Grisart *a kol.* (2002) zjistili, že polymorfismus *DGATI* má spojitost s produkcí a složením mléka. Další autoři uvádějí souvislost s obsahem mléčného tuku (Bastin *a kol.*, 2013) a jeho složením (Bilal *a kol.*, 2012). V případě FA se jedná o aminokyselinovou mutaci způsobující substituci lysinu za alanin na exonu 8 v pozici 232 (K232A). Schennink *a kol.* (2007) uvádějí, že alela Lys je spojena s vyšším podílem SFA a C16:0 a nižším podílem C14:0, C18:1n9c a CLA. Dle Buitenhuis *a kol.* (2014) potvrzuje polymorfismus *DGATI* vztah k C16:1 a procentuálnímu obsahu tuku u plemen dánského holštýnského a jerseykého skotu.

2.4.3.2 SCD1

Gen *SCD* byl lokalizován na chromozomu BTA26. U přežvýkavců je gen *SCD* charakterizován dvěma izoformami, *SCD1* a *SCD5*, které kódují enzymy SCD1 a SCD5 (Leskinen *a kol.*, 2016). Oba geny mají podobnou velikost, sdílí 65 % identity aminokyselinové sekvence, ale exprese genu *SCD5* je v mléčné žláze laktujících dojníc mnohem nižší než u *SCD1* (Jacobs *a kol.*, 2013b). Enzym stearyl-CoA desaturáza 1 (delta-9 desaturáza, EC 1.14.19.1) katalyzuje konverzi SFA (C10:0-C18:0) na MUFA. Studie Buitenhuis *a kol.* (2014) potvrdila spojitost polymorfismu *SCD1* s C14:1. Bernard *a kol.* (2006) dále potvrdili, že C14:0 je výlučně produkována *de novo* syntézou v mléčné žláze a je tudíž pravděpodobné, že C14:1n9c (kyselina myristoolejová) je syntetizována pomocí SCD1. *SCD1* je spojován také se zastoupením jednotlivých FA mléčného tuku (Conte *a kol.*, 2010) a dále je odpovědný za přeměnu C18:2n9c11t a C18:1n9c (Shingfield *a kol.*, 2013).

2.5 Metody stanovení mastných kyselin a genotypizace

V oblasti výzkumu dnes existuje několik možností (metod) stanovení zkoumané látky nebo jejího složení. Svou zásluhu na tom má především pokrok v instrumentální analýze, která umožňuje čím dál rychlejší a přesnější způsoby měření či detekce. Moderní technologie jsou však založeny na platných principech základních vědních oborů, jakými jsou např. fyzika, matematika či chemie.

2.5.1 Stanovení mastných kyselin

První zmínky o chromatografii sahají na přelom 19. a 20. století (Day, 1897). Název chromatografie pochází z řeckých slov *chrom* (barva) a *graf* (psát). Proces byl pojmenován Tswettem (1903, 1906), který zároveň chromatografii popsal jako adsorpční jev. Například Graff a Skau (1943) ve své studii sledovali separaci FA, pro kterou použili fenolovou červeň (reg. č. CAS 143-74-8) na hořčičkové koloně.

Plynová chromatografie (GC, *gas chromatography*) byla popsána Claessonem (1946) a zahrnuje dva analytické postupy – chromatografii v systému plyn-pevná látka (GSC, *gas-solid chromatography*) a v systému plyn-kapalná látka

(GLC, *gas-liquid chromatography*). GSC je tzv. adsorpční chromatografie a byla popsána např. Jamesem a Phillipsem (1954). GLC byla popsána Jamesem a Martinem (1952) a v porovnání s GSC má více výhod. Jedná se o tzv. rozdělovací chromatografii, při které jsou látky rozpouštěny v obou fázích.

V důsledku technického pokroku bylo od roku 1960 v oblasti chromatografie vyvinuto mnoho nových aplikací, které mají uplatnění v biochemii, potravinářské chemii apod. (Spitzer, 1997). Žádná jiná separační technika neměla v historii tak obrovský vliv na analytickou a organickou chemii, biochemii či biotechnologii (Brondz, 2002). V současnosti je převážná většina profilů FA lipidů stanovována metodou GC (po předchozí derivatizaci na methylestery FA – FAME, *fatty acid methyl esters*), která pro stanovení využívá kapilární kolonu a plamenově-ionizační detektor (FID, *flame-ionization detector*).

V mléčném tuku jsou částečně obsaženy molekuly BCFA (Ballesteros *a kol.*, 1994), které mohou být hydrolýzou přeměněny na FFA nebo *trans*-esterifikovány na FAME (Kates, 2010). Esterifikace zvyšuje těkavost FA, zlepšuje konfiguraci píku, separaci a citlivost detektorů.

Derivatizace FA pro analýzu GC se stejně jako esterifikace provádí pro zvýšení těkavosti, zlepšení separace a také redukci konců řetězců. Lipidy jsou rozpustné v organických rozpouštědlech, proto jsou při derivatizaci používány např. ether, petrolether, hexan, benzen nebo směs chloroformu a methanolu (Brondz, 2002). Nejčastěji používanými deriváty jsou pak alkylové deriváty (např. methyl-, ethyl-, propyl-, isopropyl-, butyl- nebo i-butyl-).

Při GC jsou používány různé nosné plyny, především dusík, helium nebo vodík. Vodík je vhodný pro rychlost analýzy, lepší separaci látek a použitelnost s náplňovou i kapilární kolonou. Při detekci pomocí FID jsou látky pyrolyzovány v atmosféře vodík-kyslík (Wolff a Fabien, 1989). V tomto procesu jsou vytvářeny ionty, které lze detekovat. **Tabulka 5** uvádí detektory a detekční systémy používané při stanovení FA.

Tabulka 5 Detektory a detekční systémy používané při stanovení mastných kyselin.

| Detektor | Citlivost ¹ |
|---|------------------------|
| termálně-vodivostní (TCD, <i>thermal-conductivity detector</i>) | ng |
| plamenově-ionizační (FID, <i>flame-ionization detector</i>) | pg |
| elektronového záchytu (ECD, <i>electron capture detector</i>) | fg |
| elektroliticky-konduktivní (ELCD, <i>electrolytic-conductivity detector</i>) | pg |
| dusíko-fosforový (NPD, <i>nitrogen-phosphorus detector</i>) | pg |
| plamenově-fotometrický (FPD, <i>flame-photometric detector</i>) | pg |
| foto-ionizační (PID, <i>photo-ionization detector</i>) | pg |
| Spektrální detekční systémy | |
| ultrafialový (UV, <i>ultra violet</i>) | |
| hmotnostní spektrometr (MS, <i>mass spectrometry</i>) | |
| MS/MS | |
| nukleární magnetická rezonance (NMR, <i>nuclear magnetic resonance</i>) | |
| infračervená spektroskopie s Fourierovými transformacemi (FT-IR, <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>) | |

¹ng – nanogram, pg – pikogram, fg – femtogram;

GC je jednou z nejrozšířenějších metod pro kvantifikaci FA. Jensen (2002) a Delmonte *a kol.* (2012) uvádějí, že mléčný tuk obsahuje více než 400 různých FA s různou délkou řetězce, počtem dvojných vazeb nebo polohou funkčních skupin. Americká společnost pro chemii olejů (AOCS, *The American Oil Chemists' Society*) zavedla oficiální metodu pro analýzu mléčných tuků (Ce 1j-07), která je založena na separaci FAME pomocí kolony (100 m SP-2560, popř. CP Sil 88) pracující v izotermických podmínkách (180 °C po dobu 32 min, následně 215 °C) se záměrem eluovat nasycené a nenasycené FAME s dlouhým řetězcem (AOCS, 2007). Nicméně někteří autoři uvádějí, že při použití této metody se specifickými parametry separace a teplotními gradienty (Kramer *a kol.*, 2008; Mossoba *a kol.*, 2009) dochází k vzájemným překryvům mezi FAME. Teng *a kol.* (2017) uvádějí jako oficiální standardní metodu GB 5413.27-2010 (GB, 2010) pro stanovení FA v kojenecké výživě, mléce a mléčných produktech. Metoda využívá standardní směsi 37 FAME pro identifikaci jednotlivých FA a pro výpočet jejich hmotnostních procent pomocí metody vnitřní normalizace plochy píku. V porovnání např. s metodou AOAC (1997) je tato metoda snáze proveditelná. Metodou však nelze (nebo pouze jen omezeně) identifikovat *trans* MUFA či BCFA, díky čemuž je snížen rozsah jejího použití. Navíc, pro zpřesnění výpočtu kvantifikace FA musí být často používány korekční

faktory odezvy (hodnota odezvy detektoru se liší od skutečného počtu uhlíků v řetězci FA), což potvrzují např. Firl *a kol.* (2014).

Klasické metody, mezi něž je řazena také GC, mají řadu výhod (vysoká přesnost) i nevýhod (náročnost časová i v provedení, nutnost použití organických rozpouštědel, vysoké náklady). Z tohoto důvodu se hledají různé alternativy pro běžnou analýzu mléka, resp. mléčných produktů.

Jednou z alternativ je infračervená (IR) spektroskopie, která je využívána již několik desetiletí (Biggs, 1967). Metoda je rychlá, přesná a méně nákladná (Foss, 2009). IR spektroskopie s Fourierovými transformacemi (FT-IR, *Fourier transform infrared spectroscopy*) je nedestruktivní metodou schopnou analyzovat složení s minimální náročností při přípravě vzorku (Koca *a kol.*, 2010).

Nedávno došlo k významnému pokroku v přenosných systémech založených na principu IR spektroskopie. Tyto systémy jsou vhodné z hlediska jejich nízké ceny, kompaktnosti, odolnosti, robustnosti, nízké hmotnosti, minimální zkušenosti požadované pro jejich provoz a řady možností jejich použití k rutinním analýzám, např. pro kontrolu kvality suroviny (Ellis a Goodacre, 2006). Soyeurt *a kol.* (2006b) popsali potenciál FT-IR pro predikci podrobného složení mléčného tuku.

Základní předpoklad pro využití spektroskopických technik je založen na generování výsledků v podobě "fingerprintů". Např. mléčný produkt s určitým chemickým složením, který je vystaven světelnému zdroji, má charakteristické spektrum, které vyplývá z absorpce různých chemických složek (Karoui a de Baerdemaeker, 2007). Autoři dále uvádějí, že vzhledem k tomu, že přesné složení jakéhokoli přírodního materiálu se mění v závislosti na druhu, odrůdě, sezóně a dalších charakteristikách, je nutné mít soubor reprezentativních spekter nebo "standardů", které lze srovnávat s testovaným materiálem.

Na trhu jsou v současnosti k dispozici různé přístroje FT-IR, které zahrnují kompaktní (např. používané pro kontrolu jakosti mléka při příjmu v mlékárně) nebo vysoce výkonné (např. používané centrální laboratoří s většími analytickými kapacitami; až 600 vzorků / h) systémy (**Obrázek 4**). **Obrázek 5** popisuje výsledky získané měřením na přístroji CombiScope FTIR 600 (Delta Instruments B.V., Netherlands). Coitinho *a kol.* (2017) uvádějí, že kompaktnost zařízení FT-IR

umožňuje jeho použití v mlékárenském provozu a zahrnutí do programů kontroly kvality suroviny nebo dokonce nahrazení tradičních (chemických) metod.

Obrázek 4 Přístroj CombiScope FTIR 600 (Delta Instruments B.V., Netherlands) pracující na principu FT-IR.



Přístroj je součástí vybavení rutinní části akreditované laboratoře pro rozbor syrového mléka ve společnosti State Enterprise “Pieno Tyrimai”, Kaunas, Litva;

Zdroj: Robert Kala

Obrázek 5 Výsledky měření na přístroji CombiScope FTIR 600 (Delta Instruments B.V., Netherlands) – tuk, bílkoviny, laktóza, sušina (%), močovina ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), bod mrznutí ($^{\circ}\text{C}$).

| Measured | Name | Fat %m/m | Protein %m/m | Lactose %m/m | Solids %m/m | NPN/CU mg/dl | FPD $^{\circ}\text{C}$ | SN % |
|----------|---------------------|----------|--------------|--------------|-------------|--------------|------------------------|------|
| 1 1 | 10:21:27 Testas GTK | 4.473 | 3.551 | 4.579 | 13.573 | 19.70 | 529.5 | |
| 1 2 | 10:21:38 9100094 | 4.469 | 3.560 | 4.568 | 13.580 | 20.19 | 533.6 | |
| 1 3 | 10:21:50 Testas GTK | 4.466 | 3.559 | 4.574 | 13.579 | 19.53 | 534.7 | |
| 1 4 | 10:22:01 Testas GTK | 4.474 | 3.569 | 4.582 | 13.608 | 22.16 | 535.9 | |
| 1 5 | 10:22:13 9100094 | 4.478 | 3.563 | 4.571 | 13.585 | 21.28 | 535.0 | |
| 1 6 | 10:22:25 9100094 | 4.484 | 3.572 | 4.566 | 13.586 | 22.52 | 534.9 | |
| 1 7 | 10:22:21 Testas GTK | | | | | | | |
| 1 8 | Testas GTK | | | | | | | |
| 1 9 | Testas GTK | | | | | | | |
| 1 10 | Testas GTK | | | | | | | |

Přístroj je součástí vybavení rutinní části akreditované laboratoře pro rozbor syrového mléka ve společnosti State Enterprise “Pieno Tyrimai”, Kaunas, Litva;

Zdroj: Robert Kala

Soyeurt *a kol.* (2006b) a de Marchi *a kol.* (2014) uvádějí, že pro vysoce výkonnou analýzu vzorků mléka, zahrnující profil FA slouží IR spektroskopie ve střední oblasti spektra (MIR, *mid-infrared spectroscopy*). Infračervené spektrum absorbuje elektromagnetické záření při frekvencích, které korelují s vibracemi specifických chemických vazeb uvnitř molekuly (Coates, 2000). Střední oblast spektra (vlnová délka 400 až 4 000 cm^{-1}) je velmi citlivá na chemické prostředí, jelikož v této oblasti dochází k základní absorpci molekulárních vibrací (Belton, 1997), a MIR spektroskopie tak může být využita k odhadu různých kvantitativních vlastností (**Tabulka 6**). Pokyny pro použití MIR u mléka a tekutých mléčných produktů jsou uvedeny ve standardu EN ISO 9622:2013 (ISO-International Standards Office, 2013).

Tabulka 6 Výhody infračervené spektroskopie v blízké a střední oblasti spektra.

| |
|--|
| <p>malá nebo žádná předúprava vzorku</p> <p>nedestruktivní metoda</p> <p>nevyžaduje použití chemikálií nebo jiných spotřebních materiálů</p> <p>spektra jsou získávána velmi rychle a automaticky</p> <p>spektra mohou být získána pomocí přenosných zařízení použitelných na farmě, v průmyslu, maloobchodu či v laboratorních nebo domácích podmínkách</p> <p>pro některé aplikace mohou být spektra získána z povrchu intaktních či těžko vzorkovatelných materiálů (použitím specifické sondy)</p> <p>uzpůsobitelná a zjednodušená zařízení jsou k dispozici pro průběžné sledování potravin „v řadě“, během zpracování</p> <p>data obsažená ve spektrech jsou velmi složitá a mohou odrážet jak fyzikální stav, tak molekulární strukturu</p> <p>spektrální data lze snadno ukládat</p> <p>vzhledem k dostupnosti správných kalibrací může být jedno spektrum současně používáno pro několik chemických či fyzikálních predikcí</p> <p>spektrální informace mohou poskytnout velmi komplexní popis vzorků („fingerprint“), které mohou být užitečné při popisu kvality a typických vlastností potravin</p> <p>v případě nové kalibrace existuje pro znak (starý nebo nový) uložené spektrum vzorků, které již nejsou k dispozici; pomocí nové kalibrace lze tedy vzorky opět vyhodnotit</p> |
|--|

Zdroj: upraveno dle Bittante a Cecchinato (2013)

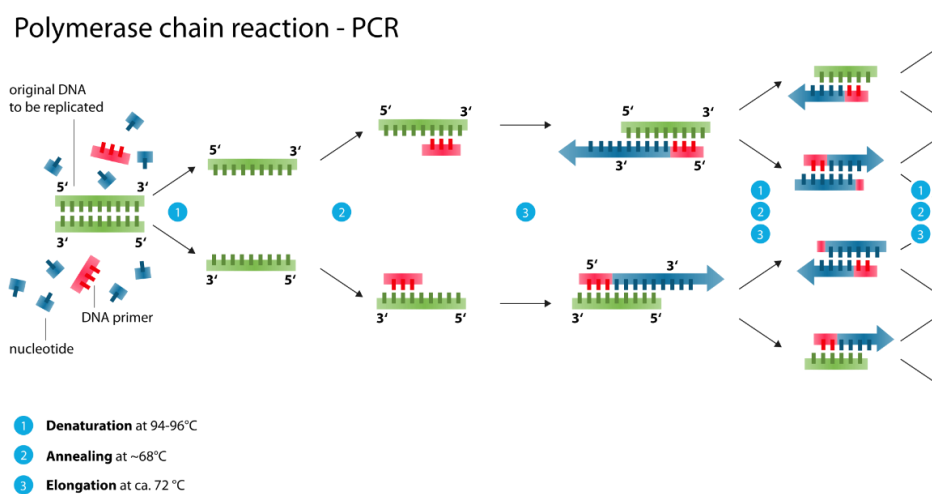
2.5.2 Genotypizace vybraných genů metodou polymerázové řetězové reakce s následnou analýzou polymorfismu délky restričních fragmentů

Polymerázová řetězová reakce (PCR, *polymerase chain reaction*) byla objevena v roce 1985 Saikim *a kol.* (1985) a americkým chemikem Kary B. Mullisem (Mullis *a kol.*, 1986; Mullis, 1994). Přínosem je především vědecký vývoj

v oblasti molekulární biologie (např. sekvenování genomu, genová exprese v rekombinantních systémech apod.). Objev byl jedním z největších úspěchů 20. století na poli biologických disciplín (Valones *a kol.*, 2009). K výhodám molekulárních technik patří snadné provedení, vysoká citlivost, opakovatelnost a reprodukovatelnost (Hazra *a kol.*, 2017).

PCR používá přirozeně se vyskytující nukleázový enzym DNA-polymerázu (*Taq* polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*) katalyzující regeneraci DNA řetězovou reakcí, sestávající ze tří kroků, které se několikrát opakují a exponenciálně amplifikují cílovou DNA (Garcia a Ma, 2005). Metoda umožňuje *in vitro* syntézu nukleových kyselin, pomocí kterých může být segment DNA specificky replikován semikonzervativním způsobem (**Obrázek 6**). *Taq* polymeráza syntetizuje komplementární sekvenci DNA za použití malého fragmentu – primeru, který je spojen s jedním z řetězců DNA ve specifickém místě. Primery omezují sekvenci, která má být replikována. Výsledkem je zesílení určité DNA sekvence o miliardy kopií (Mullis, 1990).

Obrázek 6 Schématické znázornění polymerázové řetězové reakce.

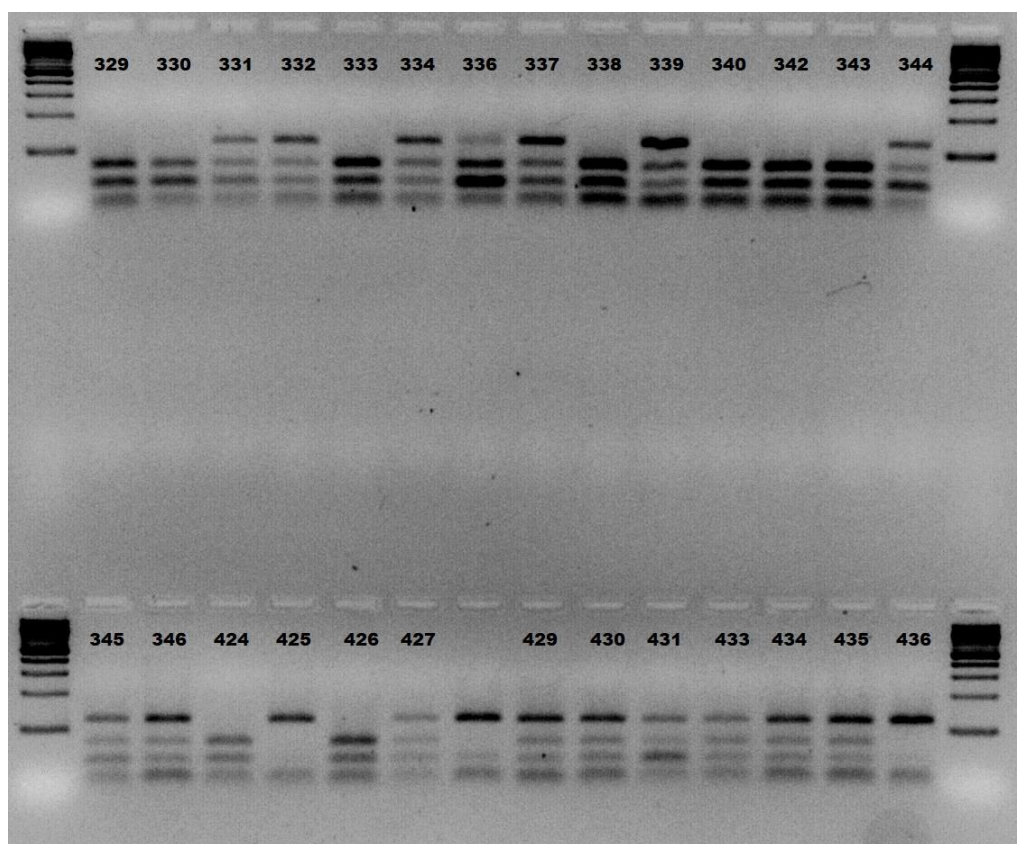


Zdroj: OBN – Online Biology Notes (2017)

PCR s polymorfismem délky restričních fragmentů (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) je jednou z druhů molekulárních technik, které se používají např. k detekci SNP (Tabit, 2016) nebo při identifikaci druhů mléka použitého při výrobě mléčných produktů (Ewida a Abd El-Magiud, 2018). Technika zahrnuje amplifikaci segmentu DNA s primery, po které následuje štěpení

amplifikovaného segmentu restrikčními enzymy a analýza gelovou elektroforézou (**Obrázek 7**). Výhodou PCR-RFLP jsou nižší náklady na analýzu, např. v porovnání s kvantitativní PCR (qPCR nebo *real-time* PCR), která umožňuje kvantifikaci sledovaného úseku DNA v reálném čase. Další výhodou je získání profilu RFLP během několika hodin (Abdel-Rahman, 2017), vysoká specifita a dobrá reprodukovatelnost. V RFLP technice se amplifikovaná PCR rozštěpuje na fragmenty s různou velikostí podle použitého restrikčního enzymu.

Obrázek 7 Vyhodnocení metody polymerázové řetězové reakce s následnou analýzou polymorfismu délky restrikčních fragmentů pomocí gelové elektroforézy (gen *stearoyl-CoA desaturáza 1*; genotypy 425 – *TT*, 427 – *TC*, 426 – *CC*).



Fotografie byla pořízena dokumentačním zařízením BioImaging InGenius 3 (Syngene, USA) na Katedře genetiky a speciální produkce rostlinné, ZF, JU;

Zdroj: Robert Kala

3. Cíl práce

Cílem práce bylo vyhodnocení vlivu biologických faktorů na změny spektra mastných kyselin mléčného tuku u vybraných plemen skotu (český strakatý a holštýnský), na jehož základě by bylo možné navrhnout praktické postupy k pozitivní modifikaci mléčného tuku – zvýšení obsahu nutričně prospěšných mastných kyselin.

Dílčí cíle:

- Posoudit vliv genetického založení (plemene a individuality dojnice), pořadí a stadia laktace na zastoupení mastných kyselin mléčného tuku u dojnic českého strakatého a holštýnského skotu.
- Zjistit četnosti polymorfismu genů souvisejících s biosyntézou mléčného tuku a mastných kyselin u dojnic českého strakatého a holštýnského skotu.
- Vyhodnotit vztah polymorfismu genů *DGATI* a *SCDI* (případně dalších souvisejících se syntézou mléčného tuku) a ukazatelů mléčné užitkovosti.
- Zjistit možnosti stanovení mastných kyselin pomocí rutinní metody a porovnat je se stanovením mastných kyselin referenční metodou.
- Zjistit možnosti izolace DNA ze vzorků mléka a vyhodnotit metody genotypizace vybraných genů souvisejících s kvalitou kravského mléka.

Disertační práce vznikla jako součást řešení následujících projektů:

- **NAZV KUS QJ1510336** – Výzkum a podpora produkce zdravotně a spotřebitelsky benefičních mléčných výrobků cílenou selekcí a modifikací profilu mastných kyselin mléčného tuku. Poskytovatel: *Ministerstvo zemědělství ČR*. Hlavní řešitel: *doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.* Doba řešení: 2015-2018.
- **NAZV KUS QJ1510339** – Komplexní systém zvýšení kvality mléka, mléčných produktů a monitoring zdravotního stavu krav s cílem zvýšit přidanou hodnotu zemědělské produkce v ČR. Poskytovatel: *Ministerstvo zemědělství ČR*. Hlavní řešitel: *prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.* Doba řešení: 2015-2018.
- **GAJU 002/2016/Z** – Genetika, zdraví zvířat a kvalita produktů jako základ konkurenceschopnosti. Poskytovatel: *Grantová agentura Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích*. Hlavní řešitel: *prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.* Doba řešení: 2016-2018.
- **GAJU 011/2013/Z** – Zdraví hospodářských zvířat a zdravotní bezpečnost potravin – genetické, parazitární a nutriční aspekty. Poskytovatel: *Grantová agentura Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích*. Hlavní řešitel: *prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.* Doba řešení: 2013-2015.
- **NAZV QH81210** – Analýza možností zvýšení hladiny zdraví prospěšných mastných kyselin v syrovém mléce prostřednictvím cílených chovatelských postupů. Poskytovatel: *Ministerstvo zemědělství ČR*. Hlavní řešitel: *prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.* Doba řešení: 2008-2012.

4. Materiál a metodika

Kapitola „*Materiál a metodika*“ není v práci podrobně zpracována. Jednotlivé metody a designy experimentů jsou uvedeny v příslušných publikacích (viz kapitola **12. Přílohy**).

5. Výsledky a diskuze

Kapitola „Výsledky a diskuze“ byla zpracována s ohledem na dílčí cíle disertační práce a příspěvky, které byly v průběhu studia publikované. Struktura následujících podkapitol byla vytvořena podle klíčových témat – i) vlivu faktorů (zejména biologických) ovlivňujících zastoupení FA, ii) výskytu polymorfismu genů souvisejících s obsahem a složením mléčného tuku a iii) metodami stanovení mastných kyselin mléčného tuku. V úvodu jsou vždy uvedeny jednotlivé příspěvky, poté následuje stručné shrnutí dané problematiky. Diskuze byla rozšířena i o některé další poznatky, které v daných příspěvcích přímo uvedeny nebyly.

5.1 Faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin mléčného tuku

5.1.1 Publikace vztahující se k danému tématu (viz kapitola 12. Přílohy)

Hanuš, O., Samková, E., Křížová, L., Hasoňová, L., **Kala, R.** 2018. Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability – A review. *Molecules*, 1636, 23(7): 1-32.

Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Hanuš, O., **Kala, R.**, Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J. 2018a. Joint effects of breed, parity, month of lactation, and cow individuality on the milk fatty acids composition. *Mljekarstvo*, 68(2): 98-107.

Kala, R., Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J., Hanuš, O. 2018a. Nutritionally desirable fatty acids including CLA of cow's milk fat explained by animal and feed factors. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66(1): 69-76.

Kala, R., Samková, E., Hasoňová, L., Špička, J., Pelikánová, T., Křížová, Z., Hladký, J. 2016a. Proportion of important fatty acids in cow and goat milk fat. In: *23th International PhD Students Conference MendelNet 2016*. Brno, 9-10 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 582-587. ISBN 978-80-7509-443-8

5.1.2 Komentář k problematice

Již počátkem 90. let 20. století byly publikovány souhrnné publikace, které se zabývaly studiem faktorů ovlivňujících složení mléčného tuku. Zásadní význam

měly především studie Palmquista *a kol.* (1993) a později Jensena (2002). Autoři zde označují jako určující faktory související se složením mléčného tuku především biologické faktory a vliv výživy.

Na daná témata byla od té doby publikována celá řada vědeckých prací, ať už se zabývala genetickým založením (Pešek *a kol.*, 2005; Soyeurt *a kol.*, 2006a; Kadlecová *a kol.*, 2014), pořadím a stadiem laktace (Kirchnerová *a kol.*, 2013; Toušová *a kol.*, 2013) či výskytem polymorfismu genů souvisejících s obsahem a složením mléčného tuku (Conte *a kol.*, 2010). Pravidelně se v souvislosti s touto problematikou publikují také práce rešeršního charakteru (např. Schwendel *a kol.*, 2015; Useni *a kol.*, 2018).

V publikaci typu review (viz kapitola 5.1.1 – Hanuš *a kol.*, 2018) jsme se rovněž zabývali FA mléčného tuku a vlivem vybraných faktorů na jejich variabilitu. Záměrem bylo shrnout nejnovější poznatky související se zastoupením FA mléčného tuku – jejich význam z technologického a nutričního hlediska, změny v obsazích působením biologických faktorů a vlivem výživy a v neposlední řadě vývoj v oblasti nepřímých metod pro jejich stanovení. Část zabývající se vývojem nepřímých metod je detailně rozpracována v kapitole 5.3.2 této disertační práce.

V dalších dvou publikacích (viz kapitola 5.1.1 – Samková *a kol.*, 2018a; Kala *a kol.*, 2018a) jsme se zabývali vlivem biologických faktorů a vlivem výživy. První publikace (Samková *a kol.*, 2018a) byla zaměřena na variabilitu FA a jejich skupin a podíl jednotlivých biologických faktorů (plemeno, individualita dojnice, pořadí a stadium laktace) na složení mléčného tuku. Z výsledků vyplynulo, že nejvyšší hodnoty koeficientů determinace (R^2), jako ukazatelů podílu všech faktorů na celkové variabilitě v zastoupení FA, byly zjištěny u C14:1, nejnižší naopak u C4:0 (61,8, resp. 23,3 %). V případě skupin byly nejvyšší hodnoty R^2 zjištěny u SFA, nejnižší u PUFA (46,8, resp. 39,2 %). U C14:1 byla potvrzena statistická významnost v případě faktoru plemene, individuality dojnice a stadia laktace ($P < 0,001$). Hodnoty u C4:0 statisticky významné nebyly. U skupiny SFA byla zjištěna statistická významnost u faktoru individuality dojnice a stadia laktace ($P < 0,001$) i pořadí laktace ($P < 0,01$). V případě skupiny PUFA byla zjištěna statistická významnost u faktoru individuality dojnice a stadia laktace ($P < 0,001$, resp. $P < 0,01$). Ze zjištěných výsledků lze usuzovat, že nejvýznamnější vliv na zastoupení FA má především individualita dojnice a stadium laktace.

Ve druhé publikaci (Kala *a kol.*, 2018a) jsme se zaměřili kromě vlivu biologických faktorů také na vliv výživy. Nejvyšší hodnoty R^2 byly zjištěny u VA a BCFA (65, resp. 54 %), nejnižší pak u LA a MUFA (25, resp. 30 %). U všech zjištěných hodnot R^2 byla potvrzena statistická významnost ($P < 0,001$). Výživa se na celkové variabilitě podílela nejvíce u VA a CLA, v případě skupin u PUFA.

Výsledky obou našich analýz v zásadě potvrdily závěry dalších publikací, tedy že zastoupení FA v mléčném tuku se mění v závislosti na biologických faktorech, a to s různou mírou intenzity. Někteří autoři sledovali i další faktory, např. Kay *a kol.* (2005) vliv genetické selekce na ukazatele mléčné užitkovosti, Kgwatalala *a kol.* (2009a) vliv polymorfismu *SCD1* na zastoupení FA, Mele *a kol.* (2009) vliv heritability a genetických korelací na zastoupení FA nebo Stoop *a kol.* (2009a) vliv energetického metabolismu na zastoupení FA.

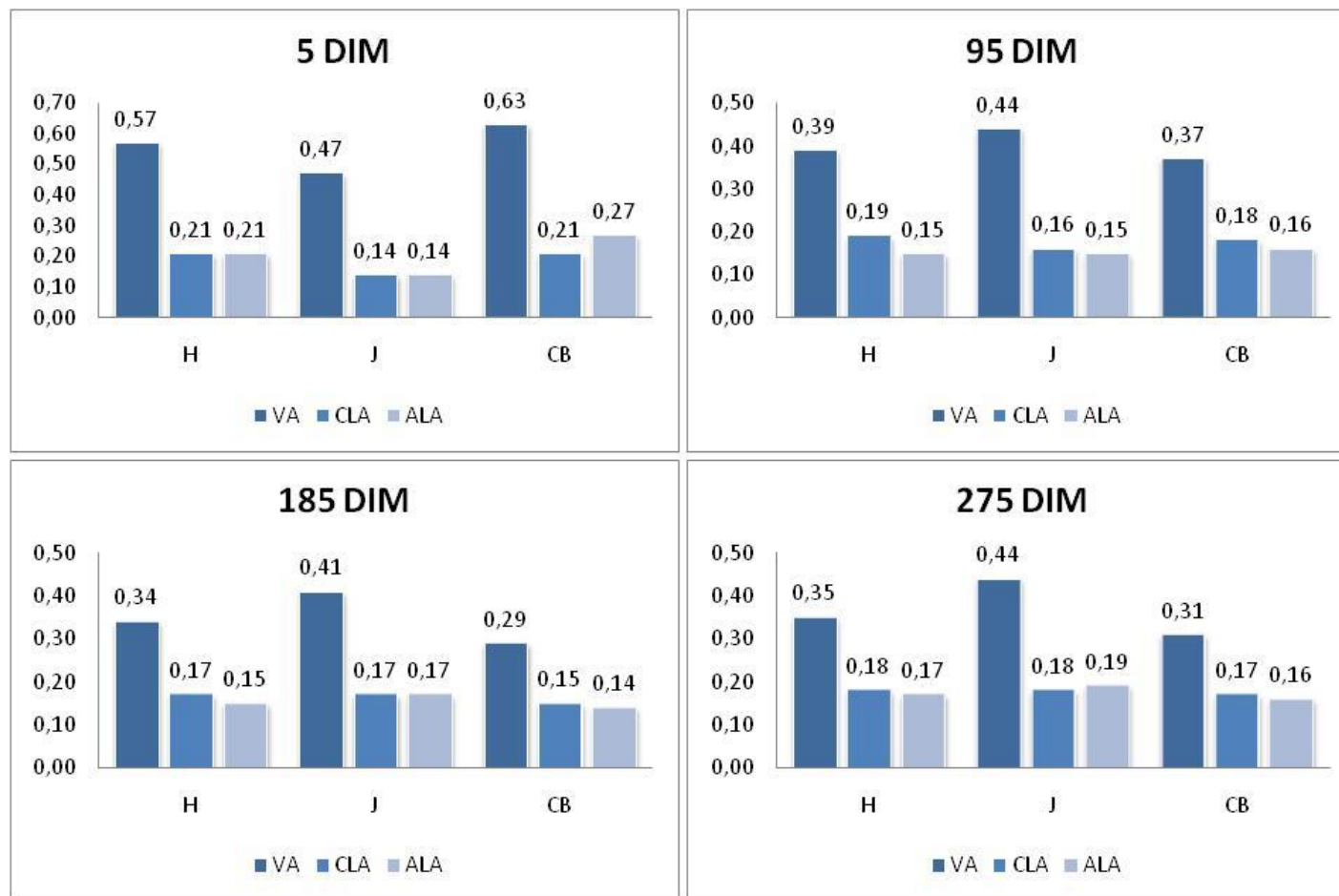
Kgwatalala *a kol.* (2009a) ve své studii zjistili, že zastoupení FA mléčného tuku kanadského holštýnského plemene se v závislosti na pořadí laktace příliš nelišilo. K podobným výsledkům dospěli také Bilal *a kol.* (2014), kteří uvedli, že existují sporné důkazy o vlivu pořadí laktace na zastoupení FA. Naopak Garnsworthy *a kol.* (2010) vliv pořadí laktace na zastoupení FA zaznamenali.

Kgwatalala *a kol.* (2009a) dále sledovali vliv stadia laktace. Laktaci rozdělili podle počtu dní (DIM, *day in milk*) na období časná (1-100 dní), střední (101-200 dní) a pozdní (201- více dní) a zjistili, že dojnice v časném období měly významně nižší obsah C10:0, C12:0, C16:0 a SFA a naopak významně vyšší obsah C18:1n9c, VA a PUFA v porovnání se středním a pozdním obdobím laktace.

Bastin *a kol.* (2011) uvedli, že profil FA se měnil během celé laktace, zejména pak v jejích prvních dnech. Změny jsou dle autorů způsobeny genetickým založením dojnice a vnějšími vlivy (např. výživa).

Bainbridge *a kol.* (2016) se ve své studii zaměřili na porovnání VA, CLA a ALA u dojnic holštýnského (H) a jerseykého (J) plemene, a u první generace kříženek holštýnského a jerseykého (CB) plemene. Laktaci rozdělili do čtyř období – 5, 95, 185 a 275 DIM. Z výsledků studie vyplynulo, že v případě H a CB bylo zastoupení VA a ALA vyšší v prvním období laktace (5 DIM) a v dalších obdobích (95, 185 a 275 DIM) spíše klesalo (*Graf 1*). Hodnoty CLA pak stadiem laktace ovlivněny téměř nebyly.

Graf 1 Zastoupení ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ mléka) kyseliny vakcenové (VA), konjugované linolové (CLA) a α -linolenové (ALA) u tří plemen dojníc (holštýnské – H, jerseyké – J a jejich kříženek – CB) během jednotlivých stadií laktace (5, 95, 185, 275 DIM); upraveno dle Bainbridge *a kol.* (2016).



Stoop *a kol.* (2009a) ve své studii zjistili, že stadium laktace a energetický stav dojnice významně ovlivňují složení mléčného tuku. Dle autorů mělo stadium laktace vliv na profil FA s výjimkou C5:0-C15:0 a C18:2n10t12c. Obsah C16:0 se dle autorů zvýšil mezi 80. a 150. dnem laktace (31,2, resp. 33,3 %) a poté zůstal relativně konstantní. Obsah SFA se v první polovině laktace zvyšoval, v druhé naopak snižoval (71,5, resp. 69,7 %). V mléce dojnic s negativní energetickou bilancí (NEB, *negative energy balance*) byl rovněž zjištěn nižší obsah C5:0-C15:0 a vyšší obsah C16:0 a C18:0 (Stoop *a kol.*, 2009a). Výsledky zjištěné autory naznačují možný nedostatek energie, změnu KD (nižší přísun sloučenin se třemi uhlíky – C3) během *de novo* syntézy a navíc také mobilizaci tukových rezerv. Všechny tyto změny jsou příznačné především pro začátek laktace.

Rozdíly v zastoupení FA jsou rovněž závislé na druhu zvířat (viz kapitola 5.1.1 – Kala *a kol.*, 2016a). V této studii jsme se zaměřili na porovnání zastoupení FA v mléčném tuku u dvou plemen dojnic a dvou plemen koz, a na vzájemné porovnání obou druhů mléčného tuku. Z výsledků vyplynulo, že zatímco mezi plemeny dojnic nebyly v zastoupení FA zjištěny statisticky významné rozdíly, v případě koz byl vliv plemene potvrzen pro ALA ($P < 0,01$), VA ($P < 0,001$) a UFA ($P < 0,01$). Ze srovnání dojnic a koz vyplynulo, že v porovnání s dojnicemi bylo v mléčném tuku koz zjištěno nižší zastoupení C16:0, vyšší zastoupení LA a ALA a výrazně vyšší zastoupení VFA. Tyto výsledky potvrdili také Barłowska *a kol.* (2011).

5.2 Polymorfismus genů souvisejících s obsahem a složením mléčného tuku

5.2.1 Publikace vztahující se k danému tématu (viz kapitola 12. Přílohy)

Hanuš, O., Samková, E., Křížová, L., Hasoňová, L., **Kala, R.** 2018. Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability – A review. *Molecules*, 1636, 23(7): 1-32.

Hanusová, L., Čítek, J., Samková, E., **Kala, R.**, Křížová, Z., Hanuš, O. 2018. Frekvence polymorfismů v genech *DGATI*, *FASN*, *LEP* a *SCDI* v dojené populaci skotu v České republice. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 170, 29(5): 31-34.

Čítek, J., Hanuš, O., Večerek, L., Samková, E., Hanusová, L., Křížová, Z., Jelínková, I., **Kala, R.** 2018a. Certifikovaná metodika QJ1510339 CM 181 – Izolace boviní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a Svazem výrobců mléka a.s. z 24. 9. 2018.* Datum certifikace: 8. 10. 2018.

Čítek, J., Večerek, L., Hanusová, L., Samková, E., Hanuš, O., Křížová, Z., Kávová, T., **Kala, R.** 2018b. Certifikovaná metodika QJ1510336 CM 1975 – Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Svazem výrobců mléka a.s. z 24. 9. 2018.* Datum certifikace: 8. 10. 2018.

Kala, R., Samková, E., Čítek, J., Hasoňová, L., Hanusová, L., Tothová, L. 2017. Association of selected genes with milk fat in two breeds of cattle. In: *24th International PhD Students Conference MendelNet 2017*. Brno, 8-9 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 696-701. ISBN 978-80-7509-529-9

Kala, R., Samková, E., Čítek, J. 2016b. Selected candidate genes affecting milk fatty acids. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 19 (Special Issue): 31-33.

5.2.2 Komentář k problematice

Obsah (%) i produkce (kg) tuku jsou významnými selekčními kritérii ve šlechtitelských programech skotu (Miglior *a kol.*, 2005). Složení mléčného tuku může také poskytnout informace o zdravotním stavu dojnice (van Haelst *a kol.*, 2008).

Dílčím cílem disertační práce bylo zjistit výskyt polymorfismu v lokusech souvisejících s biosyntézou mléčného tuku a FA u dojnic českého strakatého a holštýnského skotu. Disertační práce byla původně zaměřena především na geny *DGATI* a *SCDI*, v průběhu jejího zpracování však byla rozšířena i o sledování výskytu polymorfismu dalších genů souvisejících s mléčným tukem, a to *FASN* a *LEP*.

Také v této části disertační práce byla problematika zpracována rešeršní formou (viz kapitola 5.2.1 – Kala *a kol.*, 2016b; Hanuš *a kol.*, 2018) a výsledky jsou zpracované ve vědeckých publikacích (viz kapitola 5.2.1 – Kala *a kol.*, 2017; Hanusová *a kol.*, 2018).

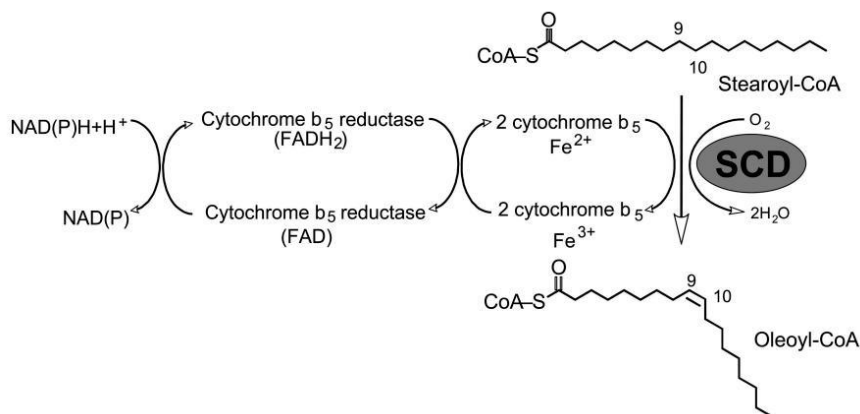
Rešeršní práce byly mj. zaměřeny na výskyt polymorfismu kandidátních genů ve vztahu k FA mléčného tuku a obsahují stručné shrnutí významných genů (*DGATI*, *SCDI*, *FASN*, *LEP*) včetně jejich souvislostí k ukazatelům mléčné užitkovosti, případně k jednotlivým FA. Následující text, získaný studiem literatury vztahující se k tomuto tématu, je doplněním problematiky, především s ohledem na obsah a složení mléčného tuku.

Mutace K232A v genu *DGATI* je odpovědná za variabilitu profilu FA na úrovni 50 % (Schennink *a kol.*, 2008). Řada autorů ve svých publikacích předpokládá, že polymorfismus K232A může být využit jako genetický marker při selekci kříženců plemen skotu – nizozemské holštýnské (Schennink *a kol.*, 2008; Bouwman *a kol.*, 2011), italské hnědé (Conte *a kol.*, 2010) či thajské holštýnské (Molee *a kol.*, 2012). Rovněž byly zjištěny možné pleiotropní účinky tohoto polymorfismu, např. *DGATI* a receptor růstového hormonu (*GHR*, *growth hormone receptor*) jsou spojovány s variabilitou reprodukčních znaků. Navíc, polymorfismus F279Y (konkrétně substituce *T* za *A* vedoucí k aminokyselinové záměně fenylalaninu na tyrosin v pozici 279) na exonu 8 bovinního *GHR* genu je spojován s produkcí a složením mléka (Blott *a kol.*, 2003).

SCDI je dalším genem, který ovlivňuje složení mléčného tuku a má významný vliv na profil FA, např. má hlavní roli při syntéze MUFA (**Obrázek 8**). Kgwatalala *a kol.* (2009b) prokázali, že alela *A* v polymorfismu A293V u genu *SCDI* pozitivně ovlivňuje C10:0, C12:0 a C14:0 u kanadského jerseykého plemene. Autoři uvádějí, že polymorfismus A293V může být použit jako genetický marker při selekci

plemene jersey se zaměřením na C10:0, C12:0 a C14:0. Bouwman *a kol.* (2011) zjistili podobnou spojitost mezi vyšším zastoupením C10:0, C12:0 a C14:0 a alelou A u holandského holštýnského plemene.

Obrázek 8 Biochemická dráha přenosu elektronů při desaturaci mastných kyselin pomocí enzymu SCD (stearoyl-CoA desaturáza).



Zdroj: Paton a Ntambi (2009)

Gen *FASN* má klíčovou roli v *de novo* syntéze FA (Wakil, 1989; Palmquist, 2006) a podílí se rovněž na syntéze LCFA (Roy *a kol.*, 2001). Bhuiyan *a kol.* (2009) uvádějí, že exony 39-42 v komplexu *FASN* jsou odpovědné za syntézu zejména C16:0. Komplex *FASN* dle Abeho *a kol.* (2009) kóduje také thioesterázovou (TE, *thioesterase*) doménu genu *FASN*, která reguluje ukončení syntézy FA. Jiní autoři pak zjistili vliv na obsah mléčného tuku (Roy *a kol.*, 2006) a adipózní tuk (Morris *a kol.*, 2007).

Gen *LEP* kóduje peptidový hormon leptin sekretovaný především bílými adipocyty (Zhang *a kol.*, 1994). Podílí se na regulaci příjmu krmiva (tzv. signál sytosti; Block *a kol.*, 2003) působením na centrální nervovou soustavu prostřednictvím specifických receptorů exprimovaných především v hypotalamu. Buchanan *a kol.* (2003) uvádějí, že SNP mutace (konkrétně substituce C za T vedoucí k aminokyselinové záměně argininu na cystein) na exonu 2 v genu *LEP* je spojována s ukazateli mléčné užitkovosti. Různé polymorfismy tohoto genu jsou dle dalších autorů spojovány s produkcí mléka v kg (Chebel *a kol.*, 2008; Kulig *a kol.*, 2009).

Polymorfismus genů *DGATI*, *SCD1*, *FASN* a *LEP* byl v rámci této disertační práce zkoumán nejen z pohledu genotypových a alelových frekvencí, ale také

s ohledem na vliv polymorfních variant těchto genů na ukazatele mléčné užitkovosti u dojnic na první laktaci.

V první publikaci (Kala *a kol.*, 2017) jsme se nejdříve zaměřili na analýzu genetické variability u českého strakatého skotu, holštýnského skotu, resp. jejich kříženek. Z výsledků vyplynulo, že ve sledované populaci byl u genu *DGATI* nejčtenější genotyp *AA* s převahou alely *A* (0,981, 0,986, resp. 0,956). U genu *FASN* byl nejčtenějším genotyp *GG* s převahou alely *G* (0,883, 0,831, resp. 0,884). V případě genu *LEP* byl nejčtenějším genotyp *MM* s převahou alely *M* (0,835, 0,870, resp. 0,902). U genů *DGATI* a *FASN* byly rozdíly mezi plemeny statisticky významné ($P < 0,01$).

V návaznosti na cíle disertační práce je v této části doplněna analýza genetické variability genu *SCDI* podle plemen (**Tabulka 7**), tedy výskyt polymorfismu u českého strakatého skotu, holštýnského skotu, resp. jejich kříženek. Z výsledků vyplynulo, že nejčtenějším genotypem byl *TC* (0,576, 0,599, resp. 0,567) s převahou alely *C* (0,541, 0,618, resp. 0,519). Zjištěné rozdíly byly statisticky významné ($P < 0,01$). V případě holštýnského plemene byl dále χ^2 testem potvrzen průkazný rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi na hladině významnosti $P < 0,05$. Inostroza *a kol.* (2013) dospěli k podobným výsledkům v případě plemene chilské holštýnské. Nejčtenější byl genotyp *TC* s převahou alely *C* nad *T* (0,620, resp. 0,380). Milanesi *a kol.* (2008) uvádějí, že alela *C* má spojitost s vyšší koncentrací MUFA.

Ve druhé publikaci, týkající se výskytu polymorfismu v dojené populaci skotu (Hanusová *a kol.*, 2018), byla provedena rovněž analýza genetické variability, a to pro geny *DGATI*, *SCDI*, *FASN* a *LEP*. Četnosti polymorfních variant byly sledovány bez ohledu na plemennou příslušnost. Výsledky zhruba odpovídají výše uvedeným četnostem zjištěným v rámci plemen.

Asociační analýza polymorfismu *SCDI* k ukazatelům mléčné užitkovosti také nebyla součástí obou výše zmíněných publikací, je proto uvedena v **Tabulce 8**. Kromě vztahu jednotlivých polymorfních variant genu *SCDI* (SNP T878C) a ukazatelů mléčné užitkovosti dojnic na první laktaci byl doplněn i vztah k ukazatelům mléčné užitkovosti dojnic na druhé laktaci.

Tabulka 7 Genotypové a alelové frekvence genu *SCD1* (stearoyl-CoA desaturáza 1) dle plemen dojnic.

| <i>SCD1</i> (n = 742) | Plemeno ¹ | | | | | | | | | | <i>P</i> ² | | | | | |
|--------------------------|----------------------|-----------|-----------|----------|----------|------------|-----------|-----------|----------|----------|-----------------------|-----------|-----------|----------|----------|--|
| | české strakaté | | | | | holštýnské | | | | | | kříženky | | | | |
| | genotyp | | | alela | | genotyp | | | alela | | | genotyp | | | alela | |
| | <i>TT</i> | <i>TC</i> | <i>CC</i> | <i>T</i> | <i>C</i> | <i>TT</i> | <i>TC</i> | <i>CC</i> | <i>T</i> | <i>C</i> | <i>TT</i> | <i>TC</i> | <i>CC</i> | <i>T</i> | <i>C</i> | |
| Pozorované | 44 | 148 | 65 | 236 | 278 | 27 | 196 | 104 | 250 | 404 | 31 | 90 | 37 | 152 | 164 | |
| Relativní | 0,171 | 0,576 | 0,253 | 0,459 | 0,541 | 0,083 | 0,599 | 0,318 | 0,382 | 0,618 | 0,196 | 0,567 | 0,234 | 0,481 | 0,519 | |
| Očekávané | 0,211 | 0,497 | 0,293 | - | - | 0,146 | 0,472 | 0,382 | - | - | 0,231 | 0,499 | 0,269 | - | - | |
| χ^2 | 2,560 ^{ns} | | | | | 7,208* | | | | | 1,912 ^{ns} | | | | | |

Materiál a metodika je uvedena v publikaci Kala *a kol.* (2017); ¹české strakaté, holštýnské a kříženky (s převahou českého strakatého plemene – 87 %); ²*P* – hladina významnosti (ns = nevýznamné, * = *P*<0,05, ** = *P*<0,01); χ^2 – chí kvadrát test mezi relativními a očekávanými genotypovými četnostmi;

Tabulka 8 Ukazatele mléčné užitkovosti ($\bar{x} \pm s_x$) jednotlivých genotypů genu *SCD1* (stearoyl-CoA desaturáza 1) u dojnic¹.

| n | 1. laktace | | | <i>P</i> ² | 2. laktace | | | <i>P</i> ² |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | <i>TT</i> | <i>TC</i> | <i>CC</i> | | <i>TT</i> | <i>TC</i> | <i>CC</i> | |
| DIM³ | 292 ± 30 | 294 ± 28 | 296 ± 27 | ns | 289 ± 33 | 288 ± 42 | 282 ± 57 | ns |
| Mléko (kg) | 7265 ^b ± 1826 | 8113 ^a ± 2214 | 8261 ^a ± 2156 | *** | 8053 ^b ± 2245 | 8788 ^a ± 2556 | 8940 ^a ± 2920 | * |
| Tuk (kg) | 298,5 ^b ± 72,5 | 333,8 ^a ± 90,5 | 337,0 ^a ± 83,9 | *** | 329,8 ^b ± 90,4 | 362,2 ^a ± 107,4 | 363,9 ^a ± 117,6 | * |
| Tuk (%) | 4,13 ± 0,32 | 4,13 ± 0,32 | 4,10 ± 0,34 | ns | 4,11 ± 0,34 | 4,13 ± 0,39 | 4,10 ± 0,40 | ns |
| Bílkoviny (kg) | 254,0 ^b ± 55,7 | 277,8 ^a ± 67,3 | 278,7 ^a ± 62,4 | ** | 281,9 ± 68,9 | 304,5 ± 82,9 | 305,4 ± 92,1 | ns |
| Bílkoviny (%) | 3,53 ^c ± 0,22 | 3,46 ^b ± 0,22 | 3,41 ^a ± 0,24 | *** | 3,54 ^b ± 0,22 | 3,49 ^{ab} ± 0,23 | 3,45 ^a ± 0,25 | * |

Materiál a metodika je uvedena v publikaci Kala *a kol.* (2017); ¹české strakaté, holštýnské a kříženky (s převahou českého strakatého plemene – 87 %); ²*P* – hladina významnosti (ns = nevýznamné, * = *P*<0,05, ** = *P*<0,01, *** = *P*<0,001); ^{abc}průměry s odlišnými horními indexy u jednotlivých genotypů lišící se na hladině významnosti *P*<0,05; ³DIM – dny laktace;

Statisticky významné rozdíly byly zjištěny v případě produkce mléka (kg) a tuku (kg) a obsahu bílkovin (%) u dojnic na první i druhé laktaci. Nejvyšší hodnoty byly zjištěny u genotypu *CC*, a to v případě produkce mléka (8261, resp. 8940 kg) i tuku (337,0, resp. 363,9 kg). Navíc, u dojnic na první laktaci byla zjištěna statistická významnost v případě produkce bílkovin (254,0, 277,8, resp. 278,7 kg; $P < 0,01$). Asadollahpour Nanaei *a kol.* (2014) uvádějí, že SNP u genu *SCD1* (T878C) ovlivnila ukazatele mléčné užitkovosti – produkci mléka (kg), tuku (kg) a bílkovin (kg). SNP (T878C) byl lokalizován v exonu 5 a zabývali se jím také Taniguchi *a kol.* (2004) nebo Inostroza *a kol.* (2013), kteří zkoumali vliv jednotlivých *SCD1* genotypů (*TT*, *TC*, *CC*) na zastoupení MUFA (C14:1, C16:1, C18:1n9c, CLA aj.) v mléčném tuku chilského holštýnského skotu.

Komisarek a Dorynek (2009) se zabývali dalším SNP (A293V) genu *SCD1* ovlivňujícím odhadované plemenné hodnoty (EBV, *estimated breeding value*) pro produkční znaky (produkce mléka, tuku a bílkovin v kg a obsah tuku a bílkovin v %) u plemenných býků polského holštýnského skotu. Z uvedených ukazatelů byl zjištěn vliv tohoto SNP pouze na obsah tuku (%).

Dílčím cílem bylo rovněž zjistit možnosti izolace bovinní genomové DNA z mléka (viz kapitola 5.2.1 – Čítek *a kol.*, 2018a). Dosud byla DNA izolována většinou z krve, popř. býčího spermatu, méně často pak z tkání (např. svalová). Záměrem bylo izolovat DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků. Z našich výsledků vyplynulo, že izolace DNA ze vzorků mléka je možná. Metodika uvádí několik postupů, např. izolaci DNA pomocí chelexu.

Předešlý dílčí cíl zabývající se možnostmi izolace DNA z mléka plynule navazuje na studium genetického polymorfismu ve vztahu ke kvalitě kravského mléka (viz kapitola 5.2.1 – Čítek *a kol.*, 2018b). Genotypizace prováděná na genové úrovni pomocí metod molekulární genetiky je popsána u genů, jimiž se disertační práce zabývá – *DGATI* a *SCD1*. Rovněž je popsána genotypizace genů *LEP* a *AGPAT6*. Podkladem pro optimalizaci metod byly studie Wintera *a kol.* (2002) v případě *DGATI* a Inostrozy *a kol.* (2013) v případě genu *SCD1*.

5.3 Metody stanovení mastných kyselin mléčného tuku

5.3.1 Publikace vztahující se k danému tématu (viz kapitola 12. Přílohy)

Kala, R., Samková, E., Pecová, L., Hanuš, O., Sekmokas, K., Riaukienė, D. 2018b. An overview of determination of milk fat: Development, quality control measures and application. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 105, 66(4): 1055-1064.

Samková, E., **Kala, R.**, Hasoňová, L., Pecová, L., Hanuš, O. 2018b. Využití rutinního stanovení mastných kyselin při odhadu heritability. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 168, 29(3): 13-16.

Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Klimešová, M., Hasoňová, L., Jedelská, R., Trávníček, J., Kopecký, J., **Kala, R.**, Elich, O. 2017. Certifikovaná metodika QJ1510336 RO1417 CM 35 – Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Českomoravskou společností chovatelů a.s. z 27. 9. 2017. Datum certifikace: 22. 12. 2017.*

Hanuš, O., Samková, E., Špička, J., Hasoňová, L., **Kala, R.**, Klímová, Z., Kopunecz, P., Kopecký, J. 2015. Porovnání metod používaných při stanovení zastoupení zdravotně významných mastných kyselin mléčného tuku v bazénových vzorcích mléka dojníc. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 151, 26: 12-15.

Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., **Kala, R.**, Koubová, J., Smetana, P., Hasoňová, L., Křížová, Z., Klímová, Z., Kopunecz, P., Kopecký, J. 2015. Porovnání metod stanovení mastných kyselin v mléce. *Náš chov*, 75(9): 74-76.

5.3.2 Komentář k problematice

Současné metody využívané pro analýzu vybraných kvalitativních parametrů mléka jsou citlivé a přesné. Patří mezi ně především plynová chromatografie (GC), hmotnostní spektrometrie (MS, *mass spectrometry*) či spektroskopické techniky, mezi něž je řazena fluorescenční spektroskopie, infračervená spektroskopie v blízké (NIR, *near-infrared spectroscopy*) a střední (MIR) oblasti spektra nebo nukleární magnetická rezonance (NMR). Spektroskopické techniky jsou využívány především proto, že jsou rychlé a relativně přesné. Kamal a Karoui (2015) dále uvádějí, že tyto techniky nevyžadují přípravu vzorků a jsou jednoduché na provedení (podrobněji v kapitole 2.5.1).

V publikaci typu review (viz kapitola 5.3.1 – Kala *a kol.*, 2018b) bylo naším záměrem zpracovat přehled současných metod využívaných pro stanovení mléčného tuku, jejich vývoj a možnosti aplikace. Průzkumem bylo zjištěno, že rutinní metody je možné využít pro stanovení mléčného tuku s velmi dobrými výsledky. Ty mohou být ověřeny metodami referenčními. Stanovením mléčného tuku, popř. stanovením FA se zabývali také např. Brondz (2002) či Karoui a de Baerdemaeker (2007).

Dílčím cílem disertační práce bylo zjistit možnosti stanovení FA pomocí rutinní metody (MIR) a porovnat je se stanovením FA referenční metodou (GC). V oblasti rutinních spektroskopických technik bylo průlomem zavedení IR spektroskopů s Fourierovými transformacemi v 70. letech 20. století (Dvořák *a kol.*, 2016), což umožnilo rozvoj metody MIR a její následné využití pro stanovení FA.

Nejpřesnější metodou je stále GC (často v kombinaci s FID). Metoda je vhodná např. pro detekci falšování mléčných produktů (Fadzillillah *a kol.*, 2013) nebo pro stanovení zastoupení FA v mléce a mléčných produktech (Pujolras *a kol.*, 2015). Její nevýhodou je však poměrně náročná příprava vzorků spočívající v hydrolýze a následné methylaci FA (Aldai *a kol.*, 2005).

V rámci disertační práce jsme provedli porovnání obou metod, a to jak u bazénových vzorků, tak u individuálních vzorků mléka. Dílčí výsledky byly publikovány již v roce 2015 (viz kapitola 5.3.1 – Hanuš *a kol.*, 2015; Samková *a kol.*, 2015).

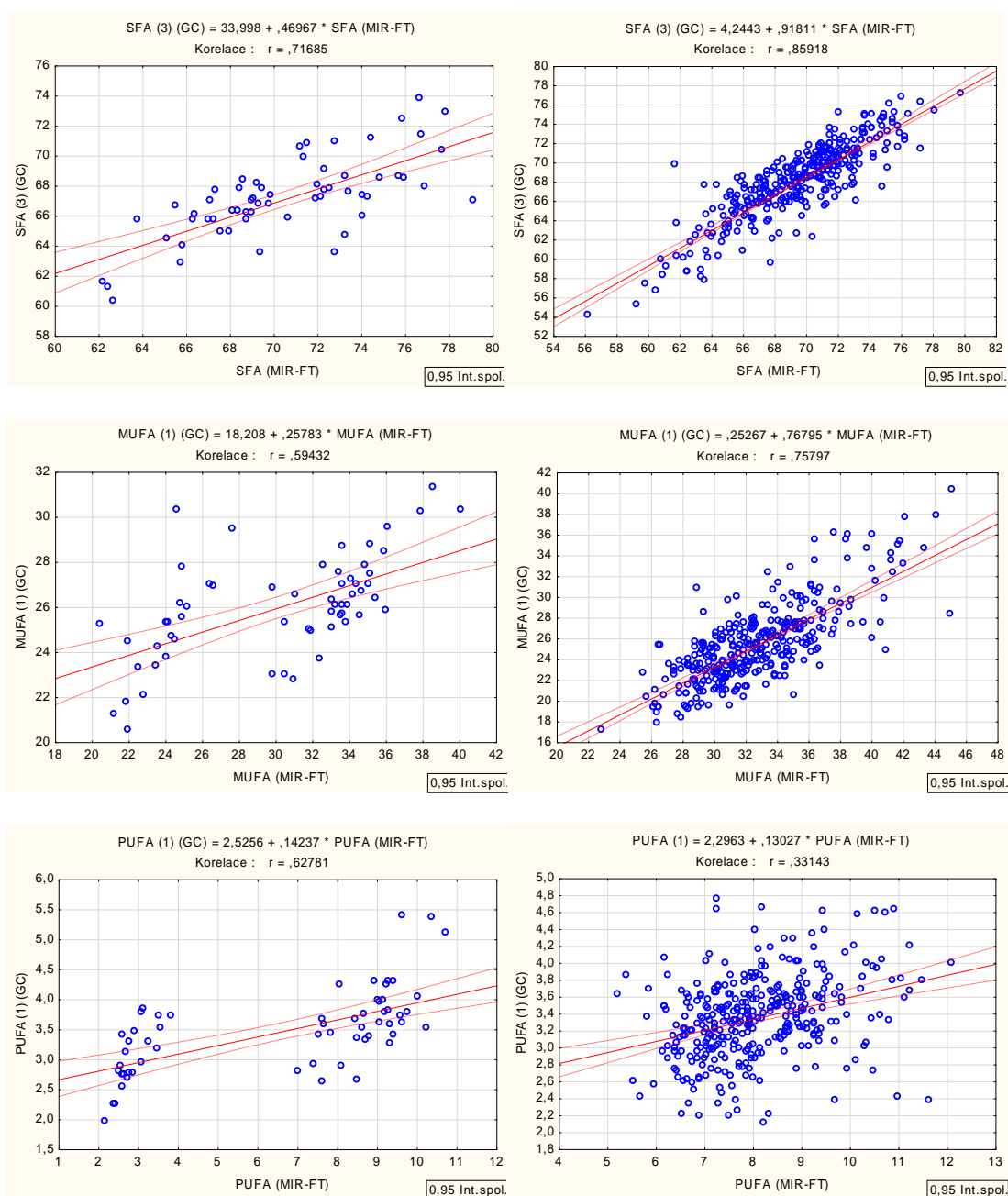
Z výsledků analýz bazénových vzorků vyplynulo, že některé skupiny FA (např. UFA) lze stanovovat s vysokou mírou věrohodnosti (Hanuš *a kol.*, 2015). Výsledky zjištěné v případě TFA však tolik průkazné nebyly, což potvrzují hodnoty R^2 vypočítané u obou skupin ze zjištěných korelačních koeficientů (88, resp. 35 %).

U individuálních vzorků jsme rovněž potvrdili vysokou míru věrohodnosti stanovení u některých skupin FA (Samková *a kol.*, 2015). V případě SFA byla zjištěna hodnota R^2 (71 %). K podobným závěrům dospěli také Ferrand-Calmels *a kol.* (2014), kteří rovněž využili metodu MIR pro stanovení FA a jejich skupin.

Databáze výše uvedených výsledků z referenční a rutinní analýzy byla v průběhu dalších let rozšířena a její vyhodnocení se stalo součástí certifikované metodiky (viz kapitola 5.3.1 – Samková *a kol.*, 2017). Závěry této certifikované metodiky prakticky korespondují se závěry obou pilotních studií. Hodnota R^2 byla

v případě bazénových vzorků nejvyšší u skupiny SFA, nejnižší pak u skupiny MUFA (51,4, resp. 35,3 %; $P < 0,001$). Hodnota R^2 u skupiny PUFA byla 39,4 % ($P < 0,001$). U individuálních vzorků byly nejvyšší hodnoty zjištěny rovněž u SFA, nejnižší však u PUFA (73,8, resp. 11,0 %; $P < 0,001$). U skupiny MUFA byla zjištěna hodnota R^2 57,5 % ($P < 0,001$). Zjištěné výsledky R^2 dokládají grafy regresní analýzy (**Graf 2**).

Graf 2 Výsledky regresní analýzy mezi metodou plynové chromatografie (GC) a infračervené spektroskopie s Fourierovými transformacemi (MIR-FT) u vybraných skupin mastných kyselin; levý sloupec – bazénové vzorky mléka (n = 60), pravý sloupec – individuální vzorky mléka (n = 345).



Jedním z praktických využití stanovení FA pomocí MIR by mohly být odhady heritability pro jednotlivé FA (viz kapitola 5.3.1 – Samková *a kol.*, 2018b). Z provedené metaanalýzy, do níž bylo zahrnuto 8 studií odhadu heritability FA stanovených metodou GC, metodou MIR či kombinací obou metod vyplynulo, že hodnoty heritability byly vyšší u metody MIR. Závěry potvrzují Poulsen *a kol.* (2014), kteří pro stanovení FA využili obě metody.

6. Závěry

V této disertační práci byly posouzeny faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin mléčného tuku (genetické založení, pořadí a stadium laktace) u českého strakatého a holštýnského skotu a jejich kříženců. Dále byl vyhodnocen výskyt polymorfismu v lokusech souvisejících s obsahem a složením mléčného tuku a byla posouzena vhodnost rutinní metody pro stanovení mastných kyselin.

Z uvedených studií vyplývají následující závěry:

- Výsledky potvrdily, že zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku se mění v závislosti na biologických faktorech, a to s různou mírou intenzity. Významnou roli hrála především variabilita uvnitř plemene a stadium laktace. Uvedené poznatky je možné využít při výběru mléka se specifickým profilem mastných kyselin (např. vyšší zastoupení nutričně prospěšných mastných kyselin). V tomto případě by se však jednalo spíše o menší chovy.
- U dojnic českého strakatého a holštýnského skotu byly zjištěny četnosti polymorfních variant genů *DGATI*, *FASN*, *LEP* a *SCDI*, které souvisejí s biosyntézou mléčného tuku a mastných kyselin. Homozygotní genotypy s převahou dominantních alel *A*, *G* a *M* byly potvrzeny u genů *DGATI*, *FASN* a *LEP*. V případě *SCDI* byl jak u českého strakatého, tak holštýnského plemene jako nejčtenější zjištěn heterozygotní genotyp *TC* s převahou alely *C*, která je spojována s vyšším zastoupením nutričně prospěšných mononenasyčených mastných kyselin. Na základě studia problematiky lze usuzovat, že další vědecká práce v této oblasti má do budoucna potenciál, který by mohl vést ke zlepšení profilu mastných kyselin.
- V souvislosti s ukazateli mléčné užitkovosti byl vyhodnocen vztah polymorfismu genů *DGATI*, *FASN*, *LEP* a *SCDI*. Byla potvrzena souvislost mezi produkcí tuku (kg) a geny *DGATI* a *SCDI*. Zjištěné výsledky mohou být využity ve šlechtitelských programech pro selekci jedinců zaměřených na mléčnou produkci.

- Bylo zjištěno, že pomocí rutinní metody lze stanovovat některé skupiny mastných kyselin v individuálních i bazénových vzorcích mléka s vysokou mírou věrohodnosti. Na základě zjištěných výsledků byla připravena certifikovaná metodika „*Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku*“. Její součástí jsou výsledky porovnání rutinní a referenční metody, z kterých lze usuzovat, že MIR-FT má velmi dobrou vypovídací schopnost a je vhodná pro použití v mlékárenských provozech či akreditovaných laboratořích pro analýzu mléka, jako nepřímá metoda pro stanovení mastných kyselin, resp. jejich skupin.
- Bylo zjištěno, že izolace genomové DNA z mléka je možná. Na základě zjištěných výsledků byla připravena certifikovaná metodika „*Izolace bovinní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků*“. V návaznosti na metody izolace DNA z mléka byla připravena také certifikovaná metodika „*Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka*“. Součástí obou metodik jsou laboratorní postupy izolace DNA a genotypizace vybraných genů souvisejících s biosyntézou mléčného tuku. Tyto laboratorní postupy jsou použitelné v laboratořích zabývajících se analýzou genetického založení skotu pomocí metod molekulární biologie.

7. Souhrn

Cílem práce bylo vyhodnocení vlivu biologických faktorů na zastoupení mastných kyselin mléčného tuku u vybraných plemen skotu (český strakatý a holštýnský), na jehož základě by bylo možné navrhnout praktické postupy k pozitivní modifikaci mléčného tuku – zvýšení obsahu nutričně prospěšných mastných kyselin. Dále bylo cílem vyhodnotit výskyt polymorfismu v lokusech souvisejících s obsahem a složením mléčného tuku a posoudit vhodnost rutinní metody pro stanovení mastných kyselin. Podklady pro disertační práci tvoří publikace zabývající se vlivem výše zmíněných faktorů a metod stanovení na zastoupení mastných kyselin mléčného tuku. Součástí práce jsou rovněž aplikované výsledky (certifikované metodiky zabývající se studiem mastných kyselin, jejich stanovením a analytickými postupy). Uvedené prameny byly součástí řešení projektů, které probíhaly na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Materiál a metodika je popsána v příložených publikacích. Výsledky práce potvrzují, že největší vliv na zastoupení mastných kyselin má především změna krmné dávky a genetické založení dojnic. Z výsledků dále vyplývá, že další studium v oblasti kandidátních genů, které se podílejí na složení mléčného tuku, jeho kvalitě a syntéze, může být pro chovatele a následně i zpracovatele mléka přínosné. Předpokládá se, že kandidátní geny mohou mít vliv na technologické vlastnosti mléčného tuku, což je významné především z hlediska jeho dalšího zpracování pro mlékárenský průmysl. Rovněž bylo zjištěno, že pro rutinní stanovení mastných kyselin lze u některých skupin, jako jsou např. nasycené či nenasycené mastné kyseliny, využít infračervenou spektroskopii ve střední oblasti spektra.

8. Summary

The aim of the thesis, was to evaluate the effect of animal factors on the fatty acid composition of milk fat in Czech Fleckvieh and Holstein in the Czech Republic. This enables the application of practical procedures for modification of milk fat and increase of nutritionally desirable fatty acids. Furthermore, the aim of the thesis was to evaluate the occurrence of polymorphisms in loci related to milk fat content and composition, and to assess the suitability of a routine method for the determination of fatty acids. The thesis is based on publications focused on the influence of the above-mentioned factors and methods of measurements of fatty acid composition of milk fat. Part of the thesis are also the certified methodologies focused on the study of fatty acids, their determination and analytical procedures. The mentioned papers and applied methodologies were part of the projects that were made at the University of South Bohemia in České Budějovice in the Faculty of Agriculture. The papers and methodologies are described in the attached publications. The results of the study confirmed that the most important effect on the fatty acid composition is mainly the feed ration and further genetic disposition. The results also show that further study of candidate genes involved in the composition of milk fat, its quality and synthesis can be beneficial for breeders and subsequently for milk producers. Candidate genes are assumed to have an impact on the technological properties of milk fat, which is particularly important for its further processing. It has also been found that for the routine determination of fatty acids, in some groups such as saturated or unsaturated fatty acids, the use of infrared spectroscopy in the middle of the spectrum is possible.

9. Literatura

1. Abdel-Rahman, S. 2017. Detection of adulteration and identification of meat and milk species using molecular genetic techniques. *Agrotechnology*, 6: 4.
2. Abe, T., Saburi, J., Hasebe, H., Nakagawa, T., Misumi, S., Nade, T., Nakajima, H., Shoji, N., Kobayashi, M. and Kobayashi, E. 2009. Novel mutations of the *FASN* gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. *Biochemical Genetics*, 47: 397-411.
3. AbuGhazaleh, A.A., Felton, D.O., Ibrahim, S.A. 2007. Milk conjugated linoleic acid response to fish oil and sunflower oil supplementation to dairy cows managed under two feeding systems. *Journal of Dairy Science*, 90: 4763-4769.
4. Aldai, N., Murray, B.E., Najera, A.I., Troy, D.J., Osoro, K. 2005. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1073-1083.
5. AOAC. 1997. *Fat (total, saturated, and monounsaturated) in foods hydrolytic extraction gas chromatographic method. Official methods of analysis MD.* AOAC Official Method 996.06. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists International.
6. AOCS. 2007. *Determination of cis-, trans-, Saturated, Monounsaturated, and Polyunsaturated Fatty Acids in Dairy and Ruminant Fats by Capillary GLC.* Official Method Ce 1j-07. Urbana: The American Oil Chemists' Society.
7. Asadollahpour Nanaei, H., Ansari Mahyari, S., Edriss, M.A. 2014. Effect of *LEPR*, *ABCG2* and *SCD1* gene polymorphisms on reproductive traits in the Iranian Holstein cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 49: 769-774.
8. Ashes, J.R., Gulati, S.K., Scott, T.W. 1997. Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *Journal of Dairy Science*, 80: 2204-2212.
9. Attaie, R., Richter, R.L. 2000. Size distribution of fat globules in goat milk. *Journal of Dairy Science*, 83: 940-944.

10. Bainbridge, M.L., Cersosimo, L.M., Wright, A.D.G., Kraft, J. 2016. Content and Composition of Branched-Chain Fatty Acids in Bovine Milk are Affected by Lactation Stage and Breed of Dairy Cow. *Plos One*, 11: 3.
11. Ballesteros, E., Cardenas, S., Gallego, M., Valcarcel, M. 1994. Determination of free fatty-acids in dairy-products by direct coupling of a continuous preconcentration ion-exchange-derivatization module to a gas-chromatograph. *Analytical Chemistry*, 66: 628-634.
12. Barłowska, J., Sz wajkowska, M., Litwińczuk, Z., Król, J. 2011. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 291-302.
13. Bastin, C., Gengler, N., Soyeurt, H. 2011. Phenotypic and genetic variability of production traits and milk fatty acid contents across days in milk for Walloon Holstein first parity cows. *Journal of Dairy Science*, 94: 4152-4163.
14. Bastin, C., Soyeurt, H., Gengler, N. 2013. Genetic parameters of milk production traits and fatty acid contents in milk for Holstein cows in parity 1–3. *Journal of Animal Breeding Genetics*, 130: 118-127.
15. Baum, S.J., Hamm, A. 2012. Fatty acids and their derivatives in cardiovascular disease: Arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids and their by products, the eicosanoids and docosanoids. *Current Cardiovascular Risk Reports*, 6: 146-154.
16. Bauman, D.E., Griinari, J.M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 23: 203-227.
17. Bauman, D.E., Mather, I.H., Wall, R.J., Lock, A.L. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science*, 89: 1235-1243.
18. Belton, P.S. 1997. Spectroscopic approaches to the measurement of food quality. *Pure and Applied Chemistry*, 69: 47-50.
19. Bernard, L., Leroux, C., Chilliard, Y. 2006. *Characterization and Nutritional Regulation of the Main Genes in the Lactating Mammary Gland*. In: Sejrsen, K., Hvelplund, T., Nielsen, M.O. (eds). *Ruminant Physiology. Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*. 1. vydání. Wageningen: Wageningen Academic Publisher, s. 295-326. ISBN 978-90-76998-64-0

20. Bhuiyan, M.S.A., Yu, S.L., Jeon, J.T., Yoon, D., Cho, Y.M., Park, E.W., Kim, N.K., Kim, K.S., Lee, J.H. 2009. DNA Polymorphisms in *SREBF1* and *FASN* Genes Affect Fatty Acid Composition in Korean Cattle (Hanwoo). *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 22: 765-773.
21. Biggs, D.A. 1967. Milk analysis with the infrared milk analyzer. *Journal of Dairy Science*, 50: 799-803.
22. Bilal, G., Cue, R.I., Mustafa, A.F., Hayes, J.F. 2012. Short communication: Estimates of heritabilities and genetic correlations among milk fatty acid unsaturation indices in Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 95: 7367-7371.
23. Bilal, G., Cue, R.I., Mustafa, A.F., Hayes, J.F. 2014. Effects of parity, age at calving and stage of lactation on fatty acid composition of milk in Canadian Holsteins. *Canadian Journal of Animal Science*, 94: 401-410.
24. Bionaz, M., Loor, J.J. 2008a. *ACSL1*, *AGPAT6*, *FABP3*, *LPIN1*, and *SLC27A6* are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. *Journal of Nutrition*, 138: 1019-1024.
25. Bionaz, M., Loor, J.J. 2008b. Genetic network driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics*, 9: 366.
26. Bittante, G., Cecchinato, A. 2013. Genetic analysis of the Fourier-transform infrared spectra of bovine milk with emphasis on individual wavelengths related to specific chemical bonds. *Journal of Dairy Science*, 96: 5991-606.
27. Block, S.S., Smith, J.M., Ehrhardt, R.A., Diaz, M.C., Rhoads, R.P., van Amburgh, M.E., Boisclair, Y.R. 2003. Nutritional and developmental regulation of plasma leptin in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 86: 3206-3214.
28. Blott, S., Kim, J.J., Moiso, S., Schmidt-Küntzel, A., Cornet, A., Berzi, P., Cambisano, N., Ford, C., Grisart, B., Johnson, D., Karim, L., Simon, P., Snell, R., Spelman, R., Wong, J., Vilkki, J., Georges, M., Farnir, F., Coppieters, W. 2003. Molecular dissection of a quantitative trait locus: A phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics*, 163, 253-266.
29. Bobe, G., Zimmerman, S., Hammond, E.G., Freeman, A.E., Porter, P.A., Luhman, C.M., Beitz, D.C. 2007. Butter Composition and Texture from Cows

- with Different Milk Fatty Acid Compositions Fed Fish Oil or Roasted Soybeans. *Journal of Dairy Science*, 90: 2596-2603.
30. Bouwman, A.C., Bovenhuis, H., Visker, M.H., van Arendok, J.A. 2011. Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle. *BMC Genetics*, 12: 43.
 31. Brondz, I. 2002. Review: Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 465: 1-37.
 32. Buchanan, F.C., van Kessel, A.G., Waldner, C., Christensen, D.A., Laarveld, B., Schmutz, S.M. 2003. An association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *Journal of Dairy Science*, 86: 3164-3166.
 33. Buitenhuis, B., Janss, L.L.G, Poulsen, N.A., Larsen, L.B., Larsen, M.K., Sørensen, P. 2014. Genome-wide association and biological pathway analysis for milk-fat composition in Danish Holstein and Danish Jersey cattle. *BMC Genomics*, 15: 1112.
 34. Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W., Myers, H.M., Lear, S.R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C.B., Lusi, A.J., Erickson, S.K., Farese Jr., R.V. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 13018-13023.
 35. Claesson, S. 1946. Studies on adsorption and adsorption analysis with special reference to homologous series. *Arkiv for Kemi Mineralogi och Geologi*, 23: 1-45.
 36. Coates, J. 2000. *Interpretation of infrared spectra, a practical approach*. In: Meyers, R.A. (ed.). *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation*. 1. vydání. New York: John Wiley & Sons, s. 10815-10837. ISBN 978-0471976707
 37. Coitinho, T.B., Cassoli, L.D., Cerqueira, P.H.R., da Silva, H.K., Coitinho, J.B., Machado, P.F. 2017. Adulteration identification in raw milk using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 54: 2394-2402.
 38. Coleman, R.A., Mashek, D.G. 2011. Mammalian triacylglycerol metabolism: Synthesis, lipolysis, and signaling. *Chemical Reviews*, 111: 6359-6386.

39. Collomb, M., Spahni, M. 1996. Revue des méthodes de dosage des produits de d'oxydation des lipides, principalement des lipides des produits laitiers. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung*, 25: 3-24.
40. Conte, G., Mele, M., Chessa, S., Castiglioni, B., Serra, A., Pagnacco, G., Secchiari, P. 2010. Diacylglycerol acyltransferase 1, stearoyl-CoA desaturase 1 and sterol regulatory element binding protein 1 gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Italian Brown cattle. *Journal of Dairy Science*, 93: 753-763.
41. Conte, G., Serra, A., Cremonesi, P., Chessa, S., Castiglioni, B., Cappucci, A., Bulleri, E., Mele, M. 2016. Investigating mutual relationship among milk fatty acids by multivariate factor analysis in dairy cows. *Livestock Science*, 188: 124-132.
42. Couvreur, S., Hurtaud, C. 2017. Relationships between milks differentiated on native milk fat globule characteristics and fat, protein and calcium compositions. *Animal*, 11: 507-518.
43. Čítek, J., Hanuš, O., Večerek, L., Samková, E., Hanusová, L., Křížová, Z., Jelínková, I., Kala, R. 2018a. Certifikaovaná metodika QJ1510339 CM 181 – Izolace bovinní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikaované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékařským s.r.o. Praha a Svazem výrobců mléka a.s. z 24. 9. 2018. Datum certifikace: 8. 10. 2018.*
44. Čítek, J., Večerek, L., Hanusová, L., Samková, E., Hanuš, O., Křížová, Z., Kávová, T., Kala, R. 2018b. Certifikaovaná metodika QJ1510336 CM 1975 – Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikaované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Svazem výrobců mléka a.s. z 24. 9. 2018. Datum certifikace: 8. 10. 2018.*
45. Day, D.T. 1897. A suggestion as to the origin of Pennsylvania petroleum. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 36: 112-115.
46. de Man, J.M., Beers, A.M. 1987. Review: Fat crystal networks: Structure and rheological properties. *Journal of Texture Studies*, 18: 303-318.
47. de Marchi, M., Toffanin, V., Cassandro, M., Penasa, M. 2014. Invited review: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits. *Journal of Dairy Science*, 97: 1171-1186.

48. Delmonte, P., Fardin-Kia, A.R., Kramer, J.K.G., Mossoba, M.M., Sidisky, L., Tyburczy, C., Rader, J.I. 2012. Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat. *Journal of Chromatography A*, 1233: 137-146.
49. Dewhurst, R.J., Shingfield, K.J., Lee, M.R.F., Scollan, N.D. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, 131: 168-206.
50. Dhiman, T.R., Anand, G.R., Satter, L.D., Pariza, M.W. 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science*, 82: 2146-2156.
51. Dhiman, T.R., Nam, S.H., Ure, A.L. 2005. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 463-482.
52. Dvořák, L., Šustová, K., Mlček, J. 2016. Blízká infračervená spektroskopie jako pomocník při kontrole kvality potravin. *Chemické Listy*, 110: 868-873.
53. Elgersma, A. 2015. Grazing increases the unsaturated fatty acid concentration of milk from grass-fed cows: A review of the contributing factors, challenges and future perspectives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117: 1345-1369.
54. Elgersma, A., Tamminga, S., Ellen, G. 2006. Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*, 131: 207-225.
55. Ellis, D.I., Goodacre, R. 2006. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: Biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst*, 131: 875-885.
56. Elwood, P.C., Pickering, J.E., Givens, D.I., Gallacher, J.E. 2010. The consumption of milk and dairy foods and the incidence of vascular disease and diabetes: An overview of the evidence. *Lipids*, 45: 925-939.
57. Ewida, R.M., Abd El-Magiud, D.S.M. 2018. Species adulteration in raw milk samples using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Veterinary World*, 11: 830-833.
58. Fadzillillah, N.A., Rohman, A., Ismail, A., Mustafa, S., Khatib, A. 2013. Application of FTIR-ATR spectroscopy coupled with multivariate analysis for rapid estimation of butter adulteration. *Journal of Oleo Science*, 62: 555-562.

59. Ferlay, A., Martin, B., Pradel, P., Coulon, J.B., Chilliard, Y. 2006. Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentaise and Montbéliarde cow breeds. *Journal of Dairy Science*, 89: 4026-4041.
60. Ferrand-Calmels, M., Palhière, I., Brochard, M., Leray, O., Astruc, J.M., Aurel, M.R., Barbey, S., Bouvier, F., Brunschwig, P., Caillat, H., Douguet, M., Faucon-Lahalle, F., Gelé, M., Thomas, G., Trommenschlager, J.M., Larroque, H. 2014. Prediction of fatty acid profiles in cow, ewe, and goat milk by mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 97: 17-35.
61. Firl, N., Kienberger, H., Rychlik, M. 2014. Validation of the sensitive and accurate quantitation of the fatty acid distribution in bovine milk. *International Dairy Journal*, 35: 139-144.
62. Foss. 2009. *CombiFoss™ 7. MilkoScan™ 7 RM (FTIR)*. [Online]. Dostupné z: <https://www.fossanalytics.com/en/products/combifoss7#TechnicalSpecificationSpot>. [Přístupné: 2018, září 14].
63. Fox, P.F. 2003. *The major constituents of milk*. In: Smit, G. (ed). *Dairy processing improving quality*. 1. vydání. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, s. 6-41. ISBN 978-18-55736-76-4
64. Gagnon, N., Côrtes, C., da Silva, D., Kazama, R., Benchaar, C., dos Santos, G., Zeoula, L., Petit, H.V. 2009. Ruminal metabolism of flaxseed *Linum usitatissimum* lignans to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *British Journal of Nutrition*, 102: 1015-1023.
65. Garcia, J.G.N., Ma, S.-F. 2005. Polymerase chain reaction: A landmark in the history of gene technology. *Critical Care Medicine*, 33: 429-432.
66. Garnsworthy, P.C., Feng, S., Lock, A.L., Royal, M.D. 2010. Short communication: Heritability of milk fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase indices in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93: 1743-1748.
67. GB. 2010. *Determination of fatty acids in foods for infants and young children, milk and milk products*. GB 5413.27-2010. Standardization Administration of the People's Republic of China.
68. Gebauer, S.K., Psota, T.L., Kris-Etherton, P.M. 2007. The diversity of health effects of individual *trans* fatty acid isomers. *Lipids*, 42: 787-799.

69. German, J.B., Dillard, C.J. 2010. Saturated Fats: A Perspective from Lactation and Milk Composition. *Lipids*, 45: 915-923.
70. Gibson, R.A., Makrides, M., Smithers, L.G., Voevodin, M., Sinclair, A.J. 2009. The effect of dairy foods on CHD: A systematic review of prospective cohort studies. *British Journal of Nutrition*, 102: 1267-1275.
71. Goudéranche, H., Fauquant, J., Maubois, J.L. 2000. Fractionation of globular milk fat by membrane microfiltration. *Le Lait*, 80: 93-98.
72. Graff, M.M., Skau, E.L. 1943. Colored chromatograms with higher fatty acids. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*, 15: 340-341.
73. Grisart, B., Coppeters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M., Snell, R. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine *DGATI* gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research*, 12: 222-231.
74. Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Padley, F.B. 1994. *Fatty Acid Structure*. In: Gunstone, F.D. (ed.). *The Lipid Handbook*. 2. vydání. Londýn: Chapman and Hall, s 1-19. ISBN 978-0412433207
75. Hamzawi, L.F. 1990. Role of phospholipids and α -tocopherol as natural antioxidants in buffalo butterfat. *Milchwissenschaft*, 45: 95-97.
76. Hanusová, L., Čítek, J., Samková, E., Kala, R., Křížová, Z., Hanuš, O. 2018. Frekvence polymorfismů v genech *DGATI*, *FASN*, *LEP* a *SCD1* v dojené populaci skotu v České republice. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 170: 31-34.
77. Hanuš, O., Samková, E., Křížová, L., Hasoňová, L., Kala, R. 2018. Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability – A review. *Molecules*, 1636, 23: 1-32.
78. Hanuš, O., Samková, E., Špička, J., Hasoňová, L., Kala, R., Klímová, Z., Kopunecz, P., Kopecký, J. 2015. Porovnání metod používaných při stanovení zastoupení zdravotně významných mastných kyselin mléčného tuku v bazénových vzorcích mléka dojníc. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 151: 12-15.
79. Harvatine, K.J., Boisclair, Y.R., Bauman, D.E. 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal*, 3: 40-54.
80. Haug, A., Høstmark, A. T., Harstad, O. M. 2007. Bovine milk in human nutrition – A review. *Lipids in Health and Disease*, 6: 25.

81. Hazra, T., Sharma, V., Sharma, R., De, S., Arora, S., Lal, D. 2017. Detection of cow milk paneer in mixed/buffalo milk paneer through conventional species-specific polymerase chain reaction. *Indian Journal of Animal Research*, 51: 962-966.
82. Henning, D.R., Baer, R.J., Hassan, A.N., Dave, R. 2006. Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fat-based spreads. *Journal of Dairy Science*, 89: 1179-1188.
83. Hillbrick, G., Augustin, M.A. 2002. Milkfat characteristics and functionality: Opportunities for improvement. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57: 45-51.
84. Hulshof, K.F., van Erp-Baart, M.A., Anttolainen, M., Becker, W., Church, S.M., Couet, C., Hermann-Kunz, E., Kesteloot, H., Leth, T., Martins, I., Moreiras, O., Moschandreas, J., Pizzoferrato, L., Rimestad, A.H., Thorgeirsdottir, H., van Amelsvoort, J.M., Aro, A., Kafatos, A.G., Lanzmann-Petithory, D., van Poppel, G. 1999. Intake of fatty acids in western Europe with emphasis on *trans* fatty acids: The TRANSFAIR study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53: 143-57.
85. Chebel, R.C., Susca, F., Santos, J.E.P. 2008. Leptin genotype is associated with lactation performance and health of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 2893-2900.
86. Chilliard, Y., Ferlay, A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44: 467-492.
87. Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109: 828-855.
88. Chouinard, P.Y., Corneau, L., Barbano, D.M., Metzger, L.E., Bauman, D.E. 1999. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *Journal of Nutrition*, 129: 1579-1584.
89. Christie, W.W., Clapperton, J.L. 1982. Structures of the triglycerides of cows' milk, fortified milks (including infant formulae), and human milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 35: 22-24.

90. Ibeagha-Awemu, E.M., Kgwatalala, P., Zhao, X. 2008. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mammalian Genome*, 19: 591-617.
91. Inostroza, K.B., Scheuermann, E.S., Sepulveda, N.A. 2013. Stearoyl CoA desaturase and fatty acid synthase gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Chilean Black Friesian cows. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26: 263-269.
92. ISO. 2013. *Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry*. EN ISO 9622:2013. Ženeva: International Standard Organization. (*V angličtině*)
93. Jacobs, A.A.A., Dijkstra, J., Hendriks, W.H., van Baal, J., van Vuuren, A.M. 2013b. Comparison between stearoyl-CoA desaturase expression in milk somatic cells and in mammary tissue of lactating dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97: 353-362.
94. Jacobs, A.A.A., Dijkstra, J., Liesman, J.S., van de Haar, M.J., Lock, A.L., van Vuuren, A.M., Hendriks, W.H., van Baal, J. 2013a. Effects of short- and long-chain fatty acids on the expression of stearoyl-CoA desaturase and other lipogenic genes in bovine mammary epithelial cells. *Animal*, 7: 1508-1516.
95. James, A.T., Martin, A.J.P. 1952. Gas-liquid partition chromatography – The separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemical Journal*, 50: 679-690.
96. James, D.H., Phillips, C.S.G. 1954. The chromatography of gases and vapours. 3. The determination of adsorption isotherms. *Journal of Chemical Society*, 1066-1070.
97. Jensen, R.G. (ed.). 1995. *Handbook of milk composition*. 1. vydání. London: Academic Press, 919 s. ISBN 978-0-12-384430-9
98. Jensen, R.G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85: 295-350.
99. Kadlecová, V., Němečková, D., Ječmínková, K., Stádník, L. 2014. The effect of polymorphism in the *DGAT1* gene on energy balance and milk production traits in primiparous Holstein cows during the first six months of lactation. *Bulgarian Journal of Animal Science*, 20: 219-225.
100. Kala, R., Samková, E., Čítek, J. 2016b. Selected candidate genes affecting milk fatty acids. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 19: 31-33.

101. Kala, R., Samková, E., Čítek, J., Hasoňová, L., Hanusová, L., Tothová, L. 2017. Association of selected genes with milk fat in two breeds of cattle. In: *24th International PhD Students Conference MendelNet 2017*. Brno, 8-9 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 696-701. ISBN 978-80-7509-529-9
102. Kala, R., Samková, E., Hasoňová, L., Špička, J., Pelikánová, T., Křížová, Z., Hladký, J. 2016a. Proportion of important fatty acids in cow and goat milk fat. In: *23th International PhD Students Conference MendelNet 2016*. Brno, 9-10 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 582-587. ISBN 978-80-7509-443-8
103. Kala, R., Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J., Hanuš, O. 2018a. Nutritionally desirable fatty acids including CLA of cow's milk fat explained by animal and feed factors. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66: 69-76.
104. Kala, R., Samková, E., Pecová, L., Hanuš, O., Sekmokas, K., Riaukienė, D. 2018b. An overview of determination of milk fat: Development, quality control measures and application. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 105, 66: 1055-1064.
105. Kalač, P., Samková, E. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55: 521-537.
106. Kamal, M., Karoui, R. 2015. Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46: 27-48.
107. Karoui, R., de Baerdemaeker, J. 2007. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, 102: 621-640.
108. Kasper, H. (ed). 2014. *Výživa v medicíně a dietetika*. 11. vydání. Praha: Grada Publishing a.s., 592 s. ISBN 978-80-247-4533-6
109. Kates, M. 2010. *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids*. 3. vydání. Ottawa: Newport Somerville, 422 s. ISBN 978-0981375700
110. Kay, K., Weber, W.J., Moore, C.E., Bauman, D.E., Hansen, L.B., Chester-Jones, H., Crooker, B.A., Baumgard, L.H. 2005. Effects of week of lactation

- and genetic selection for milk yield on milk fatty acids composition in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 88: 3886-3893.
111. Kgwatalala, P.M., Ibeagha-Awemu, E.M., Mustafa, A.F., Zhao, X. 2009b. Influence of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 genotype and stage of lactation on fatty acid composition of Canadian Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 92: 1220-1228.
 112. Kgwatalala, P.M., Ibeagha-Awemu, E.M., Mustafa, A.F., Zhao, X. 2009a. Stearoyl-CoA desaturase 1 genotype and stage of lactation influences milk fatty acid composition of Canadian Holstein cows. *Animal Genetics*, 40: 609-615.
 113. Khan, J., Saal, L.H., Bittner, M.L., Chen, Y., Trent, J.M., Meltzer, P.S. 1999. Expression profiling in cancer using cDNA microarrays – Review. *Electrophoresis*, 20: 223-229.
 114. Kirchnerová, K., Foltys, V., Špička, J. 2013. Impact of lactation stage on milk fat fatty acids profile in grazing dairy cows. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2: 1164-1174.
 115. Koca, N., Kocaoglu-Vurma, N., Harper, J., Rodriguez-Saona, L. 2010. Application of temperature-controlled attenuated total reflectance-mid-infrared (ATR-MIR) spectroscopy for rapid estimation of butter adulteration. *Food Chemistry*, 121: 778-782.
 116. Kołakowska, A. 2002. *Lipid oxidation and food system*. In: Sikorski, Z.E., Kołakowska, A. (eds.). *Chemical and functional properties of food lipids*. 1. vydání. Boca Raton: CRC Press, s. 133-166. ISBN 978-1-58716-105-6
 117. Komisarek, J., Dorynek, Z. 2009. Effect of *ABCG2*, *PPARGC1A*, *OLR1* and *SCD1* gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics*, 50: 125-132.
 118. Kouba, M., Mouro, J. 2011. A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie*, 93: 13-17.
 119. Krag, K., Poulsen, N.A., Larsen, M.K., Larsen, L.B., Janns, L., Buitenhuis, B. 2013. Genetic parameters for milk fatty acids in Danish Holstein cattle based on SNP markers using a Bayesian approach. *BMC Genetics*, 14:79.
 120. Kramer, J.K.G., Hernandez, M., Cruz-Hernandez, C., Kraft, J., Dugan, M.E.R. 2008. Combining results of two GC separations partly achieves determination

- of all *cis* and *trans* 16:1, 18:1, 18:2 and 18:3 except CLA isomers of milk fat as demonstrated using ag-ion SPE fractionation. *Lipids*, 43: 259-273.
121. Kulig, H., Kmiec, M., Kowalewska-Luczak, I., Andziak, G. 2009. Effect of leptin gene polymorphisms on milk production traits of Jersey cows. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 33: 143-146.
 122. Lake, S.L., Weston, T.R., Scholljegerdes, E.J., Murrieta, C.M., Alexander, B.M., Rule, D.C., Moss, G.E., Hess, B.W. 2007. Effects of postpartum dietary fat and body condition score at parturition on plasma, adipose tissue, and milk fatty acid composition of lactating beef cows. *Journal of Animal Science*, 85: 717-730.
 123. Leskinen, H., Viitala, S., Mutikainen, M., Kairenius, P., Tapio, I., Taponen, J., Bernard, L., Vilkki, J., Shingfield, K.J. 2016. Ruminant Infusions of Cobalt EDTA Modify Milk Fatty Acid Composition via Decreases in Fatty Acid Desaturation and Altered Gene Expression in the Mammary Gland of Lactating Cows. *The Journal of Nutrition*, 146: 976-985.
 124. Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P., Besle, J.M. 2008. Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 5226-5236.
 125. Mach, N., Goselink, R.M.A., van Baal, J., Kruijt, L., van Vuuren, A.M., Smits, M.A. 2013. Relationship between milk fatty acid composition and the expression of lipogenic genes in the mammary gland of dairy cows. *Livestock Science*, 151: 92-96.
 126. Marchitelli, C., Contarini, G., de Matteis, G., Crisà, A., Pariset, L., Scatà, M.C., Catillo, G., Napolitano, F., Muioli, B. 2013. Milk fatty acid variability: Effect of some candidate genes involved in lipid synthesis. *Journal of Dairy Research*, 80: 165-173.
 127. Mele, M., Dal Zotto, R., Cassandro, M., Conte, G., Serra, A., Buccioni, A., Bittante, G., Secchiari, P. 2009. Genetic parameters for conjugated linoleic acid, selected milk fatty acids, and milk fatty acid unsaturation of Italian Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 92: 392-400.
 128. Miglior, F., Muir, B.L., van Doormaal, B.J. 2005. Selection indices in Holstein cattle of various countries. *Journal of Dairy Science*, 88: 1255-1263.

129. Michalski, M.C., Camier, B., Briard, V., Leconte, N., Gassi, J.Y., Goudédranche, H., Michel, F., Fauquant, J. 2004. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and functional properties of Emmental cheese. *Lait*, 84: 343-358.
130. Milanesi, E., Nicoloso, L., Crepaldi, P. 2008. Stearoyl CoA desaturase (*SCD*) gene polymorphisms in Italian cattle breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125: 63-67.
131. Molee, A., Duanghaklang, N., Na-Lampang, P. 2012. Effects of acyl-CoA:diacylglycerol acyl transferase 1 (*DGATI*) gene on milk production traits in crossbred Holstein dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 44: 751-755.
132. Morris, C.A., Cullen, N.G., Glass, B.C., Hyndman, D.L., Manley, T.R., Hickey, S.M., McEwan, J.C., Pitchford, W.S., Bottema, C.D., Lee, M.A. 2007. Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. *Mammalian Genome*, 18: 64-74.
133. Mossoba, M.M., Moss, J., Kramer, J.K.C. 2009. *Trans* Fat Labeling and Levels in US Foods: Assessment of Gas Chromatographic and Infrared Spectroscopic Techniques for Regulatory Compliance. *Journal of AOAC International*, 92: 1284-1300.
134. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* – The polymerase chain-reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273.
135. Mullis, K.B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique*, 48: 579-582.
136. Mullis, K.B. 1994. The Polymerase Chain-Reaction (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie-International Edition In English*, 33: 1209-1213.
137. Nafikov, R.A., Schoonmaker, J.P., Korn, K.T., Noack, K., Garricka, D.J., Koehler, K.J., Minick-Bormann, J., Reecy, J.M., Spurlock, D.E., Beitz, D.C. 2014. Polymorphisms in lipogenic genes and milk fatty acid composition in Holstein dairy cattle. *Genomics*, 104: 572-581.
138. NCBI. 2010. *Enterolactone* – *SID=96024381*. *PubChem Substance Database*. [Online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/96024381>. [Přístupné: 2017, červen 22].

139. OBN. 2017. *Polymerase chain reaction – PCR*. Web Gauraba Karki. [Online]. Dostupné z: <http://www.onlinebiologynotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-steps-types-application/>. [Přístupné: 2018, srpen 31].
140. Palmquist, D.L. 2006. *Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon*. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (eds.). *Advanced Dairy Chemistry: Lipids. Volume 2*. 3. vydání. New York: Springer, s. 43-92. ISBN 978-0-387-28813-0
141. Palmquist, D.L., Beaulieu, A.D., Barbano, D.M. 1993. Feed and animal factors influencing milk-fat composition. *Journal of Dairy Science*, 76: 1753-1771.
142. Pariza, M.W., Park, Y., Cook, M.E. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, 40: 283-298.
143. Paton, C.M., Ntambi, J.M. 2009. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 297: 28-37.
144. Penasa, M., Tiezzi, F., Gottardo, P., Cassandro, M., de Marchi, M. 2015. Genetics of milk fatty acid groups predicted during routine data recording in Holstein dairy cattle. *Livestock Science*, 173: 9-13.
145. Pešek, M., Špička, J., Samková, E. 2005. Comparison of fatty acid composition in milk fat of Czech Pied cattle and Holstein cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 50: 122-128.
146. Petit, H.V. 2002. Digestion, milk production, milk composition and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. *Journal of Dairy Science*, 85: 1482-1490.
147. Petrini, J., Iung, L.H.S., Rodriguez, M.A.P., Salvian, M., Pertille, F., Rovadoscki, G.A., Cassoli, L.D., Coutinho, L.L., Machado, P.F., Wiggans, G.R., Mourao, G.B. 2016. Genetic parameters for milk fatty acids, milk yield and quality traits of a Holstein cattle population reared under tropical conditions. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 133: 384-395.
148. Poulsen, N.A., Eskildsen, C.E.A., Skov, T., Larsen, L.B., Buitenhuis, A.J. 2014. Comparison of genetic parameters estimation of fatty acids from gas chromatography and FT-IR in Holsteins. In: *Proceedings of the 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*. Vancouver, 17-22 August. Canada: ASAS, 1-3.

149. Prasad, K. 2000. Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone. *The International Journal of Angiology*, 9: 220-225.
150. Pujolras, M.P., Ayvaz, H., Shotts, M.L., Pittman Jr., R.A., Herringshaw, S., Rodriguez-Saona, L.E. 2015. Portable Infrared Spectrometer to Characterize and Differentiate Between Organic and Conventional Bovine Butter. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92: 175-184.
151. Rafałowski, R., Zegarska, Z., Kuncewicz, A., Borejszo, Z. 2014. Oxidative stability of milk fat in respect to its chemical composition. *International Dairy Journal*, 36: 82-87.
152. Reue, K., Brindley, D.N. 2008. Thematic review series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Journal of Lipid Research*, 49: 2493-2503.
153. Ribeiro, A.P.B., Basso, R.C., Grimaldi, R., Gioielli, L.A., Goncalves, L.A.G. 2009. Instrumental Methods for the Evaluation of Interesterified Fats. *Food Analytical Methods*, 2: 282-302.
154. Roy, R., Gautier, M., Hayes, H., Laurent, P., Osta, R. 2001. Assignment of the fatty acid synthase (*FASN*) gene to bovine chromosome 19 (19q22) by *in situ* hybridization and confirmation by somatic cell hybrid mapping. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 93:141-142.
155. Roy, R., Ordovas, L., Zaragoza, P., Romero, A., Moreno, C., Altarriba, J., Rodellar, C. 2006. Association of polymorphisms in the bovine *FASN* gene with milk fat content. *Animal Genetics*, 37: 215-218.
156. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science*, 230: 1350-1354.
157. Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Kala, R., Koubová, J., Smetana, P., Hasoňová, L., Křížová, Z., Klímová, Z., Kopunecz, P., Kopecký, J. 2015. Porovnání metod stanovení mastných kyselin v mléce. *Náš chov*, 75: 74-76.
158. Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Klimešová, M., Hasoňová, L., Jedelská, R., Trávníček, J., Kopecký, J., Kala, R., Elich, O. 2017. Certifikovaná metodika QJ1510336 RO1417 CM 35 – Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin

mléčného tuku. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Českomoravskou společností chovatelů a.s. z 27. 9. 2017. Datum certifikace: 22. 12. 2017.*

159. Samková, E., Kala, R., Hasoňová, L., Pecová, L., Hanuš, O. 2018b. Využití rutinního stanovení mastných kyselin při odhadu heritability. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 168, 29: 13-16.
160. Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Hanuš, O., Kala, R., Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J. 2018a. Joint effects of breed, parity, month of lactation, and cow individuality on the milk fatty acids composition. *Mljekarstvo*, 68: 98-107.
161. Samková, E., Špička, J., Pešek, M., Pelikánová, T., Hanuš, O. 2012. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science*, 42: 83-100.
162. Shingfield, K.J., Bernard, L., Leroux, C., Chilliard, Y. 2010. Role of *trans* fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal*, 4: 1140-1166.
163. Shingfield, K.J., Bonnet, M., Scollan, N.D. 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal*, 7: 132-162.
164. Schennink, A., Heck, J.M.L., Bovenhuis, H., van Visker, M.H.P.W., Valenberg, H.J.F., van Arendonk, J.A.M. 2008. Milk fatty acid unsaturation: Genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) and acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGAT1*). *Journal of Dairy Science*, 91: 2135-2143.
165. Schennink, A., Stoop, W.M., Visker, M.H., Heck, J.M., Bovenhuis, H., van der Poel, J.J., van Valenberg, H.J., van Arendonk, J.A. 2007. *DGAT1* underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cow. *Animal Genetics*, 38: 467-473.
166. Schwendel, B.H., Wester, T.J., Morel, P.C.H., Tavendale, M.H., Deadman, C., Shadbolt, N.M., Otter, D.E. 2015. Invited review: Organic and conventionally produced milk – An evaluation of influence factors on milk composition. *Journal of Dairy Science*, 98: 721-746.

167. Siurana, A., Calsamiglia, S. 2016. A metaanalysis of feeding strategies to increase the content of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy cattle milk and the impact on daily human consumption. *Animal Feed Science and Technology*, 217: 13-26.
168. Soyeurt, H., Dardenne, P., Dehareng, F., Lognay, G., Veselko, D., Marlier, M., Bertozzi, C., Mayeres, P., Gengler, N. 2006b. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 89: 3690-3695.
169. Soyeurt, V., Dardenne, P., Gillon, A., Croquet, C., Vanderick, S., Mayeres, P., Bertozzi, C., Gengler, N. 2006a. Variation in fatty acid content of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science*, 89: 4858-4865.
170. Spitzer, V. 1997. Structure analysis of fatty acids by gas chromatography – Low resolution electron impact mass spectrometry of their 4,4-dimethyloxazoline derivatives – A review. *Progress in Lipid Research*, 35: 387-408.
171. Společnost pro výživu. 2012. *Výživová doporučení pro obyvatelstvo České republiky*. [Online]. Dostupné z: <http://www.vyzivaspol.cz/vyzivova-doporučení-pro-obyvatelstvo-ceske-republiky/>. [Přístupné: 2017, červenec 10].
172. Stephenson, J.A., Al-Taan, O., Arshad, A., Morgan, B., Metcalfe, M.S., Dennison, A.R. 2013. The multifaceted effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the hallmarks of cancer. *Journal of Lipids*, 261247: 1-13. [Online]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jl/2013/261247/>. [Přístupné: 2018, září 3].
173. Stoop, W.M., Bovenhuis, H., Heck, J.M.L., van Arendonk, J.A.M. 2009a. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 92: 1469-1478.
174. Stoop, W.M., Schennink, A., Visker, M.H.P.W., Mullaart, E., van Arendonk, J.A.M., Bovenhuis, H. 2009b. Genome-wide scan for bovine milk-fat composition. I. Quantitative trait loci for short and medium-chain fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 92: 4664-4675.
175. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S., Golub, T.R., Lander, E.S., Mesirov, J.P. 2005. Gene set enrichment analysis: A knowledge based approach for

- interpreting genome wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 15545-15550.
176. Tabit, F.T. 2016. Advantages and limitations of potential methods for the analysis of bacteria in milk: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 53: 42-49.
 177. Taniguchi, M., Utsugi, T., Oyama, K., Mannen, H., Kobayashi, M., Tanabe, Y., Ogino, A., Tsuji, S. 2004. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*, 15: 142-148.
 178. Teng, F., Wang, P., Yang, L., Ma, Y., Day, L. 2017. Quantification of Fatty Acids in Human, Cow, Buffalo, Goat, Yak, and Camel Milk Using an Improved One-Step GC-FID Method. *Food Analytical Methods*, 10: 2881-2891.
 179. Tetens, I. 2010. Scientific opinion on the substantiation of health claims related to conjugated linoleic acid (CLA) isomers and contribution to the maintenance or achievement of a normal body weight (ID 686, 726, 1516, 1518, 2892, 3165), increase in lean body mass (ID 498, 731), increase insulin sensitivity (ID 1517), protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 564, 1937), and contribution to immune defences by stimulation of production of protective antibodies in response to vaccination (ID 687, 1519) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No1924/2006. *EFSA Journal*, 8: 1794-1820.
 180. Toušová, R., Stádník, L., Ducháček, J. 2013. Effect of season and the time of milking on spontaneous and induced lipolysis in bovine milk fat. *Czech Journal of Food Science*, 31: 20-26.
 181. Tswett, M.S. 1903. On a New Category of Adsorption Phenomena and Their Application to Biochemical Analysis. *Tr. Varshavskogo obschestva estestvoispytatelei*, 14: 1-20. (V ruštině)
 182. Tswett, M.S. 1906. Adsorptions analyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 24: 384-393. (V němčině)
 183. Tvrzická, E., Kremmyda, L.S., Staňková, B., Žák, A. 2011. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease – A review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions.

Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacký University, Olomouc, Czech Republic, 155: 117-130.

184. Useni, B.A., Muller, C.J.C., Cruywagen, C.W. 2018. Pre- and postpartum effects of starch and fat in dairy cows: A review. *South African Journal of Animal Science*, 48: 413-426.
185. Valones, M.A.A., Guimaraes, R.L., Brandao, L.A.C., de Souza, P.R.E., Carvalho, A.D.T., Crovela, S. 2009. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 1-11.
186. van Haelst, Y.N.T., Beeckman, A., van Knegsel, A.T.M., Fievez, V. 2008. Short communication: Elevated concentrations of oleic acid and long-chain fatty acids in milk fat of multiparous subclinical ketotic cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 4683-4686.
187. Vaziri, N.D., Kim, C.H., Dang, B., Zhan, C.D., Liang, K. 2004. Downregulation of hepatic acyl-CoA:diglycerol acyltransferase in chronic renal failure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 287: 90-94.
188. Velíšek, J., Hajšlová, J. (eds.). 2009. *Chemie potravin 1*. 3. vydání. Tábor: Osis, 602 s. ISBN 978-80-86659-17-6
189. Vieitez, I., Irigaray, B., Callejas, N., González, V., Gimenez, S., Arechavaleta, A., Grompone, M., Gámbaro, A. 2016. Composition of fatty acids and triglycerides in goat cheeses and study of the triglyceride composition of goat milk and cow milk blends. *Journal of food composition and Analysis*, 48: 95-101.
190. Vokurka, M., Hugo, J. a kol. (eds.). 2015. *Velký lékařský slovník*. 10. vydání. Praha: Maxdorf, 1124 s. ISBN 978-80-7345-456-2
191. Wakil, S.J. 1989. Fatty-acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*, 28: 4523-4530.
192. Whigham, L.D., Watras, A.C., Schoeller, D.A. 2007. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: A meta-analysis in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85: 1203-1211.
193. Winter, A., Krämer, W., Werner, F.A.O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J.E., Thaller, G., Fries, R. 2002. Association of lysine-232/alanine polymorphism in bovine gene encoding acylCoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGATI*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat

- content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 9300-9305.
194. Wolff, R.L., Fabien, R.J. 1989. The use of isopropanol for fat extraction from dairy-products and for the subsequent esterification of fatty-acids. *Lait*, 69: 33-46.
 195. Wright, A.J., Scanlon, M.G., Hartel, R.W., Marangoni, A.G. 2001. Rheological Properties of Milkfat and Butter. *Journal of Food Science*, 66: 1056-1071.
 196. Yonezawa, T., Yonekura, S., Sanosaka, M., Hagino, A. 2004. Octanoate stimulates cytosolic triacylglycerol accumulation and CD36 mRNA expression but inhibits acetyl coenzyme A carboxylase activity in primary cultured bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Research*, 71: 398-404.
 197. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432.

10. Seznam tabulek, grafů a obrázků

Tabulky

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 Vybrané strukturní charakteristiky mastných kyselin. | 10 |
| Tabulka 2 Názvosloví hlavních mastných kyselin mléčného tuku..... | 11 |
| Tabulka 3 Strategie krmení a její vliv na zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku dojnic. | 18 |
| Tabulka 4 Přehled vybraných jednonukleotidových polymorfismů identifikovaných pomocí celogenomové asociační studie..... | 22 |
| Tabulka 5 Detektory a detekční systémy používané při stanovení mastných kyselin. | 26 |
| Tabulka 6 Výhody infračervené spektroskopie v blízké a střední oblasti spektra.... | 29 |
| Tabulka 7 Genotypové a alelové frekvence genu <i>SCD1</i> (stearoyl-CoA desaturáza 1) dle plemen dojnic..... | 44 |
| Tabulka 8 Ukazatele mléčné užitkovosti ($\bar{x} \pm s_x$) jednotlivých genotypů genu <i>SCD1</i> (stearoyl-CoA desaturáza 1) u dojnic ¹ | 44 |

Grafy

| | |
|---|----|
| Graf 1 Zastoupení ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ mléka) kyseliny vakcenové (VA), konjugované linolové (CLA) a α -linolenové (ALA) u tří plemen dojnic (holštýnské – H, jerseyké – J a jejich kříženek – CB) během jednotlivých stadií laktace (5, 95, 185, 275 DIM); upraveno dle Bainbridge <i>a kol.</i> (2016)..... | 38 |
| Graf 2 Výsledky regresní analýzy mezi metodou plynové chromatografie (GC) a infračervené spektroskopie s Fourierovými transformacemi (MIR-FT) u vybraných skupin mastných kyselin; levý sloupec – bazénové vzorky mléka ($n = 60$), pravý sloupec – individuální vzorky mléka ($n = 345$). | 48 |

Obrázky

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 Model 3D sítě tukových kuliček. | 13 |
| Obrázek 2 Chemická struktura enterolaktonu (hydroperoxy methyl-formiát). | 16 |
| Obrázek 3 Hlavní dráhy biosyntézy triacylglycerolů. | 21 |
| Obrázek 4 Přístroj CombiScope FTIR 600 (Delta Instruments B.V., Netherlands) pracující na principu FT-IR. | 28 |
| Obrázek 5 Výsledky měření na přístroji CombiScope FTIR 600 (Delta Instruments B.V., Netherlands) – tuk, bílkoviny, laktóza, sušina (%), močovina ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), bod mrznutí ($^{\circ}\text{C}$). | 28 |
| Obrázek 6 Schématické znázornění polymerázové řetězové reakce. | 30 |
| Obrázek 7 Vyhodnocení metody polymerázové řetězové reakce s následnou analýzou polymorfismu délky restrikčních fragmentů pomocí gelové elektroforézy (gen <i>stearoyl-CoA</i> desaturáza 1; genotypy 425 – <i>TT</i> , 427 – <i>TC</i> , 426 – <i>CC</i>). | 31 |
| Obrázek 8 Biochemická dráha přenosu elektronů při desaturaci mastných kyselin pomocí enzymu SCD (<i>stearoyl-CoA</i> desaturáza). | 42 |

11. Prohlášení spoluautorů

Všichni níže uvedení spoluautoři prohlásili, že se Ing. Robert Kala významnou měrou podílel na publikacích uvedených v příloze této disertační práce. Souhlas jednotlivých autorů byl elektronickou formou zaslán vedoucí školitelce doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D., a byl ověřen předsedou oborové rady *Zoohygienu a prevence chorob hospodářských zvířat*, doktorského studijního programu Zootechnika, Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích prof. Ing. Janem Trávníčkem, CSc.

prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Ing. Jan Drbohlav, CSc.

Ing. Ondřej Elich

Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.

prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.

MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.

Ing. Jan Hladký

Radoslava Jedelská

Ing. Irena Jelínková

Ing. Tereza Kávová

doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D.

Ing. Zdeňka Klímová

Jaroslav Kopecký

Ing. Pavel Kopunecz

Ing. Jana Koubová, Ph.D.

Mgr. Ing. Ludmila Křížová, Ph.D.

Ing. Zuzana Křížová

prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Ing. Gabriela Mašková

Ludmila Nejeschlebová

Ing. et Ing. Lenka Pecová

Ing. Tamara Pelikánová

Dr. Dalia Riaukienė

Ing. Petr Roubal, CSc.

doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.

M. Eng. Kęstutis Sekmokas

Ing. Pavel Smetana, Ph.D.

doc. Ing. Jiří Špička, CSc.

Ing. Lucie Tothová, Ph.D.

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

Ing. Libor Večerek, Ph.D.

V zastoupení všech spoluautorů:

.....
doc. Ing. EVA SAMKOVÁ, Ph.D.

Ověřil:

.....
prof. Ing. JAN TRÁVNÍČEK, CSc.

12. Přílohy

Přílohami jsou publikace ve vědeckých časopisech s IF a ve vědeckých recenzovaných časopisech. Dále jsou uvedeny aplikované výsledky. Publikace přímo související s tématem disertační práce jsou označeny hvězdičkou (*) a jsou součástí disertační práce.

12.1 Publikace ve vědeckém časopise s IF

- * Hanuš, O., Samková, E., Křížová, L., Hasoňová, L., **Kala, R.** 2018. Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability – A review. *Molecules*, 1636, 23(7): 1-32. (**J_{IMP}**)
- * Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Hanuš, O., **Kala, R.**, Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J. 2018. Joint effects of breed, parity, month of lactation, and cow individuality on the milk fatty acids composition. *Mljekarstvo*, 68(2): 98-107. (**J_{IMP}**)
- Tunegová, M., Samková, E., Hasoňová, L., Klimešová, M., Marková, A., **Kala, R.**, Toman, R. 2018. Occurrence of chemical contaminants in animal products during 1999-2016 in the Czech Republic. *British Food Journal*, 120(9): 2142-2154. (**J_{IMP}**)

12.2 Publikace ve vědeckých recenzovaných časopisech

- * **Kala, R.**, Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J., Hanuš, O. 2018. Nutritionally desirable fatty acids including CLA of cow's milk fat explained by animal and feed factors. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66(1): 69-76. (**J_{SC}**)
- * **Kala, R.**, Samková, E., Pecová, L., Hanuš, O., Sekmokas, K., Riaukienė, D. 2018. An overview of determination of milk fat: Development, quality control measures and application. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 105, 66(4): 1055-1064. (**J_{SC}**)

- *Samková, E., **Kala, R.**, Hasoňová, L., Pecová, L., Hanuš, O. 2018. Využití rutinního stanovení mastných kyselin při odhadu heritability (Use of routine determination of fatty acids for heritability estimates). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 168, 29(3): 13-16. (**JREC**)
- *Hanusová, L., Čítek, J., Samková, E., **Kala, R.**, Křížová, Z., Hanuš, O. 2018. Frekvence polymorfismů v genech *DGATI*, *FASN*, *LEP* a *SCD1* v dojené populaci skotu v České republice (Polymorphism frequencies of *DGATI*, *FASN*, *LEP* and *SCD1* genes in milking cattle in the Czech Republic). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 170, 29(5): 31-34. (**JREC**)
- Kala, R.**, Samková, E., Hanuš, O., Pecová, L., Sekmokas, K., Riaukienė, D. 2018. Milk protein analysis: An overview of the methods – development and application. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, **v tisku**. (**Jsc**)
- Samková, E., Hasoňová, L., Kadlec, J., Smetana, P., **Kala, R.** 2018. Young consumer preferences of basic food products depending on age and gender. *Journal of Central European Agriculture*, **v tisku**. (**Jsc**)
- ***Kala, R.**, Samkova, E., Citek, J., Hasonova, L., Hanusova, L., Tothova, L. 2017. Association of selected genes with milk fat in two breeds of cattle. In: *24th International PhD Students Conference MendelNet 2017*. Brno, 8-9 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 696-701. ISBN 978-80-7509-529-9 (**D**)
- Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Drbohlav, J., Hasoňová, L., **Kala, R.**, Roubal, P. 2017. Srovnání složení másla z různých komerčních zdrojů (Comparison of butter composition from various commercial sources). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 165, 28(6): 1-6. (**JREC**)
- Samková, E., Hasoňová, L., Lafatová, V., **Kala, R.**, Bedrníček, J. 2017. Hodnocení vybraných tavených plátkových sýrů a analogových výrobků mladými spotřebiteli (Evaluation of selected processed sliced cheeses and analogues among young consumers). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 162, 28(3): 9-12. (**JREC**)
- Hasoňová, L., Samková, E., Beerová, M., Klimešová, M., **Kala, R.** 2017. Změny v hodnotách celkového počtu mikroorganismů při skladování syrového kravského

mléka (Changes of total bacteria count in raw cow's milk during storage). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 161, 28(1): 1-3. (**J_{REC}**)

***Kala, R.**, Samkova, E., Hasonova, L., Spicka, J., Pelikanova, T., Krizova, Z., Hladky, J. 2016. Proportion of important fatty acids in cow and goat milk fat. In: *23th International PhD Students Conference MendelNet 2016*. Brno, 9-10 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 582-587. ISBN 978-80-7509-443-8 (**D**)

Hladky, J., Travnicek, J., Hasonova, L., Krizova, Z., Konecny, R., Samkova, E., Kautska, J., **Kala, R.** 2016. Effects of monensin on milk production and metabolism of dairy cows. In: *23th International PhD Students Conference MendelNet 2016*. Brno, 9-10 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 205-209. ISBN 978-80-7509-443-8 (**D**)

Krizova, Z., Travnicek, J., Konecny, R., Hladky, J., Hasonova, L., **Kala, R.** 2016. The effect of feeding extracted rapeseed meal on the content of iodine in milk, urine and blood plasma in dairy cows. In: *23th International PhD Students Conference MendelNet 2016*. Brno, 9-10 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 790-794. ISBN 978-80-7509-443-8 (**D**)

***Kala, R.**, Samkova, E., Citek, J. 2016. Selected candidate genes affecting milk fatty acids. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 19 (Special Issue): 31-33. (**J_{REC}**)

Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., **Kala, R.**, Koubová, J., Kopunecz, P., Klímová, Z., Kopecký, J. 2016. Conclusions from a feasibility study into the use of FTIR analysis for fatty acid profilig. *Focus Foss Magazine*, 40(2): 2-4. (**J_{REC}**)

Samková, E., Hasoňová, L., Čásenská, J., **Kala, R.**, Bártová, Z. 2016. Preference příchutí jogurtů mezi mladými spotřebiteli (Preferences of yoghurt with flavouring among young consumers). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 154, 27(1): 1-3. (**J_{REC}**)

Křížová, Z., Trávníček, J., Samková, E., Hasoňová, L., Konečný, R., **Kala, R.**, Hladký, J., Staňková, M. 2016. Obsah jódu v mléce a syrovátce (Contents of iodine in milk and in the whey). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 155, 27(2): 1-3. (**J_{REC}**)

- *Hanuš, O., Samková, E., Špička, J., Hasoňová, L., **Kala, R.**, Klímová, Z., Kopunecz, P., Kopecký, J. 2015. Porovnání metod používaných při stanovení zastoupení zdravotně významných mastných kyselin mléčného tuku v bazénových vzorcích mléka dojnic (Comparison of methods used for the determination of the healthy important fatty acids of milk fat in bulk milk samples of dairy cows). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 151, 26: 12-15. (**J_{REC}**)
- *Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., **Kala, R.**, Koubová, J., Smetana, P., Hasoňová, L., Křížová, Z., Klímová, Z., Kopunecz, P., Kopecký, J. 2015. Porovnání metod stanovení mastných kyselin v mléce (Comparison of methods for the determination of the fatty acids of milk fat). *Náš chov*, 75(9): 74-76. (**J_{REC}**)
- Samková, E., Hasoňová, L., Blechová, R., **Kala, R.** 2015. Senzorické hodnocení sýrů s plísní na povrchu v závislosti na stadiu zralosti (Sensory evaluation of mould ripening cheeses depending on maturation). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 150, 26: 8-11. (**J_{REC}**)
- Samková, E., Hasoňová, L., Švecová, R., **Kala, R.** 2015. Zrušení mléčných kvót z pohledu producentů mléka (Milk quota abolition from the viewpoint of producers). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 150, 26: 9-14. (**J_{REC}**)
- Samková, E., Hasoňová, L., Mach, K., Smetana, P., **Kala, R.** 2015. Preference for selected kinds of meat among young consumers. *Maso International - Journal of Food Science and Technology*, 5(2): 109-114. (**J_{REC}**)
- Koubová, J., Samková, E., Hasoňová, L., **Kala, R.**, Špička, J., Kváč, M., Hanuš, O. 2014. Vliv zkrmování čerstvé vojtěšky na zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku dojnic (The effects of feeding fresh lucerne on fatty acid composition in bovine milk fat). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 147, 25: 41-44. (**J_{REC}**)
- Samková, E., Hasoňová, L., Mach, K., Smetana, P., **Kala, R.** 2014. Obliba mléka a mléčných výrobků mezi mladými konzumenty (Preference of milk and dairy products among young consumers). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 147, 25: 15-16. (**J_{REC}**)

12.3 Aplikované výsledky

* Čítek, J., Hanuš, O., Večerek, L., Samková, E., Hanusová, L., Křížová, Z., Jelínková, I., **Kala, R.** 2018. Certifikovaná metodika QJ1510339 CM 181 – Izolace boviní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékařenským s.r.o. Praha a Svazem výrobců mléka a.s. z 24. 9. 2018.* Datum certifikace: 8. 10. 2018. (**N_{MET}**)

Dostupné z:

http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/cm_181_2018.pdf

* Čítek, J., Večerek, L., Hanusová, L., Samková, E., Hanuš, O., Křížová, Z., Kávová, T., **Kala, R.** 2018. Certifikovaná metodika QJ1510336 CM 1975 – Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Svazem výrobců mléka a.s. z 24. 9. 2018.* Datum certifikace: 8. 10. 2018. (**N_{MET}**)

Dostupné z:

http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/cm_1975_2018.pdf

* Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Klimešová, M., Hasoňová, L., Jedelská, R., Trávníček, J., Kopecký, J., **Kala, R.**, Elich, O. 2017. Certifikovaná metodika QJ1510336 RO1417 CM 35 – Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Českomoravskou společností chovatelů a.s. z 27. 9. 2017.* Datum certifikace: 22. 12. 2017. (**N_{MET}**)

Dostupné z:

http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/um_qj1510336_ro1417_cm35.pdf

Hanuš, O., Samková, E., Kopecký, J., Klimešová, M., Špička, J., Hasoňová, L., Jedelská, R., Mašková, G., Nejeschlebová, L., **Kala, R.** 2017. Certifikovaná metodika QJ1510336 RO1417 CM 36 – Posouzení perzistence konjugované

kyseliny linolové během technologie fermentace pro specifické kysané mléčné výrobky z faremní produkce. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a Zemědělským družstvem Jeseník z 23. 11. 2017, resp. Svazem výrobců mléka a.s. Šumperk z 23. 11. 2017. Datum certifikace: 22. 12. 2017. (N_{MET})*

Dostupné z:

http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/um_qj1510336_ro1417_cm36.pdf

Příloha 1:

Hanuš, O., Samková, E., Křížová, L., Hasoňová, L., **Kala, R.** 2018. Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability – A review. *Molecules*, 1636, 23(7): 1-32. (**JIMP**)

Review

Role of Fatty Acids in Milk Fat and the Influence of Selected Factors on Their Variability—A Review

Oto Hanuš^{1,*}, Eva Samková², Ludmila Křížová³, Lucie Hasoňová² and Robert Kala²

¹ Dairy Research Institute Ltd., 16000 Prague, Czech Republic

² Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products' Quality, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, 37005 České Budějovice, Czech Republic; samkova@zf.jcu.cz (E.S.); faktotum@centrum.cz (L.H.); KalaRobert@seznam.cz (R.K.)

³ Department of Animal Nutrition, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, 61242 Brno, Czech Republic; krizoval@vfu.cz

* Correspondence: hanus.oto@seznam.cz; Tel.: +420-583-382-400

Received: 31 May 2018; Accepted: 2 July 2018; Published: 4 July 2018

Abstract: Fatty acids (FAs) of milk fat are considered to be important nutritional components of the diets of a significant portion of the human population and substantially affect human health. With regard to dairy farming, the FA profile is also seen as an important factor in the technological quality of raw milk. In this sense, making targeted modifications to the FA profile has the potential to significantly contribute to the production of dairy products with higher added value. Thus, FAs also have economic importance. Current developments in analytical methods and their increasing efficiency enable the study of FA profiles not only for scientific purposes but also in terms of practical technological applications. It is important to study the sources of variability of FAs in milk, which include population genetics, type of farming, and targeted animal nutrition. It is equally important to study the health and technological impacts of FAs. This review summarizes current knowledge in the field regarding sources of FA variability, including the impact of factors such as: animal nutrition, seasonal feed changes, type of animal farming (conventional and organic), genetic parameters (influence of breed), animal individuality, lactation, and milk yield. Potential practical applications (to improve food technology and consumer health) of FA profile information are also reviewed.

Keywords: dairy cow; milk fatty acid profile; breed; season; lactation; nutrition; energy status; feeding; organic system; genetic polymorphism

1. Introduction

Fatty acids (FAs) in milk fat are considered to be important nutritional components of the diets of a substantial part of the human population. According to scientific knowledge, they can also affect human health. In the past, FAs have been regarded as having negative impacts on human health; however, in the last ten years this notion has been greatly reassessed. Currently, the impact of milk fat on human health is thought of in a much more positive way than it was in previous periods [1–7]. Nevertheless, this area of research remains a very attractive subject for further expansions of our knowledge.

In the case of dairy farming, the FA profile is also seen as an important factor in the technological quality of raw milk. Therefore, the FA profile has the potential to significantly contribute to the production of dairy products with higher added value. As such, FAs also have an economic importance. Current developments in analytical methods and their increasing efficiency enable the study of milk FA profiles not only for scientific purposes but also in terms of practical technological applications. It is important to study the sources of FA variability in milk, which

include population genetics, farming management, and targeted animal nutrition (Figure 1). It is equally important to study the health and technological impacts of FAs.

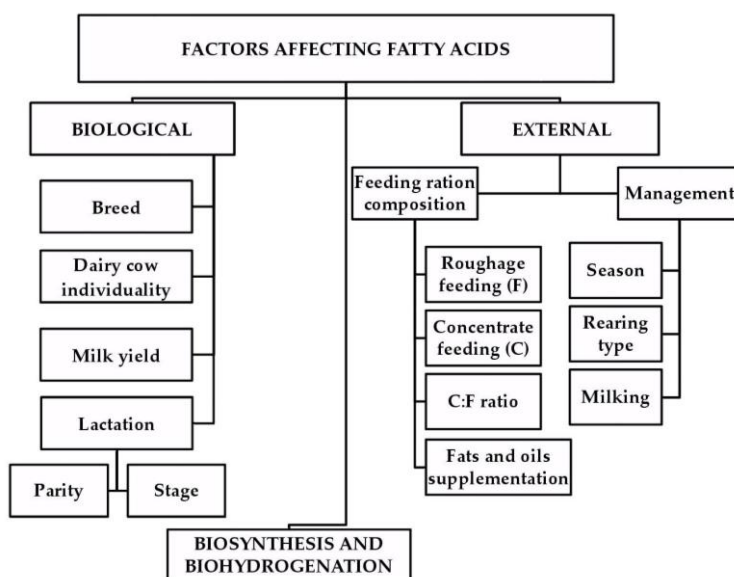


Figure 1. Diagram of the sources of variability in the fatty acid profile of milk.

Efforts to carry out practical improvements of milk FA profiles to benefit consumers are usually driven by two reasons: (1) from a nutritional point of view, a lower proportion of saturated FAs (SFA) and a higher proportion of unsaturated FAs (UFA), especially polyunsaturated FAs (PUFA) n-3, is desirable; and (2) from a usability point of view, higher proportions of UFA are preferred (i.e., easier spreadability of butter is desirable for consumers). However, there are also problems associated with having high UFA content in milk fat, including its lower stability and the accompanying phenomena such as oxidation and possible sensory changes.

Making desirable changes to the FA profile requires a thorough knowledge of the various factors that influence milk fat composition. It is also important to know the extent to which these relevant factors are involved in influencing the FA profile. Some factors affecting the FA profile of milk (such as altitude, breed, lactation order (parity), lactation stage (days in milk), and diet) have been described previously [8–13]; nevertheless, these factors continue to be studied because of their wide-range of variation and their large number of possible mutually combined effects. In some studies using multifactorial datasets, the main factors affecting milk FA composition were feeding ration, herd, cow's individuality, and lactation stage; whereas, breed and parity showed only small effects [10,14–17]. Although animal factors evidently affect the FA profile of milk fat [18], the main factors are related to dairy cow nutrition [19]. A number of papers showing specific nutritional effects of cow diet on milk FA profiles have been published [20–33]. These results regularly show that increasing the proportion of fresh (pasture) or preserved forage (generally fiber) as compared to grain concentrates and increasing the proportion of oilseeds in feed concentrates as compared to non-oleaginous seeds in dairy cow feeding rations improves the milk FA profile by increasing UFA and ruminic acid (RA; C18:2 *c*9, *t*11; isomer of conjugated linoleic acid (CLA)) content in milk fat.

In-depth knowledge of these factors can also be used to predict milk FA profile. This can be carried out effectively for bulk milk samples based on information about farm practices (especially the composition of dairy cow nutrition and altitude). Good prediction models for SFA and PUFA (determination $R^2 > 0.5$), as well as very good models for *trans* isomers of UFA (TFA) ($R^2 > 0.6$) have been utilized for this purpose [12].

The aim of this work is to summarize and evaluate the latest findings on factors that contribute to variability in the FA profile of bovine milk fat.

2. Development of Indirect Methods for Determining Milk FA Profile

Due to the great nutritional and technological importance of the FA profile for human health and dairy processing practices, the availability of an effective method for determining and controlling milk FA content is important. Sophisticated analytical methods that are considered standard for FA profile verifications are usually very expensive, professionally demanding, and impractical. For example, the primary method is separation by gas chromatography (GC). Therefore, a more effective analytical process is necessary. Over the past twenty years, there have been significant advances in practical hardware and software development for effective routine indirect analyses of milk FAs [34–37].

Near infrared spectroscopy has been used and evaluated for successful estimation of milk FA profiles [36]. Results of this method proved reliable for the determination of some major FAs and their groups. Coefficients of determination in external validation were good (≥ 0.88) for SFA, MUFA, UFA, TFA, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 and C18:1 *c*9 in oven-dried milk, approximate for PUFA, C18:0, vaccenic (VA; C18:1 *t*11) and RA, and poor for linoleic acid (LA; C18:2 *n*-6), alfa-linolenic (ALA; C18:3 *n*-3) acid, PUFA *n*-6, and PUFA *n*-3. Quantification was more accurate for oven-dried milk, but good results were also obtained for SFA, MUFA, UFA, and C18:1 *c*9 in liquid milk (0.91, 0.89, 0.9, and 0.86, respectively). Lower result reliability (validation determination) was obtained for TFA and RA (0.75 and 0.6, respectively).

Nevertheless, it is technically more effective to use mid infrared spectroscopy with Fourier transformation (MIR-FT) in a flow design apparatus for liquid milk [34,35,37,38]. There are suitable prediction models for FA profile estimation [34,35] and the calibration equations are useful for predicting C12:0, C14:0, C16:0, C16:1 *c*9, C18:1 *c*9, SFA, and MUFA in milk (determination of validation; g·100 mL⁻¹ of milk: 0.74, 0.82, 0.82, 0.65, 0.88, 0.94, and 0.85, respectively; g·100 g⁻¹ of fat: 0.64, 0.67, 0.5, 0.37, 0.53, 0.63, and 0.52, respectively). In all cases [37], the predictions were of better quality for FAs present at medium to high concentrations (i.e., for SFA and some MUFA with a coefficient of determination in external validation > 0.9). Conversion of FA content expressed in grams per 100 mL of milk to grams per 100 g of FAs was possible with only a small loss of accuracy for some FAs. Calibration correlations between GC and MIR-FT results [38] were higher for SFA and UFA (0.71 and 0.94, respectively; $p < 0.001$); whereas, they were lower for TFA and PUFA (0.59 each; $p < 0.001$). This means that 50.3% and 88.2% of the variability in routine values of SFA and UFA were explainable by variations in reference values. These indirect routine analytical methods are now opening the door to more intensive and effective research studies and quantifications of the sources of variability in milk FA profiles.

3. Effects of Nutrition and Metabolic Aspects of Cattle on Milk FA Profile

3.1. Effect of Diet

The amount of milk fat and its composition depends mainly on two processes: lipid metabolism in the rumen and lipid metabolism in the mammary gland. Furthermore, FAs released from body reserves during negative energy balance at early lactation also contribute to the final composition of milk fat [39]. Metabolic processes in the rumen and the composition of rumen microbiota are affected by nutritional factors, especially by the type of forage, forage:concentrate ratio and the associated starch level, use of lipid supplements, and also by the interaction of these factors resulting in changes in duodenal flow and the proportion of each FA [39].

3.1.1. Type of Forage

In many countries, intensive production of milk relies on two feeding strategies: year-round indoor feeding based on preserved feed or seasonal feeding based on grazing during summer combined with indoor feeding during winter. Preserved feed is represented mainly by corn, grass, legume, grass-legume silages or a combination of the above, all supplemented with concentrates. The spectrum of plants used for feeding purposes depends largely on local soil and climatic conditions. Furthermore, the proportion of forage in the diet of dairy cows can range from 50 to 90

percent of dry matter. Diet composition is the main factor that can cause shifts in the microbial diversity of the rumen [40] with subsequent changes in milk FAs. This is because individual categories of bacteria have different lipid metabolism and thus produce higher proportions of specific FAs, such as odd-chain FAs (liquid phase bacteria), C18:1 *trans* isomers (bacteria firmly attached to feed particles), or branched-chain FAs (bacteria loosely attached to feed particles) [41]. Recent research has demonstrated that a shift in rumen microbiota followed by changes to the milk FA profile can occur in response to high-starch diets [42], oil supplementation [43], changes in forage:concentrate ratio [44], or a switch from total mixed ration (TMR) to pasture [45], as also documented in Table 1 comparing pasture-based and silage-based feeding systems. It is clear that regardless of the botanical composition of the pasture, milk fat of grazed cows had the lowest proportion of C16:0 and hypercholesterolaemic FAs (HFA; C12:0 + C14:0 + C16:0) as well as the highest proportions of C18:1 *c9*, VA, RA, and MUFA compared to silage-based feeding [46].

Of the types of silage mentioned in Table 1, a significantly lower proportion of C16:0 (27.6%) as well as a significantly higher proportion of ALA (0.95%), PUFA n-3 (1.20%) and essential FAs (LA + ALA, 2.64%) have been observed in legume silage [46] (as also previously noted, e.g., [47,48]). Furthermore, proportions of the above mentioned FAs are present in even higher proportions in milk from silage-fed cows than in milk from grazed cows, in which the proportion of LA is predominantly low [49,50]. This is similar for cows fed grass silage [20].

According to the literature [24,51], the least favorable FA profile of milk fat was observed in cows fed corn silage-based diets because of the high proportion of HFA (51.8%) and low proportion of C18 FAs (26%), regardless of having the highest recorded proportion of LA (1.92% [46], likely originating from the corn grain [4]).

From the perspective of enhancing the HFA/C18 ratio (see Table 1), grazing represents a good strategy for improving milk fat composition because it increases the proportion of desirable FAs, mainly C18:1 *c9*, RA and *cis*-MUFA, and decreases the proportion of SFA compared to silage-based feeding. Of the preserved feedstuffs, the most suitable seem to be either legume silage or mixed silage [46].

3.1.2. Oilseeds

Using oilseeds in dairy cow diets is a common nutritional strategy used to improve the FA profile of milk fat. Their effect on milk FA composition has been recently reviewed in many studies [39,52,53]. Soybean and rapeseed products are widely and commonly used in many countries as excellent sources of high-quality protein and energy. However, these two feeding components differ in FA profile. While soybean products represent sources rich in LA (52.5%) and lower in C18:1 *c9* (20.3%) and ALA (6.8%), rapeseed products, in general, are a good source of C18:1 *c9* (more than 50%) with lower amounts of LA (20.6%) and ALA (8.9%) [54]. As documented in Table 1, soybean products improve proportions of LA and also slightly ALA, thus increasing the essential FAs PUFA n-6 and PUFA n-3 compared to rapeseed products or mixes of oilseeds. On the other hand, as documented in many studies, rapeseed improved the FA profile of milk by increasing the proportion of C18:1 *c9* and RA and by decreasing C14:0 and C16:0 (this was also true when feeding mixes of oilseeds) [55]. Based on the HFA/C18 ratio (see Table 1), supplementing diets with rapeseed products seems to be better than supplementation with soybean products or mixes of oilseeds because rapeseed products have a greater impact on the proportion of desirable FAs, mainly C18:1 *c9*, VA, and RA.

Table 1. Effects of the types of forage and oilseed on the proportion of fatty acids (FAs; % of total FA) in milk fat *.

| | C14:0 | C16:0 | C18:0 | C18:1 c9 | C18:1 t11 | 18:2 n-6 | C18:2 c9,t11 | C18:3 n-3 | HFA ³ | c-MUFA ⁴ | t-MUFA ⁵ |
|--------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------|------------------|---------------------|---------------------|
| | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) |
| Silage | | | | | | | | | | | |
| - grass | 12.4 (11) | 32.3 (13) | 9.8 (13) | 16.1 (13) | 1.18 (6) | 1.18 (13) | 0.54 (6) | 0.49 (13) | 48.6 (11) | 18.5 (10) | 3.65 (10) |
| - legume | 11.0 (6) | 27.6 (6) | 9.9 (6) | 17.6 (6) | 1.24 (5) | 1.69 (6) | 0.51 (5) | 0.95 (6) | 42.1 (6) | 19.7 (6) | 3.53 (6) |
| - mix ¹ | 11.2 (5) | 32.1 (5) | 10.3 (5) | 18.8 (4) | 0.83 (4) | 1.43 (5) | 0.47 (4) | 0.48 (5) | 46.6 (5) | 18.2 (1) | 2.34 (3) |
| - corn | 13.4 (6) | 33.2 (8) | 7.0 (8) | 16.7 (8) | 0.92 (7) | 1.92 (8) | 0.45 (7) | 0.39 (8) | 51.8 (6) | 18.9 (6) | 2.30 (1) |
| Pasture | 10.1 (18) | 25.0 (20) | 9.6 (20) | 19.7 (20) | 3.15 (20) | 1.04 (17) | 1.30 (20) | 0.75 (17) | 38.1 (18) | 21.1 (13) | 4.25 (7) |
| Oilseeds | | | | | | | | | | | |
| - soybean | 11.2 (4) | 29.4 (4) | 10.8 (4) | 16.8 (4) | 0.99 (3) | 3.01 (4) | 0.66 (4) | 0.45 (4) | 43.9 (4) | | |
| - rapeseed | 10.8 (6) | 28.5 (6) | 12.5 (6) | 21.2 (6) | 1.28 (3) | 2.26 (5) | 0.75 (5) | 0.41 (6) | 42.2 (6) | 25.0 (1) | 6.4 (1) |
| - mix ² | 11.3 (3) | 33.5 (3) | 10.4 (3) | 21.4 (3) | | 2.64 (3) | 0.55 (2) | 0.3 (3) | 48.1 (3) | | |
| | EFA ⁶ | PUFA n-6 ⁷ | PUFA n-3 ⁷ | C18 ³ | SFA/UFA ⁸ | n-6/n-3 ⁷ | HFA/C18 ³ | AI ⁹ | DI ⁹ | SI ⁹ | |
| | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | Mean (n) | |
| Silage | | | | | | | | | | | |
| - grass | 1.67 (13) | 1.33 (10) | 0.51 (10) | 27.6 (13) | 2.82 (10) | 2.77 (10) | 1.77 (11) | 3.58 (10) | 0.62 (16) | 0.50 (13) | |
| - legume | 2.64 (6) | 2.09 (6) | 1.20 (6) | 30.1 (6) | 2.49 (6) | 1.95 (6) | 1.41 (6) | 2.83 (6) | 0.64 (6) | 0.64 (6) | |
| - mix ¹ | 1.91 (5) | 1.97 (4) | 0.68 (4) | 30.3 (4) | 2.89 (1) | 2.98 (4) | 1.59 (4) | 3.46 (4) | 0.65 (4) | 0.59 (4) | |
| - corn | 2.31 (8) | 2.43 (5) | 0.43 (5) | 26.0 (8) | 3.03 (6) | 6.21 (5) | 2.09 (6) | 3.82 (5) | 0.70 (8) | 0.50 (8) | |
| Pasture | 1.79 (17) | 1.56 (14) | 0.99 (14) | 30.5 (17) | 2.36 (10) | 1.69 (14) | 1.33 (15) | 2.45 (13) | 0.67 (20) | 0.79 (20) | |
| Oilseeds | | | | | | | | | | | |
| - soybean | 3.45 (4) | 4.08 (2) | 1.64 (2) | 32.5 (4) | 2.24 (4) | 2.49 (2) | 1.45 (4) | 2.52 (4) | 0.67 (4) | 0.75 (4) | |
| - rapeseed | 2.29 (6) | 2.17 (5) | 1.02 (5) | 37.3 (6) | 1.79 (6) | 1.71 (5) | 1.20 (6) | 2.17 (6) | 0.67 (6) | 0.92 (6) | |
| - mix ² | 2.95 (3) | 2.88 (3) | 0.76 (3) | 35.1 (3) | 2.1 (2) | 3.79 (3) | 1.39 (3) | 1.90 (3) | 0.68 (3) | 0.67 (3) | |

* Values for forages calculated from 15 publications [46], values for oilseeds calculated from eight publications [22,27,32,33,55–58]; ¹ mix from various proportions of corn and grass silages; ² mix of oilseeds (rapeseed + soybean or rapeseed + sunflower); ³ HFA—hypercholesterolaemic FAs (\sum C12:0, C14:0 and C16:0); ⁴ C18—(\sum C18:0, C18:1 c9, 18:2 n-6 and 18:3 n-3); ⁵ t-MUFA—*trans*-isomers of monounsaturated FAs C18:1, including C18:1 t11; ⁶ EFA—essential FAs (\sum C18:2 n-6 and C18:3 n-3); ⁷ PUFA—polyunsaturated FAs, n-6 and n-3; ⁸ SFA/UFA—saturated/unsaturated FA ratio; ⁹ AI—atherogenic index [(C12:0 + 4 × C14:0 + C16:0)/(\sum MUFA + \sum (n-6) + \sum (n-3))], DI—desaturation index [C18:1 c9/(C18:0 + C18:1 c9)], SI—spreadability index [C18:1 c9/C16:0].

3.2. Effects of Dairy Cow Farming System (Organic Versus Conventional)

As the most important factor affecting the variability of milk FA profile is dairy cow nutrition, comparison of organic (OS) and conventional (CS) farming systems seems to be very important. OS is characterized by grazing, with a reduced amount of conserved forage (but a higher ratio of this type of feed than concentrates) and a small proportion of grain concentrates compared to CS. The main reason for the differences between organic and conventional milk is predominantly in terms of nutritionally desirable components, rather than a genotypic effect [59,60].

In terms of nutrition, comparing milk fat of organic and conventional milk is interesting. Statistically significant differences between OS and CS were only found in the proportions of PUFA and TFA. Both groups of FAs were found to have higher proportions in organic milk [46,61] than in conventional milk. These differences were mainly observed for PUFA n-3 [62–64]. The increase of PUFA n-3 in organic milk is due to a significantly higher ALA proportion (0.51, 1.85%; Table 2). In contrast, due to the reduced LA proportion (2.74, 2.39%), milk fat of organic milk had a total reduction in PUFA n-6 (2.54, 2.03%).

Table 2. Proportions of some fatty acids (FAs) and their groups in bovine milk fat (g 100 g⁻¹ of FA) depending on rearing type *.

| | Conventional Herds | | Organic Herds | |
|-----------------------|--------------------|----------|---------------|----------|
| | Mean | <i>n</i> | Mean | <i>n</i> |
| C18:2 n-6 | 2.74 | 2 | 2.39 | 3 |
| C18:3 n-3 | 0.51 | 6 | 1.85 | 8 |
| C18:1 t11 | 1.82 | 5 | 2.74 | 7 |
| C18:2 c9,t11 | 0.64 | 9 | 0.91 | 11 |
| SFA ¹ | 68.2 | 7 | 68.3 | 9 |
| MUFA ² | 26.8 | 7 | 27.0 | 9 |
| PUFA ³ | 4.39 | 7 | 4.91 | 9 |
| PUFA n-6 ³ | 2.54 | 6 | 2.03 | 7 |
| PUFA n-3 ³ | 0.76 | 4 | 0.87 | 4 |
| S/U ⁴ | 2.19 | 7 | 2.17 | 9 |
| n-6/n-3 ³ | 4.29 | 5 | 2.65 | 6 |

* Means and numbers of cases from six publications: [62–67]; ¹ SFA—saturated FAs; ² MUFA—monounsaturated FAs; ³ PUFA—polyunsaturated FAs, n-6 and n-3 series and their n-6/n-3 ratio; ⁴ S/U—ratio between saturated and unsaturated FAs.

In extensive herds (low-input non-organic farms) with mostly pasture-based feeding (94% of dry matter in feed ration) and no conserved forage, the increase in RA, ALA and MUFA was even more pronounced than in OS and CS where pasture was combined with conserved feeding [66]. On the other hand, the amount of fresh forage (pasture) did not significantly affect the composition of milk fat [68]. This finding may be due to the type of forage used in the study, as the predominant proportion was ryegrass. Ryegrass, in contrast to botanically diverse grass and pasture growth [49,69], has a small proportion of ALA. Furthermore, increased amounts of natural and fat-soluble antioxidants (alpha-tocopherol and beta-carotene) have been found in the milk fat of extensively reared dairy cows. These antioxidants probably influence oxidative stability, which is beneficial considering the higher proportion of UFA in this milk fat [66].

Similarly, C18:1 c9, LA, and ALA, were more abundant in organic milk compared to conventional milk in the relevant study [7]. In particular, LA and ALA were 24% and 50% higher in organic milk, respectively ($p < 0.05$). In contrast, C16:0 and C18:0 were 10% higher in conventional milk ($p < 0.05$). SFAs were 4% higher in conventional milk; whereas, UFAs were 9% higher in organic milk ($p < 0.05$). PUFAs, including the essential FAs n-6 and n-3, were 25% higher in organic milk. Furthermore, the nutritionally desirable FA parameters indicated by the n-6/n-3 and PUFA/MUFA ratios were 33% and 25% higher in organic milk than in conventional milk, respectively. In general

accordance with the above-mentioned results, concentrates, corn (or other) silage, hay, and straw decreased the nutritionally desirable FAs such as MUFA, PUFA, PUFA n-3, ALA, and n-6/n-3 ratio; whereas, these feeds increased SFA, PUFA n-6, and LA [60].

Results for MUFA and PUFA show greater consistency, and higher proportions of VA, RA, ALA, and eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5 n-3) in organic milk have been reported independent of the country of origin [70].

It is interesting that organic milk usually yields more nutritionally favorable FA profiles (like PUFA, PUFA n-3, ALA and RA) than conventional milk [60,61,71]. This could be hypothetically explained by more arguments which are linked with the increased proportion of fresh forage in dairy cow nutrition [7]: –dairy cow feeding under low-input (pasture) and organic conditions has usually higher UFA proportion [12,25,26,32,39,47,72,73]; –there can be reduced rumen biohydrogenation [7,72–74]; – Δ 9-desaturase activity can be influenced either positively [7] or mostly negatively in dependence on long-chain UFA intake [73], extent of PUFA n-3 inhibiting activities [75], content of *de novo* and preformed FAs [74] or precursor concentrations [28]. Also, higher polyphenol and terpenoid intake by cows in OS inhibit hydrogenation by microorganisms in the rumen and this can lead to the higher proportions of desirable FAs in organic milk [62,76,77].

In general, up to 44% of milk fat can originate from a cow's diet. Therefore, management of animal nutrition during lactation is considered to be critical for producing a high quality FA profile in milk fat, more so than any other factors such as cow breed and genotype, age, health, and aspects of lactation [7,62,65,76].

3.3. Effect of Lactation and Energy Status

Lactation stage, along with energy balance of dairy cows, has an impact on the FA profile of cow's milk. Changes in milk FA composition during lactation, particularly at the beginning of lactation, originate from altered activity in pathways of FA derivation (i.e., the diet; *de novo* synthesis in mammary glands; ruminal biohydrogenation; body fat mobilization) [78–81]. Lactation itself is characterized by alternating cycles of lipolysis and lipogenesis in body stores that allow the cow to meet her energy requirements for milk secretion. The increased energy demands of foetal development and milk secretion are mainly evident in the transition period of lactation [82]. Therefore, cows, like other lactating animals, often enter a negative energy balance (NEB) at the start of lactation [83], approximately during the initial 30 days [84], or even up to 70 to 84 days postpartum (pp) [85]. Mammary function has metabolic priority and thus, in the NEB state, the limited available nutrients in an organism are directed to milk synthesis for survival of offspring [86]. Body reserves (fat, and to a lesser degree, protein) are mobilized [87] through homeostatic regulation [85,88]. This mobilization results in a loss of body condition score (BCS) and live weight [89–91] as a physiological mechanism to overcome the energy deficit. Consequently, non-esterified FAs (NEFAs) are released from body fat reserves, with increasing NEFA levels in blood suggesting a shortfall in energy balance [92]. NEFA metabolites are directed into the mammary gland to supply milk triglycerides or utilized in the liver [86,93–95].

Thus, the beginning of lactation is the most demanding period in terms of energy status and also herd health management [83,86,96,97]. High utilization of energy reserves during this period is reflected in milk fat content [98], namely in the FA composition and mutual ratios between individual FA groups [99]. The general pattern can be described as follows: a high uptake of long-chain FAs by the mammary gland affects *de novo* synthesis of FAs through the inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase [8]. Therefore, SFAs, especially C16:0, are at their lowest proportion in week 1 pp, with increasing amounts until 12 weeks pp (as the energy balance improves). On the other hand, MUFAs, mainly represented by C18:1 *c*9, decrease in proportion until week 12 pp [8,78,80,81,100] (Figure 2).

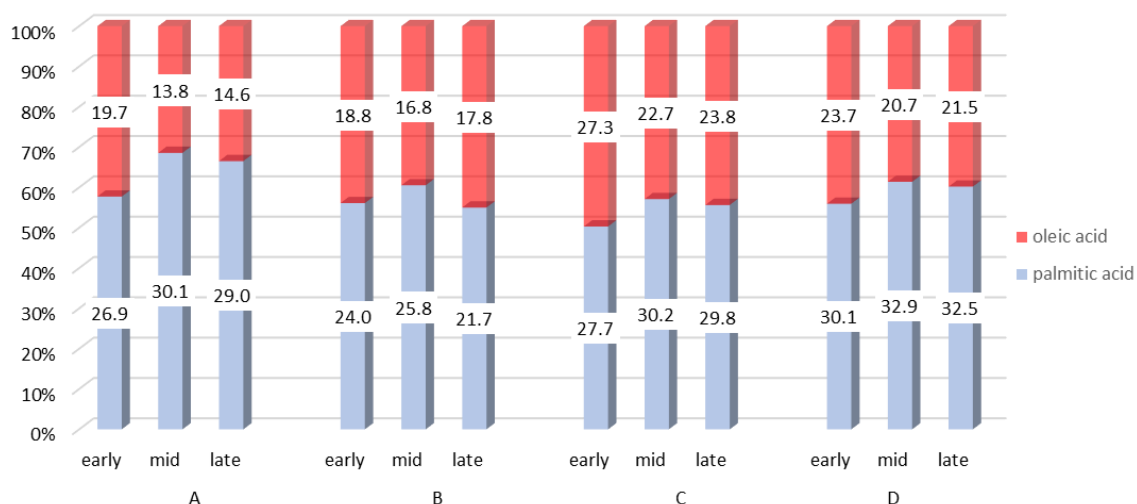


Figure 2. Proportions of palmitic and oleic acids ($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ of fatty acids) depending on lactation stage. References: A = [100], B = [101], C = [102], D = [103].

Oleic acid, as the predominant FA in adipocytes, is primarily released through lipolysis during NEB [104,105]. Moreover, adipocytes of high genetic merit cows were found to be more sensitive to lipolysis [106]. An elevated proportion of C18:1 *c9* in milk fat is a suitable marker for NEB not only in the early lactation period but also in any stage of lactation when fasting and ketosis occur [107]. This was confirmed by a study in which NEB was deliberately induced by feed restriction and it was found that changes in the FA profile follow similar patterns as in the case of NEB in early lactation. Specifically, there is a decreasing proportion of short-chain FAs and an increasing amount of long-chain FAs during NEB. The proportion of PUFA was relatively constant in both postpartum- and feed restriction-induced NEB [81].

With improvements in energy balance through progression of lactation or increased feed intake, the FA profile of milk markedly changed [81]. A significantly higher proportion of SFAs, described around day 150 pp, was associated with the later stages of lactation [97], when animals were no longer in NEB. Similarly, the lower proportion of MUFAs around day 150 pp indicates a well-balanced energy intake in cows [99]. Some studies have suggested using measurements of milk FAs, particularly those of long-chain FAs, as indicators of energy status in dairy cows [81,97,107].

According to the aforementioned facts, it is obvious that milk FA composition primarily reflects differential utilization of body fat stores. In this context, the BCS of a dairy cow is a useful tool for indicating energy status. BCS may play a role in regulating appetite and feed intake, thereby affecting milk production and its composition. The optimal calving BCS is 3.0 to 3.25; whereas, a lower calving BCS is associated with reduced milk yield. A BCS ≥ 3.5 is associated with reduced dry matter intake, resulting in decreased milk yield and an increased risk of metabolic disorders [85]. The BCS at calving is positively correlated with milk fat components derived from adipose tissue (long-chain and UFA) and negatively related to short-chain FAs synthesized from ruminal acetate [108,109].

Metabolic status of dairy cows is further affected by parity [110], although studies disagree as to the relationship. Some studies have reported that primiparous cows have greater corporal reserves (BCS) during their postpartum periods than multiparous cows [85,110]. According to other studies, primiparous cows have a lower BCS to begin with and a greater decrease in BCS than multiparous cows [111,112]. Additionally, one study found no difference in BCS based on parity [113]. Due to the high energy requirements for continued body growth [17,113], primiparous cows invest less body reserves into their milk yield compared to multiparous cows. Peak NEFA concentrations occurred at 4 weeks pp for primiparous cows; however, multiparous cows had two peaks—the first at week 1 and the second at week 4 pp. Multiparous cows showed a larger NEB with longer duration than primiparous cows [110].

Considering the health aspects, a more desirable FA composition is observed in cow's milk at the beginning of lactation (i.e., between days 10 and 30 pp). Three FAs that are referred to as HFA [114] are lowest at the start of lactation but increase as lactation progresses. By contrast, the proportions of C18:1 *c*9 and LA, which are considered to have cardioprotective effects, are present in higher amounts early in lactation [16,81]. RA is another FA with health benefits [115]. According to some studies, stage of lactation has little effect on RA content [10]; however, others have reported an increasing proportion of RA in late lactation [18,116].

In terms of parity, primiparous cows have a nutritionally more desirable FA composition, with a lower proportion of SFA and a higher proportion of UFA and RA [117,118].

4. Effects of Genetics and Breeding of Cattle on Milk FA Profile

Use of genetic knowledge to alter milk fat is possible only with these prerequisites: (1) genotypic and phenotypic variation; and (2) accurate estimation of genetic parameters (i.e., heritability, genetic correlation). Fat content is much more variable in comparison to other milk constituents (e.g., protein, lactose). High variability was found not only in fat content, but also in the proportion of FAs and their groups [46,119,120]. Regarding phenotypic differences in individual FAs, variability is higher for UFA than for SFA (Table 3). This is primarily related to the pathway of FA biosynthesis [121–123]. Most SFAs are synthesized *de novo* (in mammary epithelial cells); whereas, most UFAs are obtained from the diet and body fat stores [98].

Table 3. Mean and coefficient of variation (CV; %) for milk yield, content of fat, protein, and lactose (g·100 g⁻¹ of milk), and groups of fatty acids (FAs)¹.

| | Holstein (Belgium) [124] | | Holstein (Italy) [120] | | Holstein (Brazil) [125] | |
|----------------------------------|---|------|------------------------|------|-------------------------|------|
| | Mean | CV | Mean | CV | Mean | CV |
| Milk yield (kg/day) | 23.1 | 25.9 | 31.6 | 28.5 | 34.2 | 29.5 |
| Fat (g·100 g ⁻¹) | 3.96 | 13.7 | 3.70 | 18.9 | 3.45 | 21.7 |
| Protein (g·100 g ⁻¹) | 3.34 | 9.7 | 3.40 | 11.8 | 3.05 | 9.9 |
| Lactose (g·100 g ⁻¹) | | | | | 4.60 | 5.2 |
| | Groups of FA (g·100 g ⁻¹ of milk (g·100 g ⁻¹ of fat)) | | | | | |
| SFA | 2.79 (74.17) | 16.5 | 2.58 (73.40) | 20.5 | 2.23 (68.04) | 22.7 |
| UFA | 1.31 (34.79) | 17.3 | 1.11 (31.58) | 21.6 | 1.03 (31.43) | 28.8 |
| MUFA | 1.13 (29.98) | 18.2 | 0.91 (25.89) | 22.0 | 0.87 (26.54) | 30.8 |
| PUFA | 0.17 (4.43) | 19.2 | 0.09 (2.56) | 33.3 | 0.16 (4.88) | 30.8 |

¹ SFA—saturated FAs; UFA—unsaturated FAs; MUFA—monounsaturated FAs; PUFA—polyunsaturated FAs.

Finally, knowledge of genetic parameters is important for the design of animal breeding programs and for prediction of selection responses [125]. Evaluation is estimated based on pedigree data; however, the implementation of genetic evaluations for milk FA profile has been limited to a great extent due to the reference method of FA analysis—costly and time-consuming GC [119,120,126]. Use of newer routine methods (MIR-FT) for FA analysis eliminated this drawback and has revealed great potential for genetic analysis of FAs at the population level [120].

4.1. Heritability Estimates

The first studies on heritability of FA profiles began in the 1970s [127,128]. These were performed in dairy cows using GC results of FA profiles of very small progeny populations and twins. The results were therefore somewhat limited; however, the studies did increase interest in the topic and over the last decade, especially, many follow-up studies have been published (Table 4). Increasing interest in this topic was initiated by new findings in genetic research and developments in the methods for FA determination (i.e., increased speed and ease of use as well as reduced cost of FA analysis) [119,123,124].

Generally, heritability depends on FA saturation and on carbon numbers of the FAs (Table 4). As such, heritability estimates are mostly higher for SFAs than for UFAs, and an increase in carbon number reflects a decrease in the heritability estimate (higher heritability for short- and medium-chain FAs than for long-chain FA groups) [123,124,129,130]. Consistently, these estimates correspond with the FA biosynthesis mechanism. *De novo* synthesized FAs are influenced mainly by animal factors (breed, parity, stage of lactation); whereas, pre-formed FAs are influenced by feed factors [98]. However, some authors [124,125] have reported slightly higher heritability estimates in PUFA than in MUFA. This difference could be due to the pathway of RA synthesis. RA is produced not only through biohydrogenation of LA in the rumen, but also to a much larger extent (about 80%) by endogenous synthesis from VA by the $\Delta 9$ -desaturase enzyme in the mammary gland and other tissues [131]. Therefore, there is a noticeable effect of genetic variance.

As shown in Table 4, there are considerable differences in heritability estimates between some studies. The authors mostly agree that this variation in heritability estimates can be explained by the following: (1) the units used to express FA concentrations (i.e., $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ of milk vs. $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ of FA vs. $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ of fat); (2) the methods used for FA analysis (reference GC vs. routine MIR-FT); (3) the models used for estimation of heritability (genome- or pedigree-based analyses); and (4) the database structure. These database structures are determined by the relative genetic and environmental variances because each have a different design given by the number of herds (breeds, sires, cows) or by the number of samples available for analysis [101,122,132,133]. Heritability estimates also differ by parity or stage of lactation [125] and the feeding system [122].

Some studies [121,122,126] provide evidence that additive genetic effects are responsible for a significant proportion of the phenotypic variation in $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cows. Heritability estimates were comparable to the heritability of milk yield. Desaturase activity could, therefore, be used in future breeding programs to improve the FA profile of milk fat by increasing the proportions of MUFA and RA and by decreasing the SFA proportion.

4.2. Genetic and Phenotypic Correlations

Heritability estimates for FAs are usually higher for FAs expressed in 100 g of milk or in g per day, rather than in 100 g of fat or 100 g of FA [132,134]. This demonstrates the considerable effect of milk yield and fat content [135]. Both parameters (milk yield, fat content) are strongly influenced by breed, cow's individuality, parity, and stage of lactation. Thus, it seems the relationships between milk performance parameters and individual FAs could be useful for understanding the effects of biological factors and, to a certain extent, for determining the extent of the differences [46].

Table 4. Overview of heritability, method ¹, number of samples (cows and sires), breed ², and country ³ for selected milk fatty acids (FAs) and their groups ⁴.

| Reference | Method | g-100 g ⁻¹ | Number of | | | Breed | Country | Heritability ⁵ | | | | | | | | | | | | |
|-----------|--------|-----------------------|-----------|---------|-------|-------|---------|------------------------------|---------|-------|---------|--------|--------|-------|--------|------|------|------|------|--------|
| | | | Samples | Cows | Sires | | | h ² | MY (kg) | F (%) | FY (kg) | C14:0 | C16:0 | C18:0 | C18:1 | CLA | SFA | UFA | MUFA | PUFA |
| [132] | GC | of FA | 592 | 233 | 53 | H | US | h ² _{IH} | 0.11 | | 0.19 | <0.001 | 0.09 | 0.24 | 0.06 | | 0.05 | | 0.08 | <0.001 |
| [14] | MIR-FT | of fat | 52,950 | 3,217 | 1,666 | H | BE | h ² _G | 0.20 | 0.33 | | 0.15 | 0.15 | 0.16 | 0.17 | | | | | |
| [135] | GC | of fat | | 1,918 | 101 | H | NL | h ² _G | 0.29 | 0.47 | 0.29 | 0.49 | 0.31 | 0.19 | 0.18 | 0.21 | | | | |
| | GC | of fat | | 1,918 | 101 | H | NL | h ² _{IH} | 0.41 | 0.51 | 0.39 | 0.59 | 0.43 | 0.23 | 0.25 | 0.42 | | | | |
| [101] | GC | of fat | | 990 | | H | IT | | | | | 0.07 | 0.03 | 0.08 | 0.17 | 0.12 | | | 0.14 | |
| [122] | GC | of FA | | 2,408 | 597 | HF | GB | | 0.35 | | | 0.09 | 0.06 | 0.04 | 0.12 | 0.02 | 0.14 | | 0.09 | 0.03 |
| [124] | MIR-FT | of milk | 130,285 | 26,166 | | H | BE | | 0.20 | 0.39 | 0.17 | 0.44 | 0.41 | 0.23 | 0.18 | | 0.43 | 0.22 | 0.21 | 0.30 |
| [136] | MIR-FT | of milk | 143,332 | 29,792 | | H | BE | | 0.31 | 0.68 | 0.29 | 0.68 | 0.67 | 0.60 | 0.52 | | 0.68 | 0.60 | 0.58 | 0.69 |
| [126] | GC | of fat | | 371 | 200 | H | DK | h ² _G | | 0.24 | | 0.25 | 0.14 | 0.19 | 0.11 | 0.19 | 0.09 | 0.33 | 0.34 | 0.28 |
| [133] | GC | of FA | | 371 | | H | DK | h ² _G | | | | 0.16 | <0.001 | 0.14 | <0.001 | | | | | |
| | MIR-FT | of FA | | 371 | | H | DK | h ² _G | | | | 0.17 | 0.36 | 0.33 | 0.07 | | | | | |
| [120] | MIR-FT | of milk | 72,848 | 17,873 | 1,235 | H | IT | h ² _G | 0.10 | 0.20 | | | | | | | 0.25 | 0.07 | 0.08 | 0.08 |
| | MIR-FT | of milk | 72,848 | 17,873 | 1,235 | H | IT | h ² _{IH} | 0.14 | 0.24 | | | | | | | 0.29 | 0.09 | 0.10 | 0.15 |
| [137] | GC | of fat | | 339 | | H | DK | h ² _P | | | | 0.16 | 0.21 | 0.11 | 0.07 | 0.13 | | | | |
| | GC | of fat | | 339 | | H | DK | h ² _G | | | | 0.08 | 0.17 | 0.17 | 0.02 | 0.18 | | | | |
| [125] | MIR-FT | of milk | 36,457 | 4,203 | 226 | H | BR | h ² _P | | | | | 0.26 | 0.13 | 0.07 | | 0.25 | 0.08 | 0.07 | 0.11 |
| | MIR-FT | of milk | 36,457 | 4,203 | 226 | H | BR | h ² _G | | | | | 0.26 | 0.14 | 0.07 | | 0.25 | 0.08 | 0.07 | 0.11 |
| [129] | MIR-FT | of milk | 241,236 | 33,555 | | H | BE | h ² _G | | | | 0.42 | 0.38 | 0.19 | 0.15 | | 0.40 | 0.20 | 0.19 | |
| [123] | MIR-FT | of fat | 612,321 | 132,731 | | H | DK | h ² _{IH} | | | | 0.09 | 0.14 | 0.11 | 0.13 | | 0.15 | | 0.15 | 0.08 |
| | MIR-FT | of fat | 95,920 | 21,967 | | J | DK | h ² _{IH} | | | | 0.07 | 0.16 | 0.09 | 0.10 | | 0.10 | | 0.10 | 0.11 |

¹ MIR-FT—Infrared spectroscopy in mid-range with Fourier transformation; GC—gas chromatography; ² H—Holstein; HF—Hereford; J—Jersey; ³ BE—Belgium; BR—Brazil; DK—Denmark; GB—Great Britain; IT—Italy; NL—Netherlands; US—the United States; ⁴ CLA—conjugated linoleic acid; SFA—saturated FAs; UFA—unsaturated FAs; MUFA—monounsaturated FAs; PUFA—polyunsaturated FAs; ⁵ h²_G—genomic; h²_{IH}—intra-herd; h²_P—pedigree; heritability is estimated based on linear models; the estimate of H²_G, H²_{IH}, H²_P is different by the number of variables involved (σ^2_A , σ^2_E , σ^2_{PEAL} , σ^2_{PEWL} , etc.); MY—milk yield; F—fat content; FY—fat yield.

Overall, results for genetic correlations indicate that cows are genetically predisposed to produce more SFA when fat content increases [120]. On the other hand, fat content can be negatively correlated with UFA, suggesting selection for increased fat content will decrease these FAs [123,135] (Table 5).

FAs were negatively correlated with milk yield and protein yield, but positively correlated with fat yield, fat content, and protein content [119]. Very similar genetic correlations have been reported [120] for FAs depending on FA saturation.

It has been noted [124] that correlations of FAs with milk yield vary across days in milk. Many FAs have genetic correlations with milk yield that are close to zero at the beginning of lactation; yet, as lactation progresses, these correlations become more negative. These differences mean that selecting for milk yield at different stages of lactation could have variable effects on FA content. This may be affected by the energy balance status of cows in early lactation because the highest correlations with lactation were observed for C18:1 *c9*, which is an indicator of body fat mobilization (0.42 at 5 days in milk and −0.40 at 230 days in milk).

Table 5. Genetic and phenotypic correlations (r^1) between fat content or milk yield and selected fatty acids (FAs) and their groups.

| Reference | r^1 | C14:0 | C16:0 | C18:0 | C18:1 | CLA | SFA | MUFA | PUFA |
|------------------------------------|-------|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Fat Content (g·100 g ⁻¹) | | | | | | | |
| [121] | G | −0.43 | 0.65 | 0.01 | | −0.58 | | | |
| | P | −0.27 | 0.43 | 0.08 | | −0.32 | | | |
| [123] | G | 0.06 | 0.17 | −0.14 | −0.26 | | 0.34 | −0.33 | −0.26 |
| | P | −0.04 | −0.05 | 0.02 | −0.04 | | 0.09 | −0.08 | −0.07 |
| [125] | G | | 0.98 | 0.86 | 0.80 | | 0.99 | 0.79 | 0.52 |
| | P | | 0.90 | 0.82 | 0.81 | | 0.95 | 0.83 | 0.71 |
| [101] | G | −0.40 | 0.74 | 0.28 | 0.02 | −0.55 | | 0.01 | |
| [135] | G | −0.43 | 0.65 | 0.01 | −0.63 | | | | |
| [119] | G | 0.84 | 0.88 | 0.71 | 0.64 | | 0.91 | 0.72 | 0.69 |
| Milk Yield (kg·day ⁻¹) | | | | | | | | | |
| [125] | G | | −0.35 | −0.28 | −0.29 | | −0.36 | −0.32 | −0.38 |
| | P | | −0.09 | −0.06 | −0.01 | | −0.06 | −0.03 | −0.03 |
| [135] | G | 0.30 | −0.50 | 0.15 | 0.32 | | | | |
| [119] | G | −0.34 | −0.33 | −0.30 | −0.31 | | −0.36 | −0.35 | −0.37 |

¹ Correlation coefficient; G—genetic; P—phenotypic; CLA—conjugated linoleic acid; SFA—saturated FAs; MUFA—monounsaturated FAs; PUFA—polyunsaturated FAs.

Similar to heritability estimates, genetic correlations vary depending on parity [119], with the highest correlations found for first lactation and the lowest for third lactation (for all FAs and their groups).

It should be noted that it is also possible to apply genetic information in attempts to make changes to fat composition, even though UFA expressed a strong negative phenotypic correlation and a weak genetic correlation [126].

4.3. Gene Polymorphism

A large number of genes participate in milk fat biosynthesis (Table 6). Despite the availability of whole-genome association studies [138–143], our knowledge of the role of various genes is not yet complete. Therefore, identified genes are called candidate genes. Candidate genes for milk fat biosynthesis are associated with different activities, such as: acetate and FA activation and intra-cellular transport (*ACSS2*, *FABP3*), synthesis and desaturation of FAs (*FASN*, *SCD1*), triacylglycerol synthesis (*AGPAT6*, *DGAT1*), regulation of transcription (*SREBF1*, *PPARGC1A*), and

others [144]. Polymorphisms in these genes may affect fat content or FA profile and consequently the technological properties of milk fat.

In relation to FA profile, polymorphisms of the *DGAT1* (K232A) and *SCD1* (A293V) genes have been thoroughly studied [53,145,146]. Genetic variance explained by *DGAT1* is lower (3–15%) than the variance explained by the *SCD1* (6–52%) polymorphism [147].

4.4. Effects of Cattle Breed on Milk FA Profile

Cattle breed may affect the FA profile of milk [11,18,30,35,134,148–151]; however, its influence has sometimes been shown to be limited [17,30]. Ever since the early days of cattle domestication, but especially over the last 150 years, gene homogeneity within milked breeds has increased. In this way, genotypic and consequently phenotypic differences have become more pronounced between breeds for desirable properties (exteriors, metabolic, etc.), including differences in the FA profile. However, according to a summary of past research results, the influence of breed on FAs can be considered a minor effect compared to the practical influences associated with cow diet. A qualified estimate would be able to evaluate the breed effect on FA variability as 20% compared to about 55% that can be attributed to nutritional and feeding performance, while other effects (25%) are related to lactation factors (for instance).

Some papers have described significant milk FA profile differences between cattle breeds [35,134,149–151]. The most often studied milked dairy cattle breeds were Holstein (H), Jersey (J), Simmental, Brown Swiss (BS), Ayrshire (A), and Montbéliarde (M) [10,49,69,149,152–158]. These results have been summarized [18] as FA profiles for breeds H, J, BS, A and M. For instance, for MUFA, there were mean variation ranges (in g·100 g⁻¹ of FAs) as follows (for the same order of breeds as listed in the previous sentence): 25.0–39.9; 20.9–22.5; 20.9–29.7; 21.5–24.8; and 16.1–22.0. The same figures for PUFA were: 3.3–4.9; 3.2–3.5; 2.8–4.7; 2.5–4.3; and 2.6–3.2.

In a recent study from an organic farm, Simmental milk had, in the total content of FAs, a significantly higher content of C12:0, C16:1 *c*9, C17:1 *t*9, LA, ALA, C20:1 *c*9, C20:4 *n*-6, PUFA, and UFA, as compared to Holstein-Friesian (HF) milk. Additionally, Simmental milk had a lower amount of C15:0, C18:0, C20:0, C22:0, and CLA. Compared to HF milk, the PUFA/SFA and UFA/SFA ratios in the Simmental milk were significantly higher; whereas, the thrombogenic index and the LA/ALA ratio were significantly lower [151].

Some minor local breeds have also been studied with regard to milk FA profile [159]. The Polish Red and White breed had a relatively lower content of nutritionally controversial C14:0 and C16:0 as compared to milk of other breeds. Furthermore, their milk proved to be an excellent source of VA and RA, especially during the grazing season.

In general, it is possible to state that local cattle breeds tend to have a better milk fat composition with respect to desirable FAs than breeds that are more efficient in terms of dairy yield. However, these breeds are more often kept under extensive conditions (more often OS), which is also related to a typical variation in dairy cow diet—the proportion of ingredients in the feeding ration is more in favor of forage (fresh or preserved) compared to grain concentrates than under intensive conditions. There have not yet been enough experiments on breed differences in milk FA profile that have been carried out on cows with the same nutritional conditions (for instance Holstein versus a local extensive breed). Of course then, it is possible that a portion of these breed FA differences is primarily defined by dietary sources.

Table 6. Overview of selected candidate genes coding enzymes that affect bovine milk fat and fatty acids (FAs).

| Reference | Gene | Gene Name | BTA ¹ | Polymorphism | Associated with: ² |
|-----------|----------------|---|------------------|----------------|--|
| [160] | <i>FABP3</i> | <i>fatty acid-binding protein 3</i> | 2 | A/G transition | fat (↑) and protein (↑) content |
| [161] | <i>LEP</i> | <i>leptin</i> | 4 | A80V | milk yield (↑) |
| [162] | <i>ABCG2</i> | <i>ATP binding cassette, subfamily G, member 2</i> | 6 | Y581S | milk yield (↑), fat (↑) and protein (↑) content |
| [163] | <i>PPARGC1</i> | <i>peroxysome proliferator-activated</i> | 6 | T19C | fat yield (↑) |
| [164] | <i>A</i> | <i>receptor gamma, coactivator 1 alpha</i> | | A968C | milk yield (↑), protein content (↑) |
| [141] | <i>ACSS2</i> | <i>acyl-CoA synthetase, short-chain family, member 2</i> | 13 | n.a. | activation and intracellular channeling of FAs |
| [165] | <i>DGAT1</i> | <i>diacylglycerol O-acyltransferase 1</i> | 14 | K232A | fat content (↑) |
| [121] | | | | | C16:0 (↑), C14:0 (↓), C18u (↓), CLA (↓) |
| [139] | <i>ACLY</i> | <i>ATP citrate lyase</i> | 19 | n.a. | biosynthesis of milk fat (especially C14:0) |
| [166] | <i>FASN</i> | <i>fatty acid synthase</i> | 19 | T1950A | fat content (↑), C14:0 (↑) |
| [167] | <i>GH</i> | <i>growth hormone</i> | 19 | GH4.1 GH6.2 | milk (↑), fat (↑) and protein (↑) yield |
| [168] | <i>STAT5A</i> | <i>signal transducer and activator of transcription 5A</i> | 19 | A9501G | milk yield (↑), protein content (↑) |
| [169] | <i>SREBF1</i> | <i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i> | 19 | L852P | haplotype H1 – effects on C12:0 (↓) and C14:0 (↓) |
| [170] | <i>GHR</i> | <i>growth hormone receptor</i> | 20 | GHR4.2 | milk yield (↑) |
| [147] | <i>SCD1</i> | <i>stearoyl-CoA desaturase 1</i> | 26 | A293V | indices C10 (↓), C12 (↓), C14 (↓), C16 (↑), C18 (↑), CLA (↑) |
| [171] | <i>AGPAT6</i> | <i>1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6</i> | 27 | n.a. | fat content (↑) |

n.a.—not available; ¹ BTA—*Bos taurus* autosome; ² C18u—unsaturated C18; CLA—conjugated linoleic acid; ↑—an increase; ↓—a decrease.

The variability of FAs in bovine milk due to genetic factors and FA profile differences among cattle breeds have been well-studied [35,134,149,150,172]. Often, significant differences between breeds have been found, as well as acceptable genetic correlations and heritability coefficients for major FAs and their groups. The moderate heritability estimates for major FAs observed in these studies may suggest a genetic effect. Therefore, using genetic information to improve the nutritional quality of milk fat based on FA profiles might be possible. Based on these findings, FA profile data may be useful as a marker for genetic improvements (by breeding, selection) of bovine milk fat nutritional quality (i.e., to increase proportions of FAs that are desirable in terms of human nutrition).

5. Indices for Evaluation of Milk Fat Quality

Because it is difficult to evaluate the nutritional and also technological value of milk fat from the content of individual FAs, some ratios or indices have been proposed. First, these indices were used primarily to evaluate the negative effect of C12:0, C14:0, and C16:0 on human health. Formulas for calculating the atherogenic (AI) and thrombogenic (TI) indices as well as a modified calculation of S/P were proposed by Ulbricht and Southgate [173]:

$$AI = (C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0) / (\sum MUFA + \sum(n-6) + \sum(n-3)); \quad (1)$$

$$TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / ((0.5 \times \sum MUFA + 0.5 \times \sum(n-6) + 3 \times \sum(n-3)) + (\sum(n-3) / \sum(n-6))); \quad (2)$$

$$S/P = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / (\sum MUFA + \sum PUFA). \quad (3)$$

Furthermore, the hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic ratio (HH) is calculated according to Santos-Silva et al. [174]:

$$HH = (C18:1 \text{ n-9} + C18:2 \text{ n-6} + C20:4 \text{ n-6} + C18:3 \text{ n-3} + C20:5 \text{ n-3} + C22:5 \text{ n-3} + C22:6 \text{ n-3}) / (C14:0 + C16:0). \quad (4)$$

More recently, Chen et al. [175] developed the health-promoting index (HPI), which is the inverse of the AI:

$$HPI = (\sum MUFA + \sum PUFA) / (C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0). \quad (5)$$

The activity of $\Delta 9$ -desaturase is essential in the process of UFA synthesis. This enzyme catalyzes the introduction of a *cis*-double bond between carbons 9 and 10 of SFAs with a chain length of 10 to 18 carbons. During this process, specific medium- and long-chain SFAs are converted into the corresponding MUFAs [10]. Although the enzyme can catalyze the conversion of C10 to C18 SFAs, its effect on these FAs is not equal, mainly favoring the conversions of C16:0 into C16:1 *c9* and C18:0 into C18:1 *c9* [98,176]. That is why those FAs are included in the calculation of desaturation indices (DI) that are defined as ratios of the FAs dependent on the activity of this enzyme (*c9* unsaturated FAs) and can be calculated on the basis of product/substrate [177]; substrate/product [178], or product/(substrate + product) [10] as in the following formulas:

$$DI = C14:1 \text{ c9} / (C14:0 + C14:1 \text{ c9}), \quad (6)$$

$$DI = C16:1 \text{ c9} / (C16:0 + C16:1 \text{ c9}), \quad (7)$$

$$DI = C18:1 \text{ c9} / (C18:0 + C18:1 \text{ c9}), \quad (8)$$

$$DI = C18:2 \text{ c9,t11} / (C18:1 \text{ t11} + C18:2 \text{ c9,t11}). \quad (9)$$

Although it is possible to calculate DI in different ways, it should be noted that the C14:1 *c9* / (C14:0 + C14:1 *c9*) ratio has been suggested as the best indicator for $\Delta 9$ -desaturase activity [177] because C14:0 in milk fat is almost exclusively derived from de novo synthesis in the mammary gland and thus almost all C14:1 *c9* is likely to be the product of $\Delta 9$ -desaturase activity [14]. Furthermore, a general desaturation index that includes all variables from the above mentioned formulas has been suggested [179]:

$$DI = 100 \times [(C14:1 \ c9 + C16:1 \ c9 + C18:1 \ c9 + C18:2 \ c9, \ t11) / (C14:1 \ c9 + C16:1 \ c9 + C18:1 \ c9 + C18:2 \ c9, \ t11 + C14:0 + C16:0 + C18:0 + C18:1 \ t11)]. \quad (10)$$

All the abovementioned indices together with PUFA/SFA and n-6/n-3 PUFA ratios are widely used to evaluate the nutritional value of milk fat. It is supposed that milk fat with high AI and TI values may be more likely to contribute to the development of atherosclerosis or coronary thrombosis in humans; whereas, milk with high HPI and HH ratios may have a protective effect against cardiovascular diseases [31]. Although a higher proportion of PUFA in milk fat is desirable from the perspective of human health, these can influence the technological properties of milk fat either positively (improved spreadability) or negatively (increased susceptibility to oxidation). Thus, further indices have been subsequently proposed such as the peroxidisability index (PI, [180], that represents the degree of unsaturation of dietary lipids [181] and is used as an indicator of PUFA peroxidation [182]) and the spreadability index (SI, [183], for evaluating the ratio of C16:0 and C18:1 c9, which has been shown to be the most accurate indicator of butter hardness [184]). The oxidative stability of milk fat can also be characterized as SFA/UFA ratio.

$$PI = 0.025 \times \text{Mono} + \text{Di} + 2 \times \text{Tri} + 4 \times \text{Tetra} + 6 \times \text{Penta} + 8 \times \text{Hexa} \quad (11)$$

where: Mono, Di, Tri, Tetra, Penta and Hexa represent the weight percentages of monoenoic, dienoic, trienoic, tetraenoic, pentaenoic and hexaenoic FAs, respectively.

$$SI = C18:1 \ c9 / C16:0 \quad (12)$$

(in some studies, e.g., [21], the inverse formula is used for calculation of SI)

As presented in Table 1, AI is influenced by the type of feed. Of the different types of forage, the lowest AI value was found for pasture-based feeding systems followed by legume silage feeding. The highest values were, on the other hand, found in corn-silage feeding systems. In the case of oilseeds, improvement in AI was noted after feeding either mixes of oilseeds or rapeseed products.

As expected, DI was influenced by the type of forage because of greater differences in the concentration of C18:0 and C18:1 c9 [46]. The effect of oilseeds on DI was marginal [27,32,33].

Of the possible forages, the best SI of milk fat was found after feeding corn and grass silages, while the highest value was calculated for pasture-based feeding systems. For oilseeds, an increased SI value and thus softer butter fat was produced after feeding rapeseed products, which has also been documented by e.g., [175].

6. Relationships among FA Profiles and Other Indicators in Cows

Biological variability in milk metabolic indicators (such as FAs, etc.) can also be explained, in part, by the relationships among physiological, technological, and health milk indicators. Relationships between FAs and their groups and selected milk indicators (bulk milk samples) were studied in Czech Fleckvieh and Holstein cows [185]. The only significant relationship of SFAs was to lactose content ($r = 0.29$; $p < 0.05$). All relationships of MUFAs to milk indicators were insignificant ($p > 0.05$). Relationships between PUFAs and milk indicators were narrower: fat (0.32 ; $p < 0.05$); lactose (0.46 ; $p < 0.01$); milk alcohol stability (0.45 ; $p < 0.01$); titration acidity (0.34 ; $p < 0.01$); cheese curd quality (0.43 ; $p < 0.01$); milk fermentationability (0.53 ; $p < 0.001$); streptococci count in yoghurt (0.32 ; $p < 0.05$); and total count of noble bacteria in yoghurt (0.31 ; $p < 0.05$). Relationships of CLA to selected milk indicators were as follows: fat (0.38 ; $p < 0.01$); lactose (-0.54 ; $p < 0.001$); alcohol stability (0.27 ; $p < 0.05$); and cheese curd quality (0.41 ; $p < 0.01$). Thus, higher CLA levels were associated with higher fat and lower lactose content, as well as lower alcohol stability.

Correlation coefficients (>0.3) for the summarized values of lactation, which were calculated in regular milk recording were observed [13] at MUFA with short chain: 0.47 to days in milk, 0.31 to milk yield (kg), 0.35 to fat, and 0.34 to protein total production (both in kg). The most important FAs (in individual milk samples), such as C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, and C18:1 c9, were not significantly related to either lactation sum or daily production parameters, or to the content of basic components of milk with the exception of C16:0 ($30.93 \pm 4.81\%$ in milk fat), which has a negative relationship to

daily milk (−0.4) and protein production (−0.35). This FA has also been positively associated with fat content (0.44) and negatively associated with lactose content (−0.31). CLA was negatively correlated with daily fat production (−0.41), fat content (−0.27), and fat/protein index (−0.42). In order to better understand and interpret milk FA profiles, knowledge of the relationships between major FAs and their groups and other milk indicators is also important.

In addition to the above mentioned milk indicators, there are also documented associations between the milk FA profile and metabolic disorders such as ketosis or between the milk FA profile and reproduction performance [81,136]. Moreover, interesting associations have been recently described among FAs synthesized in the rumen, methane production, and milk FA content [129,137]. It is evident that the possibility for methane output prediction based on milk FA content should be intensely studied to improve the environmental sustainability and economic profitability of dairy production.

Last but not least, dairy cow nutrition substantially influences the profiles of other body tissues, especially body liquids, in addition to the milk FA profile. Accordingly, an analysis of the percentage (by weight) of FAs in different body tissues [186] was done. Findings revealed that stage of lactation had a significant impact on the content of many FAs in all examined tissues. Parity had no effect on FA composition of blood; whereas, it significantly affected C16:1 *c*9 in the liver as well as C16:1 *c*9 and C18:0 in adipose tissue. Energy-protein supplementation significantly affected the content of most FAs in blood (e.g., C18:1 *t*11 and C18:3 *n*-3) and liver (C18:3 *n*-3, CLA, and PUFA *n*-3 derived from fish oil), but it did not affect the profile of adipose tissue in cows. Therefore, it is necessary to consider these effects when developing methods to control the production of animal raw materials for the food industry.

7. Milk FA Profile and Human Health

Milk and dairy products play an important role in human nutrition because they provide not only essential nutrients such as high-quality proteins, fat, lactose and minerals, but also various physiologically active compounds such as vitamins, bioactive peptides, and antioxidants [187–189].

Milk and some dairy products (butter) have been criticized for the unfavorable FA profile in milk fat. Indeed, bovine milk fat contains on average about 70% SFA, 25% MUFA, and 5% PUFA [42]; whereas, the ideal FA profile, from a human health perspective, should be 8% SFA, 82% MUFA and 10% PUFA [190].

The SFAs that play the greatest role in a negative view of milk fat (i.e., C12:0, C14:0, and C16:0), have often been associated with having adverse effects on indicators of cardiovascular risk (e.g., low-density lipoprotein cholesterol level in serum [191]). This is because the consumption of excessive amounts of SFA has been associated with increased risk of cardiovascular disease [192]; however, extensive modern research on the effects of FAs on human health indicates that only a few individual FAs are responsible for the negative health consequences [193]. Thus, the perspective on SFA has only recently changed from a focus on the effects of SFA as a single group to the effects of individual SFAs as well as other FAs present in milk. Continued study and discussion of their specific biological functions and roles in metabolism (see Table 7), along with their interactions is needed.

Table 7. Effects of selected fatty acids (FAs) on human health.

| FA | Role | References |
|---|--|---------------------|
| C4:0 | <ul style="list-style-type: none"> - beneficial effect on the intestinal flora and human gastrointestinal wall primarily by acting as a direct source of energy for colonocytes - one of the factors preventing progression of colorectal cancer and mammary cancer - inhibition of cell growth, promotion of differentiation, and induction of apoptosis in various human cancer cell lines - may prevent the invasion of tumors via inhibitory effects on urokinase - seems to exert broad anti-inflammatory activity by affecting immune cell migration, adhesion, and cytokine expression, as well as affecting cellular processes such as proliferation, activation, and apoptosis | [2,3,194–197] |
| C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 | <ul style="list-style-type: none"> - C14:0 and C16:0—increase total blood cholesterol level and increase the risk of cardiovascular diseases - C18:0 and C14:0—increase thrombogenicity and cholesterol level - C12:0, C14:0, and C16:0, are related to an increased risk of atherosclerosis, hyperlipidemia, and low-density lipoprotein cholesterol, obesity and coronary heart disease | [23,60,173,188,198] |
| BCFA | <ul style="list-style-type: none"> - BCFA—anti-cancer activity - BCFA—reduced risk of necrotizing enterocolitis in newborns - BCFA—improvement of β-cell function - iso C15:0—anti-cancer properties - induced cell death through apoptosis (in vitro) - iso C15:0—inhibition of tumor growth in mice (in vivo) - iso C15:0—induction of inhibitory effects on T-cell lymphomas in vitro and in vivo in mice | [199–203] |
| OCFA | <ul style="list-style-type: none"> - decreased risk of coronary heart disease - decreased risk of type 2 diabetes | [204,205] |
| TFA | <ul style="list-style-type: none"> - not confirmed positive relationship between coronary heart disease and TFA of ruminant origin - C18:1 <i>n</i>-7— a potential negative effect, tendency to increase serum triglycerides (animal models) - C18:1 <i>n</i>-7—improvement of lipid biomarkers | [206–211] |
| <i>c</i> 9, <i>t</i> 11 CLA, <i>t</i> 10, <i>c</i> 12 CLA | <ul style="list-style-type: none"> - reduced tumor growth - decreased risk of coronary heart disease | [189,190,212–216] |
| C16:1 | <ul style="list-style-type: none"> - considered to be a lipokine released from adipose tissue that acts on distant organs - mixed cardiovascular effects, direct or inverse correlations with obesity, hepatosteatosis, and a significant amelioration or prevention of insulin resistance and diabetes | [217] |
| C18:1 <i>c</i> 9 C18:3 <i>n</i> -3 | <ul style="list-style-type: none"> - anti-cancer and anti-atherogenic properties - positive effect on cholesterol level | [114,188,218–220] |

| | | |
|------------|--|----------------|
| | - improvement of immune response (anti-inflammatory effect) | |
| C18:2 n-6 | - improves sensitivity to insulin and thus reduces the incidence of type 2 diabetes | [198] |
| CLnA | - inhibitory effect on cancer cell proliferation and growth of human tumor cells (in vitro) - modification of lipid metabolism (with decreases in adipose tissue mass) in rodent models (in vivo) | [221,222] |
| C18:1 n-11 | - beneficial modifying effect on the fluidity and permeability of cell membranes, regulates their metabolism, and may have anti-cancer properties | [223] |
| AA | - neutralization of C12:0, C14:0 and C16:0 by increasing high-density lipoprotein cholesterol level | [6,76,224,225] |
| EPA | - anti-cancer, anti-hypertensive, and anti-inflammatory properties | |
| DHA | - positive effect on brain cells, which is important during remission of Alzheimer's disease - anti-cancer, anti-hypertensive, and anti-inflammatory properties | [225,226] |

BCFA—branched-chain FAs; OCFA—odd-chain FAs; CLA—conjugated linoleic acid; *c*—*cis*; *t*—*trans*; C18:3 n-3— α -linolenic acid; C18:1 *c*9—oleic acid; C18:2 n-6—linoleic acid; CLnA—conjugated linolenic acids, mainly *c*9, *t*11, *c*15, and *c*9, *t*13; *c*15; C18:1 *t*11—vaccenic acid; AA—arachidonic acid; EPA—eicosapentaenoic acid; DHA—docosahexaenoic acid.

8. Conclusions

At present, there is strong research interest in the nutritional quality and health benefits of food, which is supported by public awareness and an on-going desire to improve our quality of life. Consequently, targeted modification of the FA profile of milk fat is desirable. Developments in analytical methods have played an important role in increasing the efficiency and feasibility of studies on the sources of FA variability. In recent decades, many studies have been devoted to improving milk FA composition by increasing the amount of FA with beneficial effects on human health and appropriate technological properties. Accordingly, knowledge of the important factors affecting milk FA composition and their relationships, including physiological aspects such as rumen fermentation, fat synthesis in mammary gland tissue, and energy status of animals, is essential from both a research and practical point of view. This review has therefore focused on the main sources of FA variability. Breed, animal genetics, metabolic and lactational effects, management, and other factors were mentioned; nevertheless, feeding strategy is undoubtedly considered to be the most efficient way to modify milk FA composition. Some factors are well known—e.g., role of diet and stage of lactation—while others, such as polymorphism, are only beginning to be understood. The possibility of using milk FA profiles as indicators to predict animal health or even methane production levels is currently under active investigation. Further research on sources of FA variability is important for finding effective ways of improving the health benefits and technological quality of milk products through modifications in the FA profile. This will most likely be achieved by targeted changes to feeding and breeding strategies.

Author Contributions: O.H. created the following parts: abstract, Sections 1, 2, 3.2, 4.4, 6, and 8; E.S. created the following parts: Sections 4, 4.1, 4.2, 4.3, and 8; L.K. created the following parts: Sections 3.1, 5, and 7; L.H. created the following parts: Sections 3.3, 6, and 8; R.K. created the following parts: Sections 4.1, 4.2, and 4.3. All authors approved the final manuscript.

Funding: This research was funded by Ministry of Agriculture of the Czech Republic—NAZV KUS QJ1510336 and RO 1418, Grant Agency of the University of South Bohemia—GAJU-002/2016/Z and the Ministry of Education Youth and Sports—MSM 6215712402

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

| | |
|--------|--|
| ALA | alpha linoleic acid |
| BCS | body condition score |
| CLA | conjugated linoleic acid |
| CS | conventional system |
| EPA | eicosapentaenoic acid |
| FA | fatty acid |
| GC | gas chromatography |
| LA | linoleic acid |
| MIR-FT | infrared spectroscopy in mid-range with Fourier transformation |
| MUFA | monounsaturated fatty acids |
| NEB | negative energy balance |
| NEFA | non-esterified fatty acids |
| OS | organic system |
| PUFA | polyunsaturated fatty acids |
| RA | rumenic acid (C18:2 <i>c</i> 9, <i>t</i> 11) |
| SFA | saturated fatty acids |
| TFA | <i>trans</i> isomers of polyunsaturated fatty acids |
| UFA | unsaturated fatty acids |
| VA | vaccenic acid (C18:1 <i>t</i> 11) |

References

1. Nicolosi, R.J.; Rogers, E.J.; Kritchevsky, D.; Scimeca, J.A.; Huth, P.J. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* **1997**, *22*, 266–277.
2. Parodi, P.W. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 1055–1060.
3. Parodi, P.W. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* **1999**, *82*, 1339–1349.
4. Dhiman, T.R.; Nam, S.H.; Ure, A.L. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 463–482.
5. German, J.B.; Gibson, R.A.; Krauss, R.M.; Nestel, P.; Lamarche, B.; van Staveren, W.A.; Steijns, J.M.; de Groot, L.; Lock, A.L.; Destailats, F. A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *Eur. J. Nutr.* **2009**, *48*, 191–203.
6. Parodi, P.W. Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized? *Int. Dairy J.* **2009**, *19*, 345–361.
7. Chung, I.-M.; Kim, J.-K.; Lee, K.-J.; Son, N.-Y.; An, M.-J.; Lee, J.-H.; An, Y.-J.; Kim, S.-H. Discrimination of organic milk by stable isotope ratio, vitamin E, and fatty acid profiling combined with multivariate analysis: A case study of monthly and seasonal variation in Korea for 2016–2017. *Food Chem.* **2018**, *261*, 112–123.
8. Palmquist, D.L.; Beaulieu, A.D.; Barbano, D.M. Feed and animal factors influencing milk-fat composition. *J. Dairy Sci.* **1993**, *76*, 1753–1771.
9. Jensen, R.G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* **2002**, *85*, 295–350.
10. Kelsey, J.A.; Corl, B.A.; Collier, R.J.; Bauman, D.E. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 2588–2597.
11. Pešek, M.; Samková, E.; Špička, J. Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. *Czech J. Anim. Sci.* **2006**, *51*, 181–188.
12. Coppa, M.; Ferlay, A.; Chassaing, C.; Agabriel, C.; Glasser, F.; Chilliard, Y.; Borreani, G.; Barcarolo, R.; Baars, T.; Kusche, D.; et al. Prediction of bulk milk fatty acid composition based on farming practices collected through on-farm surveys. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 4197–4211.
13. Foltys, V.; Kirchnerová, K. Impact of lactation stage and milk production on milk fat fatty acids ratio. *Slovak J. Anim. Sci.* **2017**, *45*, 30–35.
14. Soyeurt, H.; Dehareng, F.; Mayeres, P.; Bertozzi, C.; Gengler, N. Variation of delta (9)-desaturase activity in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 3211–3224.
15. Bittante, G.; Cecchinato, A.; Schiavon, S. Dairy system, parity, and lactation stage affect enteric methane production, yield, and intensity per kilogram of milk and cheese predicted from gas chromatography fatty acids. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 1752–1766.
16. Kala, R.; Samková, E.; Koubová, J.; Hasoňová, L.; Kváč, M.; Pelikánová, T.; Špička, J.; Hanuš, O. Nutritionally desirable fatty acids including CLA of cow's milk fat explained by animal and feed factors. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.* **2018**, *66*, 69–76.
17. Samková, E.; Koubová, J.; Hasoňová, L.; Hanuš, O.; Kala, R.; Kváč, M.; Pelikánová, T.; Špička, J. Joint effects of breed, parity, month of lactation, and cow individuality on the milk fatty acids composition. *Mljekarstvo* **2018**, *68*, 98–107.
18. Samková, E.; Špička, J.; Pešek, M.; Pelikánová, T.; Hanuš, O. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **2012**, *42*, 83–100.
19. Kalač, P.; Samková, E. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech J. Anim. Sci.* **2010**, *55*, 521–537.
20. Shingfield, K.J.; Reynolds, C.K.; Lupoli, B.; Toivonen, V.; Yurawecz, M.P.; Delmonte, P.; Griinari, J.M.; Grandison, A.S.; Beever, D.E. Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. *Anim. Sci.* **2005**, *80*, 225–238.
21. Couvreur, S.; Hurtaud, C.; Lopez, C.; Delaby, L.; Peyraud, J.L. The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 1956–1969.
22. Kudrna, V.; Marounek, M. The influence of feeding rapeseed cake and extruded soyabean on the performance of lactating cows and the fatty acid pattern of milk. *J. Anim. Feed Sci.* **2006**, *15*, 361–369.

23. Bobe, G.; Zimmerman, S.; Hammond, E.G.; Freeman, A.E.; Porter, P.A.; Luhman, C.M.; Beitz, D.C. Butter composition and texture from cows with different milk fatty acid compositions fed fish oil or roasted soybeans. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 2596–2603.
24. Cabrita, A.R.J.; Bessa, R.J.B.; Alves, S.P.; Dewhurst, R.J.; Fonseca, A.J.M. Effects of dietary protein and starch on intake, milk production, and milk fatty acid profiles of dairy cows fed corn silage-based diets. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 1429–1439.
25. Frelich, J.; Šlachta, M.; Hanuš, O.; Špička, J.; Samková, E. Fatty acid composition of cow milk fat produced on low-input mountain farms. *Czech J. Anim. Sci.* **2009**, *54*, 532–539.
26. Frelich, J.; Šlachta, M.; Hanuš, O.; Špička, J.; Samková, E.; Weglarz, A.; Zapletal, P. Seasonal variation in fatty acid composition of cow milk in relation to the feeding system. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2012**, *30*, 219–229.
27. Veselý, A.; Křížová, L.; Třináctý, J.; Hadrová, S.; Navrátilová, M.; Herzig, I.; Fišera, M. Changes in fatty acid profile and iodine content in milk as influenced by the inclusion of extruded rapeseed cake in the diet of dairy cows. *Czech J. Anim. Sci.* **2009**, *54*, 201–209.
28. Adler, S.A.; Jensen, S.K.; Govasmark, E.; Steinshamn, H. Effect of short-term versus long-term grassland management and seasonal variation in organic and conventional dairy farming on the composition of bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 5793–5810.
29. Samková, E.; Čertíková, J.; Špička, J.; Hanuš, O.; Pelikánová, T.; Kváč, M. Eighteen-carbon fatty acids in milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows following feeding with fresh lucerne (*Medicago sativa* L.). *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2014**, *32*, 209–218.
30. Hanuš, O.; Křížová, L.; Samková, E.; Špička, J.; Kučera, J.; Klimešová, M.; Roubal, P.; Jedelská, R. The effect of cattle breed, season and type of diet on the fatty acid profile of raw milk. *Arch. Anim. Breed.* **2016**, *59*, 373–380.
31. Rafiee-Yarandi, H.; Ghorbani, G.R.; Alikhani, M.; Sadeghi-Sefidmazgi, A.; Drackley, J.K. A comparison of the effect of soybeans roasted at different temperatures versus calcium salts of fatty acids on performance and milk fatty acid composition of mid-lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 5422–5435.
32. Křížová, L.; Hanuš, O.; Špička, J.; Samková, E.; Frelich, J.; Richter, M.; Veselý, A.; Roubal, P. Alternative supplemental mixture for organic dairy herds to maintain desirable milk fatty acid profile throughout the indoor feeding period. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2016**, *34*, 25–39.
33. Křížová, L.; Ryšavý, J.; Richter, M.; Veselý, A.; Hanuš, O.; Janštová, B.; Vorlová, L.; Samková, E. Milk yield, milk composition, fatty acid profile and indices of milk fat quality as affected by feeding with extruded full-fat soybean. *Mljekarstvo* **2017**, *67*, 49–57.
34. Soyeurt, H.; Dardenne, P.; Dehareng, F.; Lognay, G.; Veselko, D.; Marlier, M.; Bertozzi, C.; Mayeres, P.; Gengler, N. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 3690–3695.
35. Soyeurt, H.; Dehareng, F.; Gengler, N.; McParland, S.; Wall, E.; Berry, D.P.; Coffey, M.; Dardenne, P. Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple breeds, production systems, and countries. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 1657–1667.
36. Coppa, M.; Ferlay, A.; Leroux, C.; Jestin, M.; Chilliard, Y.; Martin, B.; Andueza, D. Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy. *Int. Dairy J.* **2010**, *20*, 182–189.
37. Ferrand-Calmels, M.; Palhiere, I.; Brochard, M.; Leray, O.; Astruc, J.M.; Aurel, M.R.; Barbey, S.; Bouvier, F.; Brunshwig, P.; Caillat, H.; et al. Prediction of fatty acid profiles in cow, ewe, and goat milk by mid-infrared spectrometry. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 17–35.
38. Hanuš, O.; Samková, E.; Špička, J.; Hasoňová, L.; Kala, R.; Klímová, Z.; Kopunecz, P.; Kopecký, J. Comparison of methods used for the determination of the healthy important fatty acids of milk fat in bulk milk samples of dairy cows. *Mlék. Listy Zprav.* **2015**, *26*, 12–15. (In Czech)
39. Bernard, L.; Bonnet, M.; Delavaud, C.; Delosiere, M.; Ferlay, A.; Fougere, H.; Graulet, B. Milk fat globule in ruminant: Major and minor compounds, nutritional regulation and differences among species. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2018**, *120*, doi:10.1002/ejlt.201700039.
40. Tajima, K.; Aminov, R.I.; Nagamine, T.; Matsui, H.; Nakamura, M.; Benno, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environ. Microb.* **2001**, *67*, 2766–2774.
41. Conte, G.; Dimauro, C.; Serra, A.; Macciotta, N.P.P.; Mele, M. A canonical discriminant analysis to study the association between milk fatty acids of ruminal origin and milk fat depression in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 6497–6510.

42. Shingfield, K.J.; Chilliard, Y.; Toivonen, V.; Kairenius, P.; Givens, D.I. *Trans* fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *606*, 3–65.
43. Patra, A.K.; Yu, Z.T. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Appl. Environ. Microb.* **2012**, *78*, 4271–4280.
44. Vlaeminck, B.; Fievez, V.; Demeyer, D.; Dewhurst, R.J. Effect of forage:concentrate ratio on fatty acid composition of rumen bacteria isolated from ruminal and duodenal digesta. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 2668–2678.
45. De Menezes, A.B.; Lewis, E.; O'Donovan, M.; O'Neill, B.F.; Clipson, N.; Doyle, E.M. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *78*, 256–265.
46. Samková, E. Factors Affecting Fatty Acid Composition of Cow's Milk Fat. Doctoral Thesis, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture, České Budějovice, Czech Republic, 2011; p. 60. (In Czech)
47. Dewhurst, R.J.; Scollan, N.D.; Lee, M.R.F.; Ougham, H.J.; Humphreys, M.O. Forage breeding and management to increase the beneficial fatty acid content of ruminant products. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, *62*, 329–336.
48. Vanhatalo, A.; Kuoppala, K.; Toivonen, V.; Shingfield, K.J. Effects of forage species and stage of maturity on bovine milk fatty acid composition. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109*, 856–867.
49. Leiber, F.; Kreuzer, M.; Nigg, D.; Wettstein, H.R.; Scheeder, M.R.L. A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows' milk of alpine origin. *Lipids* **2005**, *40*, 191–202.
50. Rego, O.A.; Rosa, H.J.D.; Regalo, S.M.; Alves, S.P.; Alfaia, C.M.M.; Prates, J.A.M.; Vouzela, C.M.; Bessa, R.J.B. Seasonal changes of CLA isomers and other fatty acids of milk fat from grazing dairy herds in the Azores. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 1855–1859.
51. Hurtaud, C.; Faucon, F.; Couvreur, S.; Peyraud, J.L. Linear relationship between increasing amounts of extruded linseed in dairy cow diet and milk fatty acid composition and butter properties. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 1429–1443.
52. Glasser, F.; Ferlay, A.; Chilliard, Y. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 4687–4703.
53. Shingfield, K.J.; Bonnet, M.; Scollan, N.D. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal* **2013**, *7*, 132–162.
54. Siurana, A.; Calsamiglia, S. A metaanalysis of feeding strategies to increase the content of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy cattle milk and the impact on daily human consumption. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2016**, *217*, 13–26.
55. Rutkowska, J.; Bialek, M.; Bagnicka, E.; Jarczak, J.; Tambor, K.; Strzalkowska, N.; Jozwik, A.; Krzyzewski, J.; Adamska, A.; Rutkowska, E. Effects of replacing extracted soybean meal with rapeseed cake in corn grass silage-based diet for dairy cows. *J. Dairy Res.* **2015**, *82*, 161–168.
56. Lopes, J.C.; Harper, M.T.; Giallongo, F.; Oh, J.; Smith, L.; Ortega-Perez, A.M.; Harper, S.A.; Melgar, A.; Kniffen, D.M.; Fabin, R.A.; et al. Effect of high-oleic-acid soybeans on production performance, milk fatty acid composition, and enteric methane emission in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 1122–1135.
57. Stergiadis, S.; Leifert, C.; Seal, C.J.; Eyre, M.D.; Steinshamn, H.; Butler, G. Improving the fatty acid profile of winter milk from housed cows with contrasting feeding regimes by oilseed supplementation. *Food Chem.* **2014**, *164*, 293–300.
58. Hristov, A.N.; Domitrovich, C.; Wachter, A.; Cassidy, T.; Lee, C.; Shingfield, K.J.; Kairenius, P.; Davis, J.; Brown, J. Effect of replacing solvent-extracted canola meal with high-oil traditional canola, high-oleic acid canola, or high-erucic acid rapeseed meals on rumen fermentation, digestibility, milk production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 4057–4074.
59. Komprda, T. Comparison of quality and safety of organic and conventional foods. *Chem. Listy* **2009**, *103*, 729–732.
60. Srednicka-Tober, D.; Baranski, M.; Seal, C.J.; Sanderson, R.; Benbrook, C.; Steinshamn, H.; Gromadzka-Ostrowska, J.; Rembialkowska, E.; Skwarlo-Sonta, K.; Eyre, M.; et al. Higher PUFA and n-3 PUFA, conjugated linoleic acid, alpha-tocopherol and iron, but lower iodine and selenium concentrations in organic milk: A systematic literature review and meta- and redundancy analyses. *Br. J. Nutr.* **2016**, *115*, 1043–1060.
61. Dangour, A.D.; Dodhia, S.K.; Hayter, A.; Allen, E.; Lock, K.; Uauy, R. Nutritional quality of organic foods: A systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *90*, 680–685.

62. Ellis, K.A.; Innocent, G.; Grove-White, D.; Cripps, P.; McLean, W.G.; Howard, C.V.; Mihm, M. Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 1938–1950.
63. Lavrenčić, A.; Levart, A.; Salobir, J. Fatty acid composition of milk produced in organic and conventional dairy herds in Italy and Slovenia. *Ital. J. Anim. Sci.* **2007**, *6*, 437–439.
64. O'Donnell, A.M.; Spatny, K.P.; Vicini, J.L.; Bauman, D.E. Survey of the fatty acid composition of retail milk differing in label claims based on production management practices. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 1918–1925.
65. Butler, G.; Nielsen, J.H.; Slots, T.; Seal, C.; Eyre, M.D.; Sanderson, R.; Leifert, C. Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and low-input conventional and organic systems: Seasonal variation. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 1431–1441.
66. Slots, T.; Butler, G.; Leifert, C.; Kristensen, T.; Skibsted, L.H.; Nielsen, J.H. Potentials to differentiate milk composition by different feeding strategies. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 2057–2066.
67. Larsen, M.K.; Nielsen, J.H.; Butler, G.; Leifert, C.; Slots, T.; Kristiansen, G.H.; Gustafsson, A.H. Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 2863–2873.
68. Palladino, R.A.; O'Donovan, M.; Murphy, J.J.; McEvoy, M.; Callan, J.; Boland, T.M.; Kenny, D.A. Fatty acid intake and milk fatty acid composition of Holstein dairy cows under different grazing strategies: Herbage mass and daily herbage allowance. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 5212–5223.
69. Ferlay, A.; Martin, B.; Pradel, P.; Coulon, J.B.; Chilliard, Y. Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentaise and Montbeliarde cow breeds. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 4026–4041.
70. Schwendel, B.H.; Wester, T.J.; Morel, P.C.H.; Tavendale, M.H.; Deadman, C.; Shadbolt, N.M.; Otter, D.E. Invited review: Organic and conventionally produced milk—An evaluation of influence factors on milk composition. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 2831–2831.
71. Palupi, E.; Jayanegara, A.; Ploeger, A.; Kahl, J. Comparison of nutritional quality between conventional and organic dairy products: A meta-analysis. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 2774–2781.
72. Schroeder, G.F.; Delahoy, J.E.; Vidaurreta, I.; Bargo, F.; Gagliostro, G.A.; Muller, L.D. Milk fatty acid composition of cows fed a total mixed ration or pasture plus concentrates replacing corn with fat. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 3237–3248.
73. Dewhurst, R.J.; Shingfield, K.J.; Lee, M.R.F.; Scollan, N.D. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2006**, *131*, 168–206.
74. Barca, J.; Carriquiry, M.; Olazabal, L.; Fajardo, M.; Chilibroste, P.; Meikle, A. Milk fatty acid profile from cows fed with mixed rations and different access time to pastureland during early lactation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2018**, *102*, 620–629.
75. Chilliard, Y.; Ferlay, A.; Mansbridge, R.M.; Doreau, M. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.* **2000**, *49*, 181–205.
76. Butler, G.; Stergiadis, S.; Seal, C.; Eyre, M.; Leifert, C. Fat composition of organic and conventional retail milk in northeast England. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 24–36.
77. Collomb, M.; Bisig, W.; Butikofer, U.; Sieber, R.; Bregy, M.; Etter, L. Fatty acid composition of mountain milk from Switzerland: Comparison of organic and integrated farming systems. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 976–982.
78. Kay, J.K.; Weber, W.J.; Moore, C.E.; Bauman, D.E.; Hansen, L.B.; Chester-Jones, H.; Crooker, B.A.; Baumgard, L.H. Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 3886–3893.
79. Mulligan, F.T.; O'Grady, L.; Rice, D.A.; Doherty, M.L. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Anim. Reprod. Sci.* **2006**, *96*, 331–353.
80. Stoop, W.M.; Bovenhuis, H.; Heck, J.M.L.; van Arendonk, J.A.M. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 1469–1478.
81. Gross, J.; van Dorland, H.A.; Bruckmaier, R.M.; Schwarz, F.J. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *J. Dairy Res.* **2011**, *78*, 479–488.
82. Arfuso, F.; Fazio, F.; Levanti, M.; Rizzo, M.; Di Pietro, S.; Giudice, E.; Piccione, G. Lipid and lipoprotein profile changes in dairy cows in response to late pregnancy and the early postpartum period. *Arch. Anim. Breed.* **2016**, *59*, 429–434.
83. Walsh, S.W.; Williams, E.J.; Evans, A.C.O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* **2011**, *123*, 127–138.

84. Lake, S.L.; Weston, T.R.; Scholljegerdes, E.J.; Murrieta, C.M.; Alexander, B.M.; Rule, D.C.; Moss, G.E.; Hess, B.W. Effects of postpartum dietary fat and body condition score at parturition on plasma, adipose tissue, and milk fatty acid composition of lactating beef cows. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 717–730.
85. Roche, J.R.; Friggens, N.C.; Kay, J.K.; Fisher, M.W.; Stafford, K.J.; Berry, D.P. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 5769–5801.
86. Useni, B.A.; Muller, C.J.C.; Cruywagen, C.W. Pre- and postpartum effects of starch and fat in dairy cows: A review. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **2018**, *48*, 413–426.
87. Van Kneegsel, A.T.M.; van den Branda, H.; Dijkstra, J.; Tamminga, S.; Kemp, B. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* **2005**, *45*, 665–688.
88. Thatcher, W.; Santos, J.E.P.; Staples, C.R. Dietary manipulations to improve embryonic survival in cattle. *Theriogenology* **2011**, *76*, 1619–1631.
89. Jorritsma, R.; Wensing, T.; Kruip, T.A.M.; Vos, P.L.A.M.; Noordhuizen, J.P.T.M. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet. Res.* **2003**, *34*, 11–26.
90. Grummer, R.R.; Mashek, D.G.; Hayirli, A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. N. Am.-Food Anim. Pract.* **2004**, *20*, 447–470.
91. Van Straten, M.; Shpigel, N.Y.; Friger, M. Analysis of daily body weight of high-producing dairy cows in the first one hundred twenty days of lactation and associations with ovarian inactivity. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 3353–3362.
92. Wathes, D.C.; Abayasekara, D.R.E.; Aitken, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol. Reprod.* **2007**, *77*, 190–201.
93. Drackley, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J. Dairy Sci.* **1999**, *82*, 2259–2273.
94. Vernon, R.G. Lipid metabolism during lactation: A review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J. Dairy Res.* **2005**, *72*, 460–469.
95. Schulz, K.; Frahm, J.; Meyer, U.; Kersten, S.; Reiche, D.; Rehage, J.; Danicke, S. Effects of prepartal body condition score and peripartal energy supply of dairy cows on postpartal lipolysis, energy balance and ketogenesis: An animal model to investigate subclinical ketosis. *J. Dairy Res.* **2014**, *81*, 257–266.
96. Fiore, E.; Piccione, G.; Giancesella, M.; Pratico, V.; Vazzana, I.; Dara, S.; Morgante, M. Serum thyroid hormone evaluation during transition periods in dairy cows. *Arch. Anim. Breed.* **2015**, *58*, 403–406.
97. Vranković, L.; Aladrović, J.; Octenjak, D.; Bijelić, D.; Cvetnić, L.; Stojević, Z. Milk fatty acid composition as an indicator of energy status in Holstein dairy cows. *Arch. Anim. Breed.* **2017**, *60*, 205–212.
98. Bauman, D.E.; Mather, I.H.; Wall, R.J.; Lock, A.L. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 1235–1243.
99. Stádník, L.; Ducháček, J.; Okrouhlá, M.; Ptáček, M.; Beran, J.; Stupka, R.; Zita, L. The effect of parity on the proportion of important healthy fatty acids in raw milk of Holstein cows. *Mljekarstvo* **2013**, *63*, 195–202.
100. Garnsworthy, P.C.; Masson, L.L.; Lock, A.L.; Mottram, T.T. Variation of milk citrate with stage of lactation and de novo fatty acid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 1604–1612.
101. Mele, M.; Dal Zotto, R.; Cassandro, M.; Conte, G.; Serra, A.; Buccioni, A.; Bittante, G.; Secchiari, P. Genetic parameters for conjugated linoleic acid, selected milk fatty acids, and milk fatty acid unsaturation of Italian Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 392–400.
102. Wang, T.; Oh, J.J.; Lim, J.N.; Hong, J.E.; Kim, J.H.; Kim, J.H.; Kang, H.S.; Choi, Y.J.; Lee, H.G. Effects of lactation stage and individual performance on milk *cis-9*, *trans-11* conjugated linoleic acids content in dairy cows. *Asian Australas. J. Anim.* **2013**, *26*, 189–194.
103. Gottardo, P.; Penasa, M.; Righi, F.; Lopez-Villalobos, N.; Cassandro, M.; De Marchi, M. Fatty acid composition of milk from Holstein-Friesian, Brown Swiss, Simmental and Alpine Grey cows predicted by mid-infrared spectroscopy. *Ital. J. Anim. Sci.* **2017**, *16*, 380–389.
104. Rukkamsuk, T.; Geelen, M.J.H.; Kruip, T.A.M.; Wensing, T. Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum. *J. Dairy Sci.* **2000**, *83*, 52–59.
105. Tyburczy, C.; Lock, A.L.; Dwyer, D.A.; Destailats, F.; Mouloungui, Z.; Candy, L.; Bauman, D.E. Uptake and utilization of *trans* octadecenoic acids in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 3850–3861.

106. Smith, T.R.; McNamara, J.P. Regulation of bovine adipose-tissue metabolism during lactation. 6. Cellularity and hormone-sensitive lipase activity as affected by genetic merit and energy-intake. *J. Dairy Sci.* **1990**, *73*, 772–783.
107. Van Haelst, Y.N.T.; Beeckman, A.; Van Kneegsel, A.T.M.; Fievez, V. Short communication: Elevated concentrations of oleic acid and long-chain fatty acids in milk fat of multiparous subclinical ketotic cows. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 4683–4686.
108. Pedron, O.; Cheli, F.; Senatore, E.; Baroli, D.; Rizzi, R. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **1993**, *76*, 2528–2535.
109. Pires, J.A.A.; Delavaud, C.; Faulconnier, Y.; Pomies, D.; Chilliard, Y. Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 6423–6439.
110. Pineyrua, J.T.M.; Farina, S.R.; Mendoza, A. Effects of parity on productive, reproductive, metabolic and hormonal responses of Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* **2018**, *191*, 9–21.
111. Cavestany, D.; Blanc, J.E.; Kulcsar, M.; Uriarte, G.; Chilibröste, P.; Meikle, A.; Febel, H.; Ferraris, A.; Krall, E. Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: Metabolic profiles. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* **2005**, *52*, 1–7.
112. Meikle, A.; Kulcsar, M.; Chilliard, Y.; Febel, H.; Delavaud, C.; Cavestany, D.; Chilibröste, P. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* **2004**, *127*, 727–737.
113. Wathes, D.C.; Cheng, Z.; Bourne, N.; Taylor, V.J.; Coffey, M.P.; Brotherstone, S. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2007**, *33*, 203–225.
114. Williams, C.M. Dietary fatty acids and human health. *Ann. Zootech.* **2000**, *49*, 165–180.
115. Belury, M.A. Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 505–531.
116. Auldish, M.J.; Walsh, B.J.; Thomson, N.A. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *J. Dairy Res.* **1998**, *65*, 401–411.
117. Artegoitia, V.; Meikle, A.; Olazabal, L.; Damian, J.P.; Adrien, M.L.; Mattiauda, D.A.; Bermudez, J.; Torre, A.; Carriquiry, M. Milk casein and fatty acid fractions in early lactation are affected by nutritional regulation of body condition score at the beginning of the transition period in primiparous and multiparous cows under grazing conditions. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2013**, *97*, 919–932.
118. Stádník, L.; Ducháček, J.; Toušová, R.; Beran, J.; Ptáček, M.; Kouřimská, L. Relations between basic milk components and free fatty acid content in Holstein cow milk as lipolysis parameter. *Mljekarstvo* **2015**, *65*, 18–25.
119. Bastin, C.; Soyeurt, H.; Gengler, N. Genetic parameters of milk production traits and fatty acid contents in milk for Holstein cows in parity 1–3. *J. Anim. Breed. Genet.* **2013**, *130*, 118–127.
120. Penasa, M.; Tiezzi, F.; Gottardo, P.; Cassandro, M.; De Marchi, M. Genetics of milk fatty acid groups predicted during routine data recording in Holstein dairy cattle. *Livest. Sci.* **2015**, *173*, 9–13.
121. Schennink, A.; Stoop, W.M.; Visker, M.H.P.W.; Heck, J.M.L.; Bovenhuis, H.; van der Poel, J.J.; van Valenberg, H.J.F.; van Arendonk, J.A.M. *DGAT1* underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Anim. Genet.* **2007**, *38*, 467–473.
122. Garnsworthy, P.C.; Feng, S.; Lock, A.L.; Royal, M.D. Short communication: Heritability of milk fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase indices in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 1743–1748.
123. Hein, L.; Sorensen, L.P.; Kargo, M.; Buitenhuis, A.J. Genetic analysis of predicted fatty acid profiles of milk from Danish Holstein and Danish Jersey cattle populations. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 2148–2157.
124. Bastin, C.; Gengler, N.; Soyeurt, H. Phenotypic and genetic variability of production traits and milk fatty acid contents across days in milk for Walloon Holstein first-parity cows. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 4152–4163.
125. Petrini, J.; Iung, L.H.S.; Rodriguez, M.A.P.; Salvian, M.; Pertille, F.; Rovadoscki, G.A.; Cassoli, L.D.; Coutinho, L.L.; Machado, P.F.; Wiggans, G.R.; et al. Genetic parameters for milk fatty acids, milk yield and quality traits of a Holstein cattle population reared under tropical conditions. *J. Anim. Breed. Genet.* **2016**, *133*, 384–395.

126. Krag, K.; Poulsen, N.A.; Larsen, M.K.; Larsen, L.B.; Janss, L.L.; Buitenhuis, B. Genetic parameters for milk fatty acids in Danish Holstein cattle based on SNP markers using a Bayesian approach. *BMC Genet.* **2013**, *14*, 79, doi:10.1186/1471-2156-14-79.
127. Edwards, R.A.; King, J.W.B.; Yousef, I.M. Genetic variation in fatty acid composition of cow milk. *Anim. Prod.* **1973**, *16*, 307–310.
128. Renner, E.; Kosmack, U. Genetische Aspekte zur Fettsäurezusammensetzung des Milchfettes. 2. Fettsäuremuster der Milch von Nachtkompenpopulationen. *Züchtungskunde* **1974**, *46*, 217–226.
129. Vanrobays, M.L.; Bastin, C.; Vandenplas, J.; Hammami, H.; Soyeurt, H.; Vanlierde, A.; Dehareng, F.; Froidmont, E.; Gengler, N. Changes throughout lactation in phenotypic and genetic correlations between methane emissions and milk fatty acid contents predicted from milk mid-infrared spectra. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 7247–7260.
130. Narayana, S.G.; Schenkel, F.S.; Fleming, A.; Koeck, A.; Malchiodi, F.; Jamrozik, J.; Johnston, J.; Sargolzaei, M.; Miglior, F. Genetic analysis of groups of mid-infrared predicted fatty acids in milk. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 4731–4744.
131. Mosley, E.E.; Shafii, B.; Moate, P.J.; McGuire, M.A. *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 570–575.
132. Bobe, G.; Bormann, J.A.M.; Lindberg, G.L.; Freeman, A.E.; Beitz, D.C. Short communication: Estimates of genetic variation of milk fatty acids in US Holstein cows. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 1209–1213.
133. Poulsen, N.A.; Eskildsen, C.E.A.; Skov, T.; Larsen, L.B.; Buitenhuis, A.J. Comparison of genetic parameters estimation of fatty acids from gas chromatography and FT-IR in Holsteins. In Proceedings of the 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production, Vancouver, BC, Canada, 17–22 August 2014.
134. Soyeurt, H.; Dardenne, P.; Dehareng, F.; Bastin, C.; Gengler, N. Genetic parameters of saturated and monounsaturated fatty acid content and the ratio of saturated to unsaturated fatty acids in bovine milk. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 3611–3626.
135. Stoop, W.M.; van Arendonk, J.A.M.; Heck, J.M.L.; van Valenberg, H.J.F.; Bovenhuis, H. Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 385–394.
136. Bastin, C.; Soyeurt, H.; Vanderick, S.; Gengler, N. Genetic relationships between milk fatty acids and fertility of dairy cows. *Interbull Bull.* **2011**, *44*, 1–5.
137. Lassen, J.; Poulsen, N.A.; Larsen, M.K.; Buitenhuis, A.J. Genetic and genomic relationship between methane production measured in breath and fatty acid content in milk samples from Danish Holsteins. *Anim. Prod. Sci.* **2016**, *56*, 298–303.
138. Qanbari, S.; Pimentel, E.C.G.; Tetens, J.; Thaller, G.; Lichtner, P.; Sharifi, A.R.; Simianer, H. A genome-wide scan for signatures of recent selection in Holstein cattle. *Anim. Genet.* **2010**, *41*, 377–389.
139. Bouwman, A.C.; Bovenhuis, H.; Visker, M.H.P.W.; van Arendonk, J.A.M. Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle. *BMC Genet.* **2011**, *12*, 43, doi:10.1186/1471-2156-12-43.
140. Bouwman, A.C.; Visker, M.H.P.W.; van Arendonk, J.A.M.; Bovenhuis, H. Genomic regions associated with bovine milk fatty acids in both summer and winter milk samples. *BMC Genet.* **2012**, *13*, 93.
141. Buitenhuis, B.; Janss, L.L.G.; Poulsen, N.A.; Larsen, L.B.; Larsen, M.K.; Sorensen, P. Genome-wide association and biological pathway analysis for milk-fat composition in Danish Holstein and Danish Jersey cattle. *BMC Genom.* **2014**, *15*, doi:10.1186/1471-2164-15-1112.
142. Li, C.; Sun, D.X.; Zhang, S.L.; Yang, S.H.; Alim, M.A.; Zhang, Q.; Li, Y.H.; Liu, L. Genetic effects of *FASN*, *PPARGC1A*, *ABCG2* and *IGF1* revealing the association with milk fatty acids in a Chinese Holstein cattle population based on a post genome-wide association study. *BMC Genet.* **2016**, *17*, doi:10.1186/s12863-016-0418-x.
143. Lopdell, T.J.; Tiplady, K.; Struchalin, M.; Johnson, T.J.J.; Keehan, M.; Sherlock, R.; Couldrey, C.; Davis, S.R.; Snell, R.G.; Spelman, R.J.; et al. DNA and RNA-sequence based GWAS highlights membrane-transport genes as key modulators of milk lactose content. *BMC Genom.* **2017**, *18*, doi:10.1186/s12864-017-4320-3.
144. Bionaz, M.; Loor, J.J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genom.* **2008**, *9*, doi:10.1186/1471-2164-9-366.
145. Conte, G.; Mele, M.; Chessa, S.; Castiglioni, B.; Serra, A.; Pagnacco, G.; Secchiari, P. Diacylglycerol acyltransferase 1, stearoyl-CoA desaturase 1, and sterol regulatory element binding protein 1 gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Italian Brown cattle. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 753–763.

146. Bovenhuis, H.; Visker, M.H.P.W.; Poulsen, N.A.; Sehested, J.; van Valenberg, H.J.F.; van Arendonk, J.A.M.; Larsen, L.B.; Buitenhuis, A.J. Effects of the diacylglycerol o-acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism on fatty acid, protein, and mineral composition of dairy cattle milk. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 3113–3123.
147. Schennink, A.; Heck, J.M.L.; Bovenhuis, H.; Visker, M.H.P.W.; van Valenberg, H.J.F.; van Arendonk, J.A.M. Milk fatty acid unsaturation: Genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and acyl CoA: Diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 2135–2143.
148. Pešek, M.; Špička, J.; Samková, E. Comparison of fatty acid composition in milk fat of Czech Pied cattle and Holstein cattle. *Czech J. Anim. Sci.* **2005**, *50*, 122–128.
149. Soyeurt, H.; Dardenne, P.; Gillon, A.; Croquet, C.; Vanderick, S.; Mayeres, P.; Bertozzi, C.; Gengler, N. Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 4858–4865.
150. Soyeurt, H.; Gillon, A.; Vanderick, S.; Mayeres, P.; Bertozzi, C.; Gengler, N. Estimation of heritability and genetic correlations for the major fatty acids in bovine milk. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 4435–4442.
151. Pilarczyk, R.; Wójcik, J.; Sablik, P.; Czerniak, P. Fatty acid profile and health lipid indices in the raw milk of Simmental and Holstein-Friesian cows from an organic farm. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **2015**, *45*, 30–38.
152. Morales, M.S.; Palmquist, D.L.; Weiss, W.P. Milk fat composition of Holstein and Jersey cows with control or depleted copper status and fed whole soybeans or tallow. *J. Dairy Sci.* **2000**, *83*, 2112–2119.
153. White, S.L.; Bertrand, J.A.; Wade, M.R.; Washburn, S.P.; Green, J.T.; Jenkins, T.C. Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* **2001**, *84*, 2295–2301.
154. Bargo, F.; Delahoy, J.E.; Schroeder, G.F.; Baumgard, L.H.; Muller, L.D. Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2006**, *131*, 226–240.
155. Croissant, A.E.; Washburn, S.P.; Dean, L.L.; Drake, M.A. Chemical properties and consumer perception of fluid milk from conventional and pasture-based production systems. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 4942–4953.
156. Mäntysaari, P.; Khalili, H.; Sariola, J.; Rantanen, A. Use of barley fibre and wet distillers' solubles as feedstuffs for Ayrshire dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *135*, 52–65.
157. Moioli, B.; Contarini, G.; Avalli, A.; Catillo, G.; Orru, L.; De Matteis, G.; Masoero, G.; Napolitano, F. Short communication: Effect of stearoyl-coenzyme A desaturase polymorphism on fatty acid composition of milk. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 3553–3558.
158. Barłowska, J.; Grodzicki, T.; Topyła, B.; Litwińczuk, Z. Physicochemical properties of milk fat from three breeds of cows during summer and winter feeding. *Arch. Tierzucht* **2009**, *52*, 356–363.
159. Adamska, A.; Rutkowska, J.; Tabaszewska, M. Milk of Polish Red and White cows as a source of nutritionally valuable fatty acids. *Arch. Tierzucht* **2014**, *57*, doi:10.7482/0003-9438-57-010.
160. Kulig, H.; Kowalewska-Luczak, I.; Kmiec, M.; Wojdak-Maksymiec, K. ANXA9, SLC27A3, FABP3 and FABP4 single nucleotide polymorphisms in relation to milk production traits in Jersey cows. *Czech J. Anim. Sci.* **2010**, *55*, 463–467.
161. Tomka, J.; Vasickova, K.; Oravcova, M.; Bauer, M.; Huba, J.; Vasicek, D.; Peskovicova, D. Effects of polymorphisms in DGAT1 and LEP genes on milk traits in Holstein primiparous cows. *Mljekarstvo* **2016**, *66*, 122–128.
162. Cohen-Zinder, M.; Seroussi, E.; Larkin, D.M.; Looor, J.J.; Everts-van der Wind, A.; Lee, J.H.; Drackley, J.K.; Band, M.R.; Hernandez, A.G.; Shani, M.; et al. Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Res.* **2005**, *15*, 936–944.
163. Weikard, R.; Kuhn, C.; Goldammer, T.; Freyer, G.; Schwerin, M. The bovine PPARGC1A gene: Molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiol. Genom.* **2005**, *21*, 1–13.
164. Khatib, H.; Zaitoun, I.; Wiebelhaus-Finger, J.; Chang, Y.M.; Rosa, G.J.M. The association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk composition in two independent holstein cattle populations. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 2966–2970.
165. Grisart, B.; Coppieters, W.; Farnir, F.; Karim, L.; Ford, C.; Berzi, P.; Cambisano, N.; Mni, M.; Reid, S.; Simon, P.; et al. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* **2002**, *12*, 222–231.

166. Matsumoto, H.; Inada, S.; Kobayashi, E.; Abe, T.; Hasebe, H.; Sasazaki, S.; Oyama, K.; Mannen, H. Identification of SNPs in the *FASN* gene and their effect on fatty acid milk composition in Holstein cattle. *Livest. Sci.* **2012**, *144*, 281–284.
167. Yao, J.B.; Aggrey, S.E.; Zadworny, D.; Hayes, J.F.; Kühnlein, U. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. *Genetics* **1996**, *144*, 1809–1816.
168. He, X.; Chu, M.X.; Qiao, L.; He, J.N.; Wang, P.Q.; Feng, T.; Di, R.; Cao, G.L.; Fang, L.; An, Y.F. Polymorphisms of *STAT5A* gene and their association with milk production traits in Holstein cows. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 2901–2907.
169. Nafikov, R.A.; Schoonmaker, J.R.; Korn, K.T.; Noack, K.; Garrick, D.J.; Koehler, K.J.; Minick-Bormann, J.; Reecy, J.M.; Spurlock, D.E.; Beitz, D.C. Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (*SREBF1*) polymorphism and milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 2605–2616.
170. Waters, S.M.; McCabe, M.S.; Howard, D.J.; Giblin, L.; Magee, D.A.; MacHugh, D.E.; Berry, D.P. Associations between newly discovered polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone receptor gene and performance traits in Holstein-Friesian dairy cattle. *Anim. Genet.* **2011**, *42*, 39–49.
171. Littlejohn, M.D.; Tiplady, K.; Lopdell, T.; Law, T.A.; Scott, A.; Harland, C.; Sherlock, R.; Henty, K.; Obolonkin, V.; Lehnert, K.; et al. Expression Variants of the lipogenic *AGPAT6* gene affect diverse milk composition phenotypes in *Bos taurus*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, doi:10.1371/journal.pone.0085757.
172. Soyeurt, H.; Gengler, N. Genetic variability of fatty acids in bovine milk. *Biotechnol. Agron. Soc.* **2008**, *12*, 203–210.
173. Ulbricht, T.L.V.; Southgate, D.A.T. Coronary heart disease—7 dietary factors. *Lancet* **1991**, *338*, 985–992.
174. Santos-Silva, J.; Mendes, I.A.; Bessa, R.J.B. The effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs—1. Growth, carcass composition and meat quality. *Livest. Prod. Sci.* **2002**, *76*, 17–25.
175. Chen, S.; Bobe, G.; Zimmerman, S.; Hammond, E.G.; Luhman, C.M.; Boylston, T.D.; Freeman, A.E.; Beitz, D.C. Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acid compositions. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3422–3428.
176. Ntambi, J.M.; Miyazaki, M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 91–104.
177. Lock, A.L.; Garnsworthy, P.C. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Delta(9)-desaturase activity in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* **2003**, *79*, 47–59.
178. Chouinard, P.Y.; Corneau, L.; Barbano, D.M.; Metzger, L.E.; Bauman, D.E. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1579–1584.
179. Mele, M.; Conte, G.; Castiglioni, B.; Chessa, S.; Macciotta, N.P.P.; Serra, A.; Buccioni, A.; Pagnacco, G.; Secchiari, P. Stearoyl-coenzyme A desaturase gene polymorphism and milk fatty acid composition in Italian Holsteins. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 4458–4465.
180. Erickson, M.C. Variation of lipid and tocopherol composition in 3 strains of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Sci. Food Agric.* **1992**, *59*, 529–536.
181. Saito, M.; Kubo, K. Relationship between tissue lipid peroxidation and peroxidizability index after alpha-linolenic, eicosapentaenoic, or docosahexaenoic acid intake in rats. *Br. J. Nutr.* **2003**, *89*, 19–28.
182. Nagyová, A.; Krajčovičová-Kudláčková, M.; Klvanová, J. LDL and HDL oxidation and fatty acid composition in vegetarians. *Ann. Nutr. Metab.* **2001**, *45*, 148–151.
183. Timmen, H. Characterization of milk fat hardness in farm milk via parameters of fatty-acid composition. *Kieler Milchw. Forsch.* **1990**, *42*, 129–138.
184. Hurtaud, C.; Buchin, S.; Martin, B.; Verdier-Metz, I.; Peyraud, J.L.; Noel, Y. Milk quality and consequences on quality of dairy products: Several some measuring techniques of measure in dairy cows trials. *Recontres autour des Recherches sur Ruminant* **2001**, *8*, 35–42. (In French)
185. Hanuš, O.; Samková, E.; Špička, J.; Sojková, K.; Hanušová, K.; Kopec, T.; Vyletělová, M.; Jedelská, R. Relationship between concentration of health important groups of fatty acids and components and technological properties in cow milk. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.* **2010**, *58*, 137–154.
186. Brzozowska, A.M.; Lukaszewicz, M.; Oprzadek, J.M. Energy-protein supplementation and lactation affect fatty acid profile of liver and adipose tissue of dairy cows. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23030618.

187. Drewnowski, A. The contribution of milk and milk products to micronutrient density and affordability of the US diet. *J. Am. Coll. Nutr.* **2011**, *30*, 422–428.
188. Haug, A.; Hostmark, A.T.; Harstad, O.M. Bovine milk in human nutrition—A review. *Lipids Health Dis.* **2007**, *6*, doi:10.1186/1476-511X-6-25.
189. Mills, S.; Ross, R.P.; Hill, C.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* **2011**, *21*, 377–401.
190. Jenkins, T.C.; McGuire, M.A. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 1302–1310.
191. Givens, D.I. Symposium 1: Food chain and health milk in the diet: Good or bad for vascular disease? *Proc. Nutr. Soc.* **2012**, *71*, 98–104.
192. Kromhout, D.; Bloemberg, B.; Feskens, E.; Menotti, A.; Nissinen, A.; Grp, S.C.S. Saturated fat, vitamin C and smoking predict long-term population all-cause mortality rates in the Seven Countries Study. *Int. J. Epidemiol.* **2000**, *29*, 260–265.
193. Simopoulos, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 365–379.
194. Calder, P.C. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **2015**, *39*, 18–32.
195. Wong, J.M.W.; de Souza, R.; Kendall, C.W.C.; Emam, A.; Jenkins, D.J.A. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* **2006**, *40*, 235–243.
196. Van der Beek, C.M.; Dejong, C.H.C.; Troost, F.J.; Masclee, A.M.; Lenaerts, K. Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing. *Nutr. Rev.* **2017**, *75*, 286–305.
197. Meijer, K.; de Vos, P.; Priebe, M.G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: What relevance for health? *Curr. Opin. Clin. Nutr.* **2010**, *13*, 715–721.
198. Arnould, V.M.R.; Soyeurt, H. Genetic variability of milk fatty acids. *J. Appl. Genet.* **2009**, *50*, 29–39.
199. Yang, Z.H.; Liu, S.P.; Chen, X.D.; Chen, H.; Huang, M.; Zheng, J.P. Induction of apoptotic cell death and in vivo growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched-chain fatty acid, 13-methyltetradecanoic acid. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 505–509.
200. Cai, Q.Q.; Huang, H.Q.; Qian, D.; Chen, K.L.; Luo, J.H.; Tian, Y.; Lin, T.X.; Lin, T.Y. 13-Methyltetradecanoic acid exhibits anti-tumor activity on T-cell lymphomas in vitro and in vivo by down-regulating p-AKT and activating caspase-3. *PLoS ONE* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0065308.
201. Wongtangtintharn, S.; Oku, H.; Iwasaki, H.; Toda, T. Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2004**, *50*, 137–143.
202. Ran-Ressler, R.R.; Khailova, L.; Arganbright, K.M.; Adkins-Rieck, C.K.; Jouni, Z.E.; Koren, O.; Ley, R.E.; Brenna, J.T.; Dvorak, B. Branched chain fatty acids reduce the incidence of necrotizing *Enterocolitis* and alter gastrointestinal microbial ecology in a neonatal rat model. *PLoS ONE* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0029032.
203. Kraft, J.; Jetton, T.; Satish, B.; Gupta, D. Dairy-derived bioactive fatty acids improve pancreatic beta-cell function. *FASEB J.* **2015**, *29*, 608–625.
204. Khaw, K.T.; Friesen, M.D.; Riboli, E.; Luben, R.; Wareham, N. Plasma phospholipid fatty Acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: The EPIC-Norfolk prospective study. *PLoS Med.* **2012**, *9*, doi:10.1371/journal.pmed.1001255.
205. Forouhi, N.G.; Koulman, A.; Sharp, S.J.; Imamura, F.; Kroger, J.; Schulze, M.B.; Crowe, F.L.; Huerta, J.M.; Guevara, M.; Beulens, J.W.J.; et al. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: The EPIC-InterAct case-cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2014**, *2*, 810–818.
206. Weggemans, R.M.; Rudrum, M.; Trautwein, E.A. Intake of ruminant versus industrial *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease—What is the evidence? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 390–397.
207. Lock, A.L.; Parodi, P.W.; Bauman, D.E. The biology of *trans* fatty acids: Implications for human health and the dairy industry. *Aust. J. Dairy Technol.* **2005**, *60*, 134–142.
208. Bendtsen, N.T.; Christensen, R.; Bartels, E.M.; Astrup, A. Consumption of industrial and ruminant *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2011**, *65*, 773–783.

209. Anadon, A.; Martinez-Larranaga, M.R.; Martinez, M.A.; Ares, I.; Ramos, E.; Gomez-Cortes, P.; Juarez, M.; De la Fuente, M.A. Acute oral safety study of dairy fat rich in *trans*-10 C18:1 versus vaccenic plus conjugated linoleic acid in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 591–598.
210. Anadon, A.; Martinez-Larranaga, M.R.; Martinez, M.A.; Ares, I.; Ramos, E.; Gomez-Cortes, P.; Juarez, M.; de la Fuente, M.A. A 4-week repeated oral dose toxicity study of dairy fat naturally enriched in vaccenic, rumenic and alpha-linolenic acids in rats. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8036–8046.
211. De Souza, R.J.; Mente, A.; Maroleanu, A.; Cozma, A.I.; Ha, V.; Kishibe, T.; Uleryk, E.; Budyłowski, P.; Schunemann, H.; Beyene, J.; et al. Intake of saturated and *trans* unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ.* **2015**, *351*, doi:10.1136/bmj.h3978.
212. Ferlay, A.; Bernard, L.; Meynadier, A.; Malpuech-Brugere, C. Production of *trans* and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie* **2017**, *141*, 107–120.
213. Kennedy, A.; Martinez, K.; Chuang, C.C.; LaPoint, K.; McIntosh, M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: Mechanisms of action and implications. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 1–4.
214. Kennedy, A.; Martinez, K.; Chung, S.; LaPoint, K.; Hopkins, R.; Schmidt, S.F.; Andersen, K.; Mandrup, S.; McIntosh, M. Inflammation and insulin resistance induced by *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid depend on intracellular calcium levels in primary cultures of human adipocytes. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 1906–1917.
215. Moon, H.S. Biological effects of conjugated linoleic acid on obesity-related cancers. *Chem.-Biol. Interact.* **2014**, *224*, 189–195.
216. Field, C.J.; Blewett, H.H.; Proctor, S.; Vine, D. Human health benefits of vaccenic acid. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2009**, *34*, 979–991.
217. Frigolet, M.E.; Gutierrez-Aguilar, R. The role of the novel lipokine palmitoleic acid in health and disease. *Adv. Nutr.* **2017**, *8*, 173–181.
218. Muchenje, V.; Dzama, K.; Chimonyo, M.; Strydom, P.E.; Hugo, A.; Raats, J.G. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. *Food Chem.* **2009**, *112*, 279–289.
219. Zhao, G.X.; Etherton, T.D.; Martin, K.R.; West, S.G.; Gillies, P.J.; Kris-Etherton, P.M. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 2991–2997.
220. Liu, J.J.; Ma, D.W.L. The Role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients* **2014**, *6*, 5184–5223.
221. Destailats, F.; Trottier, J.P.; Galvez, J.M.G.; Angers, P. Analysis of alpha-linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 3231–3239.
222. Lerch, S.; Shingfield, K.J.; Ferlay, A.; Vanhatalo, A.; Chilliard, Y. Rapeseed or linseed in grass-based diets: Effects on conjugated linoleic and conjugated linolenic acid isomers in milk fat from Holstein cows over 2 consecutive lactations. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 7269–7287.
223. Allen, B.G.; Bhatia, S.K.; Anderson, C.M.; Eichenberger-Gilmore, J.M.; Sibenaller, Z.A.; Mapuskar, K.A.; Schoenfeld, J.D.; Buatti, J.M.; Spitz, D.R.; Fath, M.A. Ketogenic diets as an adjuvant cancer therapy: History and potential mechanism. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 963–970.
224. Lamarche, B.; Givens, D.I.; Soedamah-Muthu, S.; Krauss, R.M.; Jakobsen, M.U.; Bischoff-Ferrari, H.A.; Pan, A.; Despres, J.P. Does milk consumption contribute to cardiometabolic health and overall diet quality? *Can. J. Cardiol.* **2016**, *32*, 1026–1032.

225. Kiczorowska, B.; Samolinska, W.; Marczuk, J.; Winiarska-Mieczan, A.; Klebaniuk, R.; Kowalczyk-Vasilev, E.; Kiczorowski, P.; Zasadna, Z. Comparative effects of organic, traditional, and intensive production with probiotics on the fatty acid profile of cow's milk. *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *63*, 157–163.
226. Lukiw, W.J.; Cui, J.G.; Marcheselli, V.L.; Bodker, M.; Botkjaer, A.; Gotlinger, K.; Serhan, C.N.; Bazan, N.G. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 2774–2783.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Příloha 2:

Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Hanuš, O., **Kala, R.**, Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J. 2018. Joint effects of breed, parity, month of lactation, and cow individuality on the milk fatty acids composition. *Mljekarstvo*, 68(2): 98-107. (**JIMP**)

Joint effects of breed, parity, month of lactation, and cow individuality on the milk fatty acids composition

doi: 10.15567/mljekarstvo.2018.0203

Eva Samková^{1*}, Jana Koubová¹, Lucie Hasoňová¹, Oto Hanuš², Robert Kala¹,
Martin Kváč¹, Tamara Pelikánová¹, Jiří Špička¹

¹University of South Bohemia, Faculty of Agriculture, Studentská 809,
370 05 České Budějovice, Czech Republic

²Dairy Research Institute, Ltd., Prague, Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6 - Vokovice, Czech Republic

Received - Prispjelo: 21.06.2017.

Accepted - Prihvačeno: 20.02.2018.

Abstract

The aim of the study was to explain the effects of four animal factors - breed, parity, cow individuality (within breed phenotypic variation) and month of lactation on the composition of bovine milk fatty acids (FA) in a local dual-purpose Czech Fleckvieh breed as compared to the worldwide dairy Holstein breed. In total, 357 milk samples were analysed from 25 dairy cows of each breed during year-round testing. The variation in the individual FA was affected mainly by cows' individuality (16-48) and month of lactation (3-18 %). The effects of breed and parity were limited (each about 2%). The animal related factors appeared significant also for FA groups. Greater differences in the explained variation of all factors were observed in the groups classified by the number of FA carbons (35.8, 54.4 and 44.8 % for C4 to C14, C16 and C18 to C24, respectively) and by the number of double bounds (45.4 % and 39.2 % for monounsaturated and polyunsaturated FA, respectively) as well. No differences in the explained variation were observed between the groups of saturated and unsaturated FA (46.8% and 45.9 %, respectively). In conclusion, from the viewpoint of nutrition it would be more convenient to classify FA by the number of carbons than by the usual grouping to saturated/unsaturated FA.

Key words: cow, milk, fatty acids, animal factors

Introduction

Bovine milk fat is often considered as not favorable to human health due to high content of saturated fatty acids (FA) (about 65 %) and *trans* isomers of unsaturated FA (about 5 %; Jensen, 2002). Both groups of FA are associated with cardiovascular diseases. As recent research shows, FA of animal origin are not as adverse as industrially produced *trans* fats (German et al., 2009). In addition, a relatively high proportion of oleic acid (about 18 %) occurs in bovine milk fat, which can contribute to a reduction of blood lipids (Lopez-Huertas, 2010). Also stearic acid at level of about 10% has beneficial biological effects (Kris-Etherton et al., 2005) in compari-

son to other saturated FA, like myristic and palmitic acid. Moreover, the milk fat contains in a small proportion (about 3 %) other nutritionally important FA like linoleic, α -linolenic and conjugated linoleic (CLA) acids (Lock and Baumann, 2004).

Researchers strived for decades to modify milk fat composition to achieve a higher proportion of nutritionally desirable FA (e.g. Kliem and Shingfield, 2016). Although, the FA composition is affected mainly by feeding (dietary) factors (Kalac and Samkova, 2010; Vranjes et al., 2010), animal (non-dietary) factors should not be ignored (Palmquist et al., 1993). Although all animal factors affecting milk FA composition have been

*Corresponding author/Dopisni autor: Phone: +420 387 772 618; E-mail: samkova@zf.jcu.cz

previously reported, mostly one or two factors have been included in statistical models (e. g. Soyeurt et al., 2006; Poulsen et al., 2012). This approach may lead to partial misinterpretation of data, because of the mutual relations of each animal factor, both synergistic and antagonistic, need to be respected (Samkova et al., 2012). There is a limited number of published work that studied more than three factors. For example, De La Fuente et al. (2009) and Sojak et al. (2013) examined the variability of FA composition in ovine milk fat. Nevertheless, the results can hardly be compared to bovine milk fat due to the seasonal changes in small ruminants. The variability of FA composition in bovine milk fat taking into account more than two factors has been sporadically reported (Kelsey et al., 2003; Soyeurt et al., 2006; Schwendel et al., 2015).

Thus, the aim of this study was to determine the extent of variability, explaining joint effect of four tested animal factors (breed, parity, cow individuality and month of lactation) on the composition of bovine milk FA in dual-purpose Czech Fleckvieh and dairy Holstein breed.

Material and methods

Statement of institutional animal care

Ethical committee hereby declares that experiments performed in the present study are according Act No 246/1992 Coll., on the protection of animals against cruelty of the Czech Republic. With regard to the type of study, no special permission was required.

Sampling and feeding

The study was carried out on a farm (420 meters above sea level) located in the region of South Bohemia, Czech Republic. Thereat cows of two breeds, Czech Fleckvieh (dual-purpose) and Holstein (dairy) were housed together in one stable and were milked twice a day. Milk was sampled within the afternoon regular testing of milk efficiency twelve times a year.

Within each of 12 samplings, milk samples were taken according to breed, parity and month of lactation to get a balanced set of samples (Table 1 and 2). Twenty five cows of each breed were selected (30% of all lactating cows). From each cow 7 milk samples were obtained on average (5 to 10) during its lactation.

Table 1. Mean, standard deviation (SD), minimum, and maximum values for parity and days in milk of Czech Fleckvieh and Holstein cows

| Item | Czech Fleckvieh (n = 188) | | | Holstein (n = 175) | | | P-value |
|--------------|---------------------------|------|------|--------------------|------|------|---------|
| | Mean±SD | Min. | Max. | Mean±SD | Min. | Max. | |
| Parity | 2.03±0.79 | 1 | 4 | 2.07±0.76 | 1 | 5 | 0.0334 |
| Days in milk | 155±80 | 9 | 330 | 152±78 | 10 | 312 | 0.0646 |

P-value = probability

Table 2. Distribution of milk samples according to breed, parity and months of lactation

| Months of lactation | Days in milk | Czech Fleckvieh | | | | Holstein | | | | Total |
|---------------------|--------------|-----------------|----|----|-------|----------|----|----|-------|-------|
| | | Parity | | | Total | Parity | | | Total | |
| | | 1 | 2 | ≥3 | | 1 | 2 | ≥3 | | |
| 1 | (<30) | 2 | 4 | 5 | 11 | 2 | 3 | 5 | 10 | 21 |
| 2 | (31-60) | 4 | 6 | 5 | 15 | 4 | 5 | 6 | 15 | 30 |
| 3 | (61-90) | 6 | 6 | 8 | 20 | 5 | 6 | 8 | 19 | 39 |
| 4 | (91-120) | 6 | 8 | 6 | 20 | 5 | 9 | 7 | 21 | 41 |
| 5 | (121-150) | 6 | 9 | 7 | 22 | 5 | 9 | 6 | 20 | 42 |
| 6 | (151-180) | 6 | 9 | 8 | 23 | 6 | 9 | 7 | 22 | 45 |
| 7 | (181-210) | 6 | 7 | 6 | 19 | 5 | 8 | 6 | 19 | 38 |
| 8 | (211-240) | 6 | 7 | 5 | 18 | 4 | 8 | 4 | 16 | 34 |
| 9 | (241-270) | 6 | 8 | 5 | 19 | 5 | 9 | 4 | 18 | 37 |
| 10 | (>271) | 5 | 6 | 4 | 15 | 5 | 6 | 4 | 15 | 30 |
| Total | | 53 | 70 | 59 | 182 | 46 | 72 | 57 | 175 | 357 |

Cows were fed under the same conditions during the whole year. Total mixed rations were formulated by the DLG-Futterwerttabellen, Wiederkäufer (1997) and calculated for the mean live weight 650 kg, milk fat content of 4.2 % and milk protein content of 3.5 %. Total mixed rations consisted of components widely used in the recent Czech farming practice - see Tables 3 and 4.

Analytical methods

Milk samples were immediately cooled after sampling and transported to the laboratory in a cool box. Milk samples were analysed for the fat, protein and lactose contents that were determined spectrophotometrically using a Milcoscan 4000 (Foss Electric, Hillerød, Denmark). Milk fat was extracted with petroleum ether from freeze dried milk samples. FA were re-esterified in isolated fat to their methyl esters by a methanolic solution of potassium hydroxide. Methyl esters of FA were determined by a gas-liquid chromatographic method (GLC) using an apparatus Varian 3300 (Varian Techtron, USA) under conditions according to Samkova et al. (2009).

The identification of FA was carried out using the analytical standards (Supelco, USA). In total, 45 FA were observed of which 33 were identified. The proportions of individual FA were calculated from the ratio of their peak area to the total area of all the observed acids.

Statistical analysis

The data were analyzed by Statistica CZ 6.1 (Statsoft CR) software using a general linear model with fixed effects of breed, parity and month of lactation and with random effect of cows nested in breed:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + I_j(B_i) + P_k + MOL_l + \varepsilon_{ijkl},$$

where

Y_{ijkl} = milk yield (kg/d), fat, protein and lactose content (g/100 g), proportion of individual milk FA (g/100g of FA), and groups of FA (g/100 g of FA); μ = mean; B_i = breed (i = Czech Fleckvieh, Holstein); $I_j(B_i)$ = cow individuality (j = 1-50); P_k = parity (k = 1, 2, 3); MOL_l = month of lactation (l = 1-10; see Table 2), and ε_{ijkl} = residual error. For the groups comparison unequal N HSD test was used.

The total explained variance (coefficient of determination; R^2) and variance explained by four animal factors (factors variance) were calculated using sum of squares and were expressed in percent. R^2 was defined as $[(1 - (\text{residual sum of squares}/\text{total sum of squares})) \times 100]$, factors variance was defined as $[(\text{sum of squares of individual effects}/\text{total sum of squares}) \times 100]$.

Table 3. Components composition of average total mixed rations

| Components composition | % of DM ¹ |
|---------------------------------|----------------------|
| Maize silage | 27.5 |
| Grass silage | 32.5 |
| Hay | 4.0 |
| Mashed oats | 6.0 |
| Production mixture ² | 30.0 |

¹DM = intake of dry matter was 18.4 kg/d.

²Production mixture composed of wheat, barley, extracted soybean meal, and salt, minerals and vitamins in proportion 32, 32, 32, and 4 %, respectively); minerals and vitamins mixture consisted per kilogram: 210, 30, 100, 70 g of calcium, phosphorus, sodium, magnesium; 750, 30, 80, 2,730 mg of copper, selenium, iodine, vitamin E; 500,000 and 75,000 IU of vitamin A and D₃, respectively.

Table 4. Chemical composition of diet components

| Item | Maize silage | Grass silage | Hay ¹ | Mashed oats | Production mixture ² |
|--------------------------------------|--------------|--------------|------------------|-------------|---------------------------------|
| Dry matter (DM; g/kg) | 356 | 327 | 897 | 870 | 884 |
| Concentration (g/kg DM) | | | | | |
| Crude protein ³ | 79.0 | 133.8 | 71.4 | 132.2 | 242.0 |
| Crude fat | 2.4 | 19.8 | 18.9 | 42.5 | 19.3 |
| Crude fibre | 179.5 | 262.1 | 309.2 | 141.4 | 39.1 |
| Crude ash | 1.5 | 8.5 | 3.2 | 33.6 | 75.2 |
| NE _L (MJ/kg) ⁴ | 6.62 | 4.93 | 4.68 | 6.83 | 8.02 |

¹Permanent grassland hay from late cut with prevailing *Deschampsia cespitosa*, *Agrostis tenuis*, *Agrostis stolonifera*, *Alopecurus pratensis*.

²Production mixture consisted of 37, 31, 28 and 4 % (w/w) of wheat, barley, extracted soybean meal and a mixture of minerals and vitamins.

³Crude protein = N x 6.25.

⁴NE_L = Net Energy of Lactation (Sommer et al., 1994).

Results and discussion

The fat is a major variable constituent of milk and its composition is influenced by various factors (Schwendel et al., 2015). The group of animal factors includes breed, parity, stage of lactation (expressed in days in milk, weeks, or months) or milk yield and milk composition (Samkova et al., 2012). All these factors are within the breed affected by a phenotypic variation (cow individuality). It seems like the main role was assigned to a genetic variability (Arnould and Soyeurt, 2009) and to a physiology of milk production (Kay et al., 2005).

The results from our data analysed by a general linear model (Table 5) showed that the four animal factors tested ascribe a relatively high proportion of the total explained variation (R^2) of individual FA in milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows ranging from 23.3 to 61.8 % (mean 42 %). The main factors were cow individuality (from 16 to 48 %; 28 %) and month of lactation (from 3 to 18 %; 9 %). Breed and parity affected the mean R^2 in a limited extent (each about 2 %).

The dominant role of month of lactation within the three factors (breed, parity, and days in milk)

Table 5. Distribution of the total variance for milk yield (kg/d), fat, protein and lactose content (g/100 g), milk fatty acids (FA), and groups of FA (g/100 g of FA) in a general linear model (GLM) involving animal factors

| Item | Animal factors ¹ | | | | | | | | R^2 (GLM) ² | |
|----------------------------|-----------------------------|-----|---------------|-----|----------------|-----|--------------------|-----|--------------------------|-----|
| | Breed | | Individuality | | Parity | | Month of lactation | | | |
| | % | P | % | P | % | P | % | P | % | P |
| Milk yield and composition | | | | | | | | | | |
| Milk yield | 8 | *** | 31 | *** | 1 | * | 34 | *** | 76.2 | *** |
| Fat content | 1 | * | 35 | *** | 0 [#] | ns | 6 | *** | 42.4 | *** |
| Protein content | 9 | *** | 32 | *** | 1 | ** | 29 | *** | 72.1 | *** |
| Lactose content | 0 [#] | ns | 40 | *** | 1 | ns | 16 | *** | 61.1 | *** |
| FCM ³ | 6 | ** | 30 | *** | 0 [#] | ns | 32 | *** | 71,7 | *** |
| ECM ⁴ | 6 | ** | 32 | *** | 1 | † | 31 | *** | 71,8 | *** |
| Individual FA | | | | | | | | | | |
| C4:0 | 0 [#] | ns | 17 | ns | 1 | ns | 4 | ns | 23.3 | * |
| C6:0 | 0 [#] | ns | 18 | ns | 1 | ns | 3 | ns | 24.1 | * |
| C8:0 | 1 | ns | 19 | * | 1 | ns | 7 | *** | 28.8 | *** |
| C10:0 | 4 | *** | 20 | *** | 1 | * | 12 | *** | 37.4 | *** |
| C12:0 | 3 | *** | 20 | *** | 2 | * | 14 | *** | 38.3 | *** |
| C14:0 | 1 | ** | 24 | *** | 2 | * | 15 | *** | 41.3 | *** |
| C14:1 | 15 | *** | 29 | *** | 0 [#] | ns | 15 | *** | 61.8 | *** |
| C16:0 | 2 | *** | 40 | *** | 2 | *** | 9 | *** | 54.4 | *** |
| C16:1 | 2 | ** | 40 | *** | 1 | ns | 4 | * | 47.9 | *** |
| C18:0 | 0 [#] | ns | 29 | *** | 3 | ** | 8 | *** | 40.8 | *** |
| C18:1 | 0 [#] | ns | 26 | *** | 2 | * | 18 | *** | 46.2 | *** |
| C18:2 <i>n</i> -6 | 0 [#] | ns | 48 | *** | 2 | *** | 5 | *** | 54.9 | *** |
| C18:3 <i>n</i> -3 | 0 [#] | ns | 39 | *** | 5 | *** | 4 | ** | 47.0 | *** |
| CLA ⁵ | 1 | * | 16 | * | 1 | ns | 9 | *** | 28.2 | *** |
| Group of FA ⁶ | | | | | | | | | | |
| SFA | 0 [#] | ns | 29 | *** | 2 | ** | 16 | *** | 46.8 | *** |
| UFA | 0 [#] | ns | 27 | *** | 2 | ** | 17 | *** | 45.9 | *** |
| MUFA | 0 [#] | ns | 26 | *** | 2 | * | 18 | *** | 45.4 | *** |
| PUFA | 1 | ns | 33 | *** | 1 | ns | 5 | ** | 39.2 | *** |
| C4-C14 | 2 | ** | 18 | ** | 2 | * | 15 | *** | 35.8 | *** |
| C18-C24 | 0 [#] | ns | 26 | *** | 2 | ** | 16 | *** | 44.8 | *** |

P = probability; ns = not significant; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; # = % of total variance < 0.5 .

¹Animal factors, in % = proportion of individual factors variance accounted for by total variance.

² R^2 (GLM), in % = proportion of total explained variance (coefficient of determination)

³FCM = Fat Corrected Milk (4 %).

⁴ECM = Energy Corrected Milk.

⁵CLA = C18:2 *cis*-9, *trans*-11.

⁶SFA = saturated FA; UFA = unsaturated FA; MUFA = monounsaturated FA; PUFA = polyunsaturated FA; C4-C14 = sum of C4 to C14 (even); C18-C24 = sum of C18 to C24; C18 = sum of C18:0, C18:1, C18:2*n*-6, C18:3*n*-6, C18:3*n*-3, and CLA.

was confirmed by Kelsey et al. (2003), who found the R^2 ranging from 2.2 to 35.8 %. Lower levels were probably caused by only one milk sampling, which did not allow for the testing of a cow individuality. The observed high proportion of R^2 was affected by all year round sampling and by factor of cow individuality. Cow individuality differences in FA proportion could be affected by various factors such as pedigree, health status or rumen biohydrogenation. Also differ-

ent feed intake and obviously different response on feeding diet can play an important role. The effect of cow individuality on milk fat composition was also affirmed by Elgersma et al. (2006), who tested the response of individual cows on changes in feeding ration. They found that even if patterns in response to diet changes were similar, proportion of CLA differed among cows.

Table 6. Milk yield (kg/d), fat, protein, and lactose content (g/100 g), milk fatty acids (FA), and groups of FA (g/100 g of FA) depending on breed, cow individuality and parity

| Number of milk samples | Breed ¹ | | Individuality ² | | Parity | | | Total | | | | |
|----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|-----------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------|-----------|------|------|--|
| | C | H | C | H | 1 | 2 | >3 | Mean | Min.-Max. | SEM | RSD | |
| | 186 | 170 | 25 [#] | 25 [#] | 98 | 142 | 116 | | | | | |
| Milk yield and composition | | | | | | | | | | | | |
| Milk yield | 19.03 ^a | 22.86 ^b | 11.4-26.1 | 10.8-29.6 | 18.90 ^a | 21.17 ^b | 22.13 ^b | 20.9 | 4.5-44.3 | 0.38 | 34.6 | |
| Fat | 4.36 | 4.22 | 3.4-5.4 | 3.5-5.5 | 4.35 | 4.27 | 4.28 | 4.29 | 2.2-6.9 | 0.04 | 18.9 | |
| Protein | 3.61 ^b | 3.36 ^a | 3.2-4.3 | 2.8-3.8 | 3.52 | 3.47 | 3.50 | 3.49 | 2.4-4.8 | 0.02 | 12.7 | |
| Lactose | 4.82 | 4.78 | 3.9-5.2 | 4.4-5.0 | 4.86 ^b | 4.80 ^{ab} | 4.76 ^a | 4.80 | 3.3-5.5 | 0.02 | 6.3 | |
| FCM ³ | 19.84 ^a | 23.43 ^b | 11.3-25.3 | 11.3-29.8 | 19.69 ^a | 21.76 ^b | 22.89 ^b | 21.6 | 3.7-47.4 | 0.39 | 33.7 | |
| ECM ⁴ | 21.63 ^a | 25.23 ^b | 12.9-27.4 | 12.4-31.2 | 21.36 ^a | 23.55 ^b | 24.79 ^b | 23.3 | 4.1-47.6 | 0.40 | 32.2 | |
| Individual FA | | | | | | | | | | | | |
| C4:0 | 2.01 | 2.03 | 1.7-2.3 | 1.6-2.3 | 1.96 | 2.02 | 2.07 | 2.02 | 0.8-3.7 | 0.02 | 20.6 | |
| C6:0 | 1.81 | 1.82 | 1.6-2.1 | 1.6-2.1 | 1.76 ^a | 1.81 ^{ab} | 1.86 ^b | 1.81 | 0.9-2.8 | 0.02 | 16.6 | |
| C8:0 | 1.35 | 1.33 | 1.2-1.5 | 1.1-1.5 | 1.29 ^a | 1.34 ^{ab} | 1.38 ^b | 1.34 | 0.6-2.2 | 0.01 | 16.6 | |
| C10:0 | 3.58 ^b | 3.38 ^a | 3.0-3.9 | 2.6-3.9 | 3.34 ^a | 3.47 ^{ab} | 3.62 ^b | 3.48 | 1.5-5.2 | 0.03 | 18.4 | |
| C12:0 | 4.35 ^b | 4.13 ^a | 3.6-5.1 | 3.1-5.0 | 4.07 ^a | 4.24 ^{ab} | 4.39 ^b | 4.24 | 1.8-6.3 | 0.04 | 18.9 | |
| C14:0 | 13.40 ^b | 13.07 ^a | 11.7-14.9 | 11.3-14.5 | 12.91 ^a | 13.31 ^{ab} | 13.44 ^b | 13.2 | 6.9-17.6 | 0.09 | 12.7 | |
| C14:1 | 0.98 ^a | 1.18 ^b | 0.8-1.2 | 0.8-1.5 | 1.00 | 1.14 | 1.06 | 1.08 | 0.3-1.9 | 0.01 | 25.8 | |
| C16:0 | 31.28 ^a | 32.69 ^b | 26.8-35.7 | 27.1-39.1 | 31.24 ^a | 32.45 ^b | 31.94 ^{ab} | 31.9 | 22.1-43.6 | 0.02 | 12.2 | |
| C16:1 | 1.78 ^a | 1.88 ^b | 1.3-2.2 | 1.5-2.6 | 1.76 ^a | 1.87 ^b | 1.84 ^{ab} | 1.83 | 1.1-3.2 | 19.5 | 19.5 | |
| C18:0 | 8.96 | 8.66 | 6.7-10.7 | 6.5-11.9 | 9.30 ^b | 8.54 ^a | 8.75 ^{ab} | 8.82 | 3.9-17.3 | 0.11 | 24.4 | |
| C18:1 | 21.59 | 21.08 | 17.9-25.3 | 17.4-25.4 | 22.23 ^b | 20.90 ^a | 21.10 ^a | 21.3 | 12.4-36.0 | 0.21 | 18.5 | |
| C18:2 _{n-6} | 1.60 | 1.59 | 1.2-2.5 | 1.2-2.0 | 1.56 | 1.58 | 1.63 | 1.59 | 0.7-3.2 | 0.02 | 20.7 | |
| C18:3 _{n-3} | 0.39 | 0.38 | 0.3-0.6 | 0.3-0.5 | 0.41 ^b | 0.39 ^b | 0.36 ^a | 0.39 | 0.2-0.9 | 0.01 | 28.0 | |
| CLA ⁵ | 0.41 ^b | 0.38 ^a | 0.3-0.6 | 0.2-0.5 | 0.42 ^b | 0.37 ^a | 0.40 ^{ab} | 0.39 | 0.1-0.9 | 0.01 | 38.3 | |
| Group of FA ⁶ | | | | | | | | | | | | |
| SFA | 69.12 | 69.49 | 63.2-73.2 | 65.0-74.0 | 68.32 ^b | 69.62 ^a | 69.71 ^a | 69.3 | 53.8-80.1 | 0.22 | 6.1 | |
| UFA | 28.15 | 27.91 | 24.3-33.4 | 23.7-31.5 | 28.86 | 27.67 | 27.78 | 28.0 | 17.7-44.1 | 0.22 | 15.0 | |
| MUFA | 24.92 | 24.76 | 21.4-28.7 | 21.0-28.9 | 25.62 ^b | 24.51 ^a | 24.57 ^a | 24.8 | 15.8-39.8 | 0.20 | 15.5 | |
| PUFA | 3.24 | 3.15 | 2.6-4.7 | 2.5-3.9 | 3.24 | 3.16 | 3.21 | 3.20 | 1.4-6.4 | 0.03 | 20.5 | |
| C4-C15 | 30.58 ^b | 30.08 ^a | 27.8-32.8 | 26.2-32.9 | 29.52 ^a | 30.56 ^{ab} | 30.76 ^b | 30.3 | 16.8-40.8 | 0.19 | 11.7 | |
| C18-C24 | 35.39 | 34.42 | 29.2-41.0 | 27.7-40.1 | 36.45 ^b | 34.19 ^a | 34.55 ^a | 34.9 | 17.8-56.3 | 0.32 | 18.0 | |

^{a,b} Means in breed and parity groups with different superscripts within a row differ ($P < 0.05$); SEM = standard error of the mean; RSD = relative standard deviation (coefficient of variation), in % = [standard deviation/mean].100.

¹C = Czech Fleckvieh; H = Holstein; ^{2#} = number of cows (range in cow means)

³FCM = Fat Corrected Milk (4 %); ⁴ECM = Energy Corrected Milk.

⁵CLA = C18:2 *cis*-9, *trans*-11.

⁶SFA = saturated FA; UFA = unsaturated FA; MUFA = monounsaturated FA; PUFA = polyunsaturated FA;

C4-C14 = sum of C4 to C14 (even); C18-C24 = sum of C18 to C24.

Milk fat composition is widely assessed by its FA groups. Most common evaluation is done by the presence of double bonds. In addition, milk fat could be evaluated according to the number of carbons. In our study, R^2 was evaluated both ways. With regards to the presence of double bonds, the testing of R^2 did not reveal any differences between saturated and unsaturated FA (46.8 vs. 45.9 %, respectively). Similarly, no differences were observed within each animal factor (Table 5). However, the differences were found according to the number of double bonds in the FA chain (45.4 and 39.2 % in monounsaturated and polyunsaturated FA, respectively). The lower value in polyunsaturated FA could probably be explained by a higher effect of feeding factors, which predominantly affected these FA (Coppa et al., 2013). As can be observed from data in Table 5, proportion of polyunsaturated FA was influenced by a variation in the cow individuality (33 %), while that of mono-unsaturated FA was affected by a cow individuality (26 %) and month of lactation (18 %).

The second way of FA classification is partially connected with the physiological pathway of FA synthesis: *de novo* and preformed FA (Vlaeminck et al., 2006; Harvatine et al., 2009). In our work, the differences in the groups classified by a number of carbons were observed. Those showed values of R^2 : 35.8, 54.4 and 44.8 % for the groups with even saturated FA C4 to C14, C16 and C18 to C24, respectively. This was probably related to different heritability for the individual FA. Stoop et al. (2008) reported heritability coefficients of 0.31 to 0.54 and 0.09 to 0.21 for FA with short-/medium- (from C4 to C16) and long-chain (\geq C18), respectively.

Our data proved a statistically significant ($P < 0.001$ and < 0.01) effect of the breed on the individual FA up to C16 (excluding volatile FA) and consequently in the groups C4 to C14. This may suggest a more important effect of animal factors on short- and medium-chain FA than on the long-chain ones.

Significant effects of breed and cow individuality on CLA could be explained by the pathway of its synthesis. According to Mosley et al. (2006), 80 % of CLA is synthesized in the mammary gland. However, the low R^2 of CLA (28.2 %) indicates a lower proportion of animal factors. The prevailing proportion of the variation can be thus affected by feeding ration (e.g. Elgersma, 2015).

The composition of both, the individual FA and their groups in relation to breed, cow individuality and parity is collated in Table 6.

The inter-breed differences do not seem to be too high despite the statistical significance ($P < 0.05$) observed among some individual FA and their groups. From the nutritional point of view, significantly higher proportion (32.7 vs. 31.3 %) of palmitic acid (C16:0) and lower proportion (0.38 vs. 0.41 %) of CLA were determined in milk fat of Holstein cows as compared with that of Czech Fleckvieh breed. However, both the breeds are supposed to have different feeding requirement, varying in milk yield and resulting in different feed intakes.

Cow individuality caused substantial differences within both the breeds. The extent of variability is characterized by wide ranges of FA proportions and relative standard deviations (coefficients of variation). It ranges for the individual FA between 12.2 % for C16:0 and 38.3 % for CLA.

Some reports suggested that breed differences in FA composition could be affected particularly by the fat yield per day (Soyeurt et al., 2007; Stoop et al., 2008). In milk of cattle breeds with considerably low milk yield or fat content there were mostly reported low proportions of saturated FA and thus higher proportion of unsaturated FA (Ferlay et al., 2006; Moioli et al., 2007). Limited differences in the proportions of quantitatively and nutritionally important FA were observed within the breeds with similar fat yield per day (Palladino et al., 2010). The differences could thus be affected by functional type (dairy Holstein vs. dual purpose Czech Fleckvieh) in association with rearing condition factors as seems to be in this work.

With regards to parity, the observed significant differences within FA composition were evident between primiparous and multiparous cows. No significant differences, except for linolenic acid (C18:3 *n*-3), were observed between dairy cows at second and further (≥ 3) lactations. According to the previously published data (e.g. Artegoitia et al., 2013; Stadnik et al., 2013), primiparous cows have nutritionally more desirable FA composition with lower proportion of saturated FA and higher proportion of unsaturated FA and CLA. The differences in the control of tissue mobilisation between multiparous and primiparous cows can be the reason

(Wathes et al., 2007). Both body and mammary gland development is not yet finished in primiparous cows in the post-calving period. This can cause a lower milk production and elevated utilisation of FA from both feeds and body reserves. As Miller et al. (2006) reported, activity of an enzyme synthase in mammary gland, which participates in FA production, is in primiparous cows low during the initial third of lactation and only during the final third of lactation reaches an activity usual in multiparous cows.

The effect of month of lactation is undoubtedly higher than parity. The most extensive changes occur particularly during the initial third of lactation (days 0-100), which was largely studied (Kay et al., 2005; Lake et al., 2007). In the works studying whole lactation period (days 0-305), the researchers (Garnsworthy et al., 2006; Mele et al., 2007) mostly sampled milk with a limited frequency. It could hardly give a true picture of the changes in details.

According to our data (Figure 1), more extensive changes occurred not only during the initial month of lactation, but also during the final third. The changes in the proportion of individual FA depended first of all on the number of carbons in FA chains which indicates the relation to the pathway of FA synthesis. The proportion of FA with C4 to C14 and C16 culminated during the second third of lactation, while FA with ≥ 18 carbons were at their minimum level. Somewhat different course during lactation we observed for CLA with the maximum proportion at the end of lactation period. These observations correspond to a large extent with the results of Craninx et al. (2008) or Micinski et al. (2012).

The obtained differences were probably affected by different metabolic requirements during the lactation period (Lake et al., 2007) and physiological state of dairy cows (Nielsen et al., 2003), which influenced the ratio between *de novo* and preformed FA. Such relation does not depend on diet

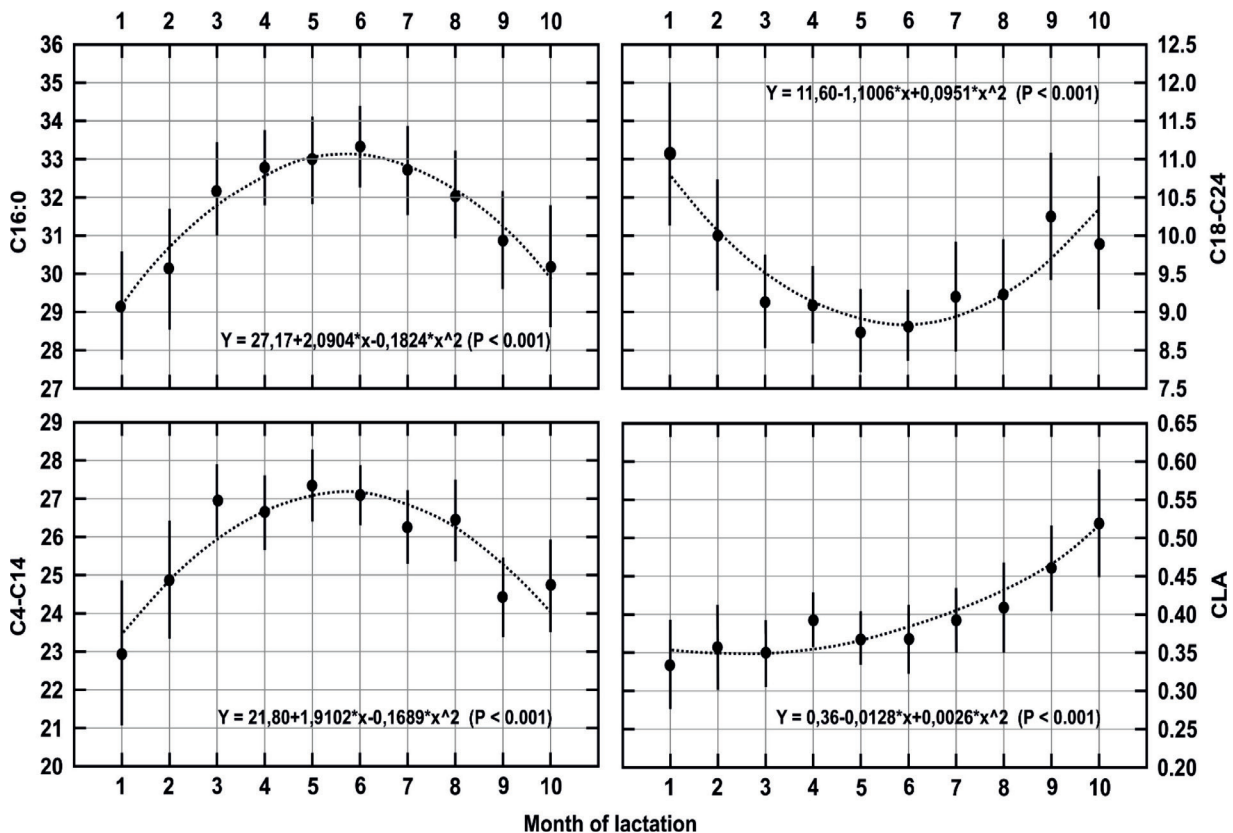


Figure 1. Proportion of fatty acids (FA) in C4-C14 (even), C16:0, conjugated linoleic acid (CLA), and C18-C24 (even) (y-axis: g/100 g of FA) depending on stage of lactation (x-axis: month of lactation); vertical bars denote 0.95 confidence intervals

(Garnsworthy et al., 2006). Negative balance of energy during the initial phase of lactation period results in limited production of *de novo* FA, proportion of which is low during this phase. Similar situation occurs during the finishing lactation period. The proportion of preformed FA can vary between 5 and 20 % in relation to dairy cow physiology.

Conclusion

The results of this study showed considerable effects of four animal factors on milk fat composition of two different breeds under the same rearing conditions. Whilst cows' individuality and month of lactation were the main factors affected the variation in milk fatty acids, the effects of breed and parity were limited. Nevertheless, in particular the frequently discussed influence of the breed on milk fat fatty acid profile is often overlapped with the nutrition effects, whereas it can be considered as pure result here. Cow individuality caused substantial differences within both the breeds, which could be probably affected by different interactions between rearing conditions factors and cow individuality. Lower proportions of *de novo* fatty acids were determined during the initial and final third month of lactation as a possible result of negative energy balance. This could be an influential physiology phenomenon in these lactation periods. According to the above mentioned facts it is obvious that the work can bring some new insights to the current topic of influencing milk fat composition, which is important not only from a nutritional and health point of view, but also from a technological point of view.

Acknowledgment

This study was funded by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project No. QJ1510336), the Grant Agency of University of South Bohemia (Project No. 002/2016/Z), and by the institutional support by decision RO1416.

Zajednički utjecaj pasmine, rednog broja i mjeseca laktacije te utjecaja jedinke na sastav masnih kiselina mliječne masti

Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je objasniti utjecaj četiri čimbenika - pasmine, broja laktacije, utjecaja jedinke (fenotipska varijacija unutar pasmine) i mjeseca laktacije na sastav masnih kiselina (MK) u mliječnoj masti kravljeg mlijeka. Lokalna češka pasmina Fleckvieh uspoređivana je sa svjetski poznatom pasminom holstein. Ukupno je analizirano 357 uzoraka mlijeka prikupljenih tijekom jedne godine od 25 mliječnih krava svake pasmine. Varijacije sastava masnih kiselina uglavnom su bile pod utjecajem jedinke (16-48 %) i mjeseca laktacije (3-18 %), dok je utjecaj pasmine bio ograničen (oko 2 %). Faktori vezani za životinje također su se pokazali statistički značajnim za sastav MK. Značajnije razlike u varijaciji svih čimbenika utvrđene su u odnosu na broj ugljikovih atoma u MK (35,8, 54,4 i 44,8 % za C4 do C14, C16, C18 i C24) te u odnosu na broj dvostrukih veza (45,4 % jednostruko nezasićene i 39,2 % višestruko nezasićene MK). Pri tom nisu utvrđene značajnije razlike u sastavu zasićenih i nezasićenih MK (46,8 %, odnosno 45,9 %) između ispitivanih pasmina krava. Zaključno, s nutritivne točke gledišta bilo bi prikladnije MK klasificirati prema broju ugljikovih atoma, a ne prema dosad uvriježenoj podjeli prema zasićenosti/nezasićenosti.

Ključne riječi: krava, mlijeko, masne kiseline, utjecaj jedinke

References

1. Arnould, V.M.R., Soyeurt, H. (2009): Genetic variability of milk fatty acids. *Journal of Applied Genetics* 50 (1), 29-39. <https://doi.org/10.1007/BF03195649>.
2. Artegoitia, V., Meikle, A., Olazabal, L., Damian, J.P., Adrien, M.L., Mattiauda, D.A., Bermudez, J., Torre, A., Carriquiry, M. (2013): Milk casein and fatty acid fractions in early lactation are affected by nutritional regulation of body condition score at the beginning of the transition period in primiparous and multiparous cows under grazing conditions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97 (5), 919-932. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01338.x>.
3. Coppa, M., Ferlay, A., Chassaing, C., Agabriel, C., Glasser, F., Chilliard, Y., Borreani, G., Barcarolo, R., Baars, T., Kusche, D., Harstad, O.M., Verbic, J., Golecky, J., Martin, B. (2013): Prediction of bulk milk fatty acid composition based on farming practices collected through on-farm surveys. *Journal of Dairy Science* 96 (7), 4197-4211. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6379>.
4. Craninx, M., Steen, A., Van Laar, H., Van Nespen, T., Martin-Tereso, J., De Baets, B., Fievez, V. (2008): Effect of lactation stage on the odd- and branched-chain milk fatty acids of dairy cattle under grazing and indoor conditions. *Journal of Dairy Science* 91 (7), 2662-2677. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0656>.
5. De La Fuente, L.F., Barbosa, E., Carriedo, J.A., Gonzalo, C., Arenas, R., Fresno, J.M., Primitivo, F.S. (2009): Factors influencing variation of fatty acid content in ovine milk. *Journal of Dairy Science* 92 (8), 3791-3799. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2151>.
6. DLG-Futterwerttabellen, Wiederkäuer. (1997): 7th Ed., Frankfurt am Main: DLG-Verlag. 212 pp. ISBN 3-7690-0547-3 (in German).
7. Elgersma, A. (2015): Grazing increases the unsaturated fatty acid concentration of milk from grass-fed cows: A review of the contributing factors, challenges and future perspectives. *European Journal of Lipid Science and Technology* 117 (9), 1345-1369. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400469>.
8. Elgersma, A., Tamminga, S., Ellen, G. (2006): Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology* 131 (3-4), 207-225. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.012>.
9. Ferlay, A., Martin, B., Pradel, P., Coulon, J.B., Chilliard, Y. (2006): Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentaise and Montbeliarde cow breeds. *Journal of Dairy Science* 89 (10), 4026-4041. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72446-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72446-8).
10. Garnsworthy, P.C., Masson, L.L., Lock, A.L., Mottram, T.T. (2006): Variation of milk citrate with stage of lactation and de novo fatty acid synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89 (5), 1604-1612. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72227-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72227-5).
11. German, J.B., Gibson, R.A., Krauss, R.M., Nestel, P., Lammarche, B., van Staveren, W.A., Steijns, J.M., de Groot, L., Lock, A.L., Destailats, F. (2009): A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *European Journal of Nutrition* 48 (4), 191-203. <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0002-5>.
12. Harvatine, K.J., Boisclair, Y.R., Bauman, D.E. (2009): Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal* 3 (1), 40-54. <https://doi.org/10.1017/s1751731108003133>.
13. Jensen, R.G. (2002): The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science* 85 (2), 295-350. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74079-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4).
14. Kalac, P., Samkova, E. (2010): The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science* 55 (12), 521-537.
15. Kay, J.K., Weber, W.J., Moore, C.E., Bauman, D.E., Hansen, L.B., Chester-Jones, H., Crooker, B.A., Baumgard, L.H. (2005): Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 88 (11), 3886-3893. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73074-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73074-5).
16. Kelsey, J.A., Corl, B.A., Collier, R.J., Bauman, D.E. (2003): The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86 (8), 2588-2597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73854-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73854-5).
17. Kliem, K.E., Shingfield, K.J. (2016): Manipulation of milk fatty acid composition in lactating cows: Opportunities and challenges. *European Journal of Lipid Science and Technology* 118 (11), 1661-1683. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400543>.
18. Kris-Etherton, P.M., Griel, A.E., Psota, T.L., Gebauer, S.K., Zhang, J., Etherton, T.D. (2005): Dietary stearic acid and risk of cardiovascular disease: Intake, sources, digestion, and absorption. *Lipids* 40 (12), 1193-1200. <https://doi.org/10.1007/s11745-005-1485-y>.
19. Lake, S.L., Weston, T.R., Scholljegerdes, E.J., Murrrieta, C.M., Alexander, B.M., Rule, D.C., Moss, G.E., Hess, B.W. (2007): Effects of postpartum dietary fat and body condition score at parturition on plasma, adipose tissue, and milk fatty acid composition of lactating beef cows. *Journal of Animal Science* 85 (3), 717-730. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-353>.
20. Lock, A.L., Bauman, D.E. (2004): Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39 (12), 1197-1206.
21. Lopez-Huertas, E. (2010): Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological Research* 61 (3), 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.10.007>.

22. Mele, M., Conte, G., Castiglioni, B., Chessa, S., Macciotta, N.P.P., Serra, A., Buccioni, A., Pagnacco, G., Secchiari, P. (2007): Stearoyl-Coenzyme A desaturase gene polymorphism and milk fatty acid composition in Italian Holsteins. *Journal of Dairy Science* 90 (9), 4458-4465. <https://doi.org/10.3168/Jds.2006-617>.
23. Micinski, J., Pogorzelska, J., Kalicka, A., Kowalski, I.M., Szarek, J. (2012): Content of selected fatty acids in milk from Polish Holstein-Friesian cows with regard to their age and stage of lactation. *Zywnosc-Nauka Technologia Jakosc* 19 (4), 136-150.
24. Miller, N., Delbecchi, L., Petitclerc, D., Wagner, G.F., Talbot, B.G., Lacasse, P. (2006): Effect of stage of lactation and parity on mammary gland cell renewal. *Journal of Dairy Science* 89 (12), 4669-4677. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72517-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72517-6).
25. Moioli, B., Contarini, G., Avalli, A., Catillo, G., Orru, L., De Matteis, G., Masoero, G., Napolitano, F. (2007): Effect of stearoyl-coenzyme A desaturase polymorphism on fatty acid composition of milk. *Journal of Dairy Science* 90 (7), 3553-3558. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-855>.
26. Mosley, E.E., Shafii, B., Moate, P.J., McGuire, M.A. (2006): cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *Journal of Nutrition* 136 (3), 570-575.
27. Nielsen, H.M., Friggens, N.C., Lovendahl, P., Jensen, J., Ingvarthsen, K.L. (2003): Influence of breed, parity, and stage of lactation on lactational performance and relationship between body fatness and live weight. *Livestock Production Science* 79 (2-3), 119-133. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00146-X](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00146-X).
28. Palladino, R.A., Buckley, F., Prendiville, R., Murphy, J.J., Callan, J., Kenny, D.A. (2010): A comparison between Holstein-Friesian and Jersey dairy cows and their F₁ hybrid on milk fatty acid composition under grazing conditions. *Journal of Dairy Science* 93 (5), 2176-2184. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2453>.
29. Palmquist, D.L., Beaulieu, A.D., Barbano, D.M. (1993): Feed and animal factors influencing milk-fat composition. *Journal of Dairy Science* 76 (6), 1753-1771.
30. Poulsen, N.A., Gustavsson, F., Glantz, M., Paulsson, M., Larsen, L.B., Larsen, M.K. (2012): The influence of feed and herd on fatty acid composition in 3 dairy breeds (Danish Holstein, Danish Jersey, and Swedish Red). *Journal of Dairy Science* 95 (11), 6362-6371. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5820>.
31. Samkova, E., Pesek, M., Spicka, J., Pelikanova, T., Hanus, O. (2009): The effect of feeding diets markedly differing in the proportion of grass and maize silages on bovine milk fat composition. *Czech Journal of Animal Science* 54 (3), 93-100.
32. Samkova, E., Spicka, J., Pesek, M., Pelikanova, T., Hanus, O. (2012): Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science* 42 (2), 83-100. <https://doi.org/10.4314/sajas.v42i2.1>.
33. Schwendel, B.H., Wester, T.J., Morel, P.C.H., Tavendale, M.H., Deadman, C., Shadbolt, N.M., Otter, D.E. (2015): Invited review: Organic and conventionally produced milk - An evaluation of influence factors on milk composition. *Journal of Dairy Science* 98 (4), 2831-2831. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-98-4-2831>.
34. Sojak, L., Blasko, J., Kubinec, R., Gorova, R., Ad-dova, G., Ostrovsky, I., Margetin, M. (2013): Variation among individuals, breeds, parities and milk fatty acid profile and milk yield of ewes grazed on pasture. *Small Ruminant Research* 109 (2-3), 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.017>.
35. Sommer, A., Ceresnakova, Z., Frydrych, Z., Kralik, O., Kralikova, Z., Krasa, A., Pajtas, M., Petrikovic, P., Pozdisek, J., Simek, M., Trinacty, J., Vencl, B., Zeman, L. (1994): Nutrient requirements and tables of nutrient value of ruminant feeds. (Potřeba živin a tabulky pro přežvýkavce). 1st Ed. Pohorelice: CZS VUVZ. 198 pp. ISBN 80-901598-1-8 (in Czech).
36. Soyeurt, H., Dardenne, P., Gillon, A., Croquet, C., Vanderick, S., Mayeres, P., Bertozzi, C., Gengler, N. (2006): Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science* 89 (12), 4858-4865. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72534-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72534-6).
37. Soyeurt, H., Gillon, A., Vanderick, S., Mayeres, P., Bertozzi, C., Gengler, N. (2007): Estimation of heritability and genetic correlations for the major fatty acids in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 90 (9), 4435-4442. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0054>.
38. Stadnik, L., Duchacek, J., Okrouhla, M., Ptacek, M., Beran, J., Stupka, R., Zita, L. (2013): The effect of parity on the proportion of important healthy fatty acids in raw milk of Holstein cows. *Mljekarstvo* 63 (4), 195-202.
39. Stoop, W.M., van Arendonk, J.A.M., Heck, J.M.L., van Valenberg, H.J.F., Bovenhuis, H. (2008): Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science* 91 (1), 385-394. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0181>.
40. Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A.R.J., Fonseca, A.J.M., Dewhurst, R.J. (2006): Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology* 131 (3-4), 389-417. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.017>.
41. Vranjes, A.P., Krajcinovic, M., Kecman, J., Trivunovic, S., Pejanovic, R., Krajcinovic, G., Macak, G. (2010): Comparison of fatty acid composition in conventional and organic milk. *Mljekarstvo* 60 (1), 59-66.
42. Wathes, D.C., Cheng, Z., Bourne, N., Taylor, V.J., Coffey, M.P., Brotherstone, S. (2007): Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domestic Animal Endocrinology* 33 (2), 203-225. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2006.05.004>.

Příloha 3:

Kala, R., Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J., Hanuš, O. 2018. Nutritionally desirable fatty acids including CLA of cow's milk fat explained by animal and feed factors. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66(1): 69-76. (**Jsc**)

NUTRITIONALLY DESIRABLE FATTY ACIDS INCLUDING CLA OF COW'S MILK FAT EXPLAINED BY ANIMAL AND FEED FACTORS

Robert Kala¹, Eva Samková¹, Jana Koubová¹, Lucie Hasoňová¹,
Martin Kváč², Tamara Pelikánová³, Jiří Špička³, Oto Hanuš⁴

¹Department of Food Biotechnology and Agricultural Products Quality, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Branisovska 1645/31a, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic

²Department of Animal Husbandry Sciences, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Branisovska 1645/31a, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic

³Department of Applied Chemistry, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Branisovska 1645/31a, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic

⁴Dairy Research Institute, Ltd., Ke Dvoru 791/12a, 160 00 Prague, Czech Republic

Abstract

KALA ROBERT, SAMKOVÁ EVA, KOUBOVÁ JANA, HASOŇOVÁ LUCIE, KVÁČ MARTIN, PELIKÁNOVÁ TAMARA, ŠPIČKA JIŘÍ, HANUŠ OTO. 2018. Nutritionally Desirable Fatty Acids Including Cla of Cow'S Milk Fat Explained by Animal and Feed Factors. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66(1): 69–76.

This study evaluated the effects of four factors (breed, parity, month of lactation and feeding ration) on the total explained variation (R^2) determining composition of nutritionally important fatty acids. Individual milk samples were collected four times over an entire year (March, June, September, and December, respectively) on a conventional farm from two breeds: Czech Fleckvieh (dual-purpose, local) and Holstein (dairy, worldwide). In total, 145 samples (36; 38; 35 and 36, respectively) were analysed. Within the R^2 , feeding ration and month of lactation were the main factors affecting milk fatty acids composition, whereas breed and parity showed a low effect. A high percentage of the R^2 was observed in rumenic acid (52%), for example, whereas a low percentage was observed in both palmitic acid (30%) and oleic acid (30%). This may be due to intra-breed variability affected by different genetic predisposition of each cows, their performance or individual response to changes in feeding ration.

Keywords: cows, milk fatty acid, rumenic acid, breed, lactation, feeding ration

INTRODUCTION

Most of unsaturated fatty acids (FA) are more desirable in human nutrition than their saturated counterparts. The former group is subdivided into mono- and polyunsaturated FA. Moreover, polyunsaturated FA are nutritionally classified as n-6 and n-3 groups, according to the position of first double bond, numbered from the methyl end of carbon chain. The major unsaturated FA are non-essential oleic acid (18:1 *cis*-9) and essential linoleic (18:2 n-6) and alpha-linolenic acids (18:3 n-3), which have all-*cis* double bonds (Jensen, 2002).

Conjugated linoleic acid (CLA) is a group term for a series of conjugated dienoic positional and geometrical isomers of linoleic acid, which are relatively more abundant in the milk and fat tissue of ruminants (Dhiman *et al.*, 2005). In CLA, the most important isomer is *cis*-9, *trans*-11-linoleic acid (RA, rumenic acid). It forms about 75–90% of all CLA isomers (Kramer *et al.*, 1998) and has putative health benefit (Palmquist *et al.*, 2005). RA in milk fat is primarily biosynthesized from monounsaturated vaccenic acid (18:1 *trans*-11) by the activity of the enzyme Δ^9 -desaturase in mammary gland. According to Mosley *et al.* (2006), this pathway

produces about 80% of RA. The health effects of individual CLA isomers have been studied since the 1980s. RA has been associated with the prevention of a number of diseases, including cardiovascular diseases, obesity and diabetes (e.g. Riediger *et al.*, 2009; Sailas and Spener, 2009). However, most of the positive effects of CLAs have been observed in animals, and the evidence

from clinical studies in humans is less convincing (Gebauer *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015).

The fatty acid composition of bovine milk fat is affected by animal factors (Samkova *et al.*, 2012; Schwendel *et al.*, 2015) and feed factors (Chilliard *et al.*, 2001; Elgersma, 2015). For FA with up to 16 carbons, animal factors are expected to have a greater effect due to moderate coefficients of

I: Distribution of milk samples according to breed, parity and month of lactation.

| | Breed | | Parity | | | Month of lactation | | | Days in milk |
|------------------|--------|----|--------|----|-----|--------------------|-----|-----|--------------|
| | CF | H | 1 | 2 | ≥ 3 | 1-4 | 5-7 | ≥ 8 | Mean ± SD |
| March | 18 | 18 | 12 | 15 | 9 | 19 | 9 | 8 | 128 ± 73 |
| June | 19 | 19 | 12 | 16 | 10 | 11 | 16 | 11 | 171 ± 81 |
| September | 18 | 17 | 9 | 16 | 10 | 10 | 11 | 14 | 177 ± 86 |
| December | 18 | 18 | 11 | 10 | 15 | 13 | 11 | 12 | 162 ± 102 |
| Total | 73 | 72 | 44 | 57 | 44 | 53 | 47 | 45 | |
| P | 0.9992 | | 0.6521 | | | 0.2780 | | | 0.0684 |

P = probability, χ^2 for breed, parity and month of lactation, SD = standard deviation,

CF = Czech Fleckvieh, H = Holstein, Month of lactation: 1-4 (10-120 days in milk), 5-7 (121-210), 8-10 (211-345).

II: Intake of matter, ingredient and chemical composition of feeding rations.

| Item | March | June | September | December |
|---|-------|------|-----------|----------|
| Intake (kg/day) | | | | |
| Fresh matter | 34.4 | 35.3 | 34.1 | 36.5 |
| Dry matter (DM) | 17.5 | 16.5 | 15.8 | 17.9 |
| Ingredient composition (% of DM) | | | | |
| Maize silage | 39.0 | 24.3 | 19.5 | 28.1 |
| Grass silage | 24.5 | 22.2 | 21.6 | 26.8 |
| CCM (corn cob meal silage) | - | - | - | 12.4 |
| Fresh lucerne (<i>Medicago sativa</i>) | - | 11.4 | - | - |
| Fresh maize | - | - | 18.4 | - |
| Hay | 2.6 | 3.2 | 2.8 | 7.0 |
| Mashed oats | 4.9 | 5.3 | 5.4 | 4.9 |
| Production feed mixture (PM) | 27.9 | 32.5 | 31.1 | 19.8 |
| Minerals and vitamins mixture (MM) | 1.1 | 1.1 | 1.2 | 1.0 |
| Chemical composition | | | | |
| DM (g) | 443 | 399 | 400 | 441 |
| CP (g/kg of DM) | 146 | 160 | 153 | 146 |
| nXP | 147 | 151 | 150 | 146 |
| Crude fat | 30.3 | 27.4 | 26.3 | 27.9 |
| Crude fibre | 167 | 159 | 176 | 166 |
| NE_L (MJ/kg) | 6.36 | 6.48 | 6.47 | 6.36 |

PM = mixture consisted of 20 (32; 9), 20 (37; 30), 12 (0; 0), 0 (0; 14), 20 (28; 7), 25 (0; 37) and 3 (3; 3) % (w/w) of barley, wheat, oats, lupin (*Lupinus albus*), extracted soybean meal, extracted rapeseed meal, and a mixture of minerals and vitamins in March (June – September; December), MM = mixture consisted per kg: 210, 30, 100, 70 g of calcium, phosphorus, sodium, magnesium, respectively; 750, 30, 80, 2,730 mg of copper, selenium, iodine, vitamin E, respectively; 500,000 and 75,000 IU of vitamin A and D₃, respectively, CP = N × 6.25, nXP = protein utilised in the intestine (DLG-Futterwerttabellen, 1997), NE_L = net energy for lactation (Sommer *et al.*, 1994).

heritability (Schennink *et al.*, 2008; Stoop *et al.*, 2008). Conversely, feed factors have the greatest effect when the carbon chain length is greater than 18 (Samkova *et al.*, 2014). For instance, CLA content can vary between 0.34 and 3.08% of total FA depending especially on feeding (Dhiman *et al.*, 2005; Elgersma, 2015). The highest levels are observed under feeding with fresh forage (Collomb *et al.*, 2002), whereas breed and parity show lower effects (Stanton *et al.*, 1997).

Our work aimed at evaluating the extent of variability of four factors (breed, parity, month of lactation and feeding ration) affecting proportions of nutritionally desirable FA including RA in milk fat of dairy cows reared under farm management practices that are typical in the Czech Republic.

MATERIALS AND METHODS

Ethical committee hereby declares that experiments performed in the present study are according Act No 246/1992 Coll., on the protection of animals against cruelty of the Czech Republic. With regard to the type of study, no special permission is needed.

The study was carried out on a farm (420 meters above sea level), in the region of South Bohemia, Czech Republic. On the farm, cows of two breeds, Czech Fleckvieh (dual-purpose, local) and Holstein (dairy, worldwide) were housed together and milked twice a day. Individual milk samples were collected within the afternoon regular testing of milk efficiency in each of four months: March, June, September and December. Milk samples were taken with regard to breed, parity and month of lactation to obtain a balanced set of samples (Tab. I).

All cows were fed under the same conditions. Total mixed rations were formulated according to the German recommendations for ruminant feeding (DLG-Futterwerttabellen, 1997) and calculated for a mean live weight of 650 kg, milk fat content of 4.2% and milk protein content of 3.5%. Total mixed rations consisted of components widely used in the recent Czech farming practice (Tab. II). All feeding rations were fed at least for three weeks before sampling.

Milk samples were cooled (6 °C) immediately after collection and transported to the laboratory in a cool box. Fat, protein and lactose contents were determined spectrophotometrically using a MilcoScan 4000 apparatus (Foss Electric, Hillerød,

Denmark). This instrument was regularly calibrated according to results of relevant reference methods (for fat content according to Röse-Gottlieb method, for crude protein content according to Kjeldahl method and for lactose monohydrate content according to polarimetric method) and took part in proficiency testing with good results. This was carried out in accordance with instrument operation manual. Milk fat was extracted with petroleum ether from freeze-dried milk samples. FA in isolated fat were reesterified to their methyl esters with a methanolic solution of potassium hydroxide. Methyl esters of FA were determined by a gas chromatographic method (GLC) using a Varian 3300 apparatus (Varian Techtron, USA) under conditions described in Tab. III.

The identification of FA was carried out using analytical standards (Supelco, USA). In total, 64 FA were observed, 50 of which were identified. The proportions of individual FA were calculated from the ratio of their peak area to the total area of all the observed FA.

Data were analysed by the program Statistica CZ 12 (Statsoft CR) using a general linear model with fixed effects of breed, parity, month of lactation and feeding ration:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + P_j + MOL_k + F_l + \varepsilon_{ijkl}$$

where:

Y_{ijkl} = dependent variables: milk yield (kg/d); fat, protein and lactose content (g/100 g); proportion of individual milk FA (g/100g of total FA); and groups of FA (g/100 g of total FA),

μ = mean,

B_i = breed (i = Czech Fleckvieh, Holstein),

P_j = parity (j = 1, 2, ≥ 3),

MOL_k = months of lactation (k = < 30 days in milk (1); 31-60 (2); 61-90 (3); 91-120 (4); 121-150 (5); 151-180 (6); 181-210 (7); 211-240 (8); 241-270 (9); > 271 (10),

F_l = feeding ration (l = March, June, September and December),

ε_{ijkl} = residual error.

Tukey HSD test for unequal N was used for group comparisons (*post hoc* test).

Total explained variation (R^2 , coefficient of determination) and variation explained by

III: Parameters of chromatographic analysis of fatty acids.

| Parameter | Value |
|-------------|---|
| Column | CP-Select CB for FAME, 50 m × 0.25 mm, 0.25 µm thickness |
| Detector | FID |
| Temperature | column 55 °C for 5 min, 40 °C/min up to 170 °C, 2.0 °C/min up to 196 °C, 10.0 °C/min up to 210 °C |
| injection | 250 °C |
| detector | 250 °C |
| Helium flow | 1.8 ml/min |
| Injection | 1 µl, split 10 |

individual effects (factors variation) were calculated using sum of squares and were expressed as a percentage. R^2 was defined as $[(1 - (\text{residual sum of squares} / \text{total sum of squares})) \cdot 100]$. Factor variation was defined as $[(\text{sum of squares of individual effects} / \text{total sum of squares}) \cdot 100]$.

RESULTS AND DISCUSSION

A general linear model, comprising breed, parity, month of lactation and feeding ration, was used to evaluate the variability of selected FA of bovine milk fat, groups of FA and their mutual relations. Using this model, the highest levels of R^2 were 65% and 52% for vaccenic acid and RA, respectively (Tab. IV). Within the observed groups, the value of R^2 for branched-chain FA was 54%. The high R^2 of selected FA were due, in particular, to high variability in feeding ration, with the exception of branched chain FA, where the value of R^2 was primarily affected by the variability in month of lactation. The major contribution of month of lactation to

the R^2 in animal factors was previously reported by Kelsey *et al.* (2003).

Even though our work was carried out under common farm management conditions, we observed a significant effect of feeding ration on the R^2 . A comparable effect was reported from exact feeding experiments (e.g. Leiber *et al.*, 2005; Wiking *et al.*, 2010).

The high explained variation in vaccenic acid and RA, as affected by the feeding ration, is probably due to feeding with fresh forage, lucerne and maize. However, previous studies found that, compared to grazing (Elgersma, 2015) or organic farming conditions (O'Donnell *et al.*, 2010), partial feeding of housed dairy cows with fresh forage had only a limited effect on the proportion of nutritionally desirable FA in milk fat (Leiber *et al.*, 2005). This could explain the low level of variation in oleic acid (6%) and the group of monounsaturated FA (5%). The higher level of explained variation in n-3 polyunsaturated FA (32%), compared to the n-6 polyunsaturated FA group (25%), was probably

IV: Distribution of total explained variation (R^2) for milk yield (kg/d), fat, protein and lactose content (g/100 g), fat corrected milk (FCM 4.0) and energy corrected milk (ECM) (kg/d), individual fatty acids (FA), and groups of FA (g/100 g of FA) in general linear model involving animal and feed factors.

| | Factors variation ¹ | | | | | | | | R^2 | |
|--------------------------------------|--------------------------------|-----|----------------|----|--------------------|-----|----------------|-----|-------|-----|
| | Breed | | Parity | | Month of lactation | | Feeding ration | | | |
| | % | P | % | P | % | P | % | P | % | P |
| Milk yield and composition | | | | | | | | | | |
| Milk yield | 5 | *** | 2 | † | 37 | *** | 1 | ns | 45 | *** |
| Fat content | 1 | ns | 0 [#] | ns | 12 | * | 22 | *** | 35 | *** |
| Protein content | 3 | * | 1 | ns | 32 | *** | 4 | † | 39 | *** |
| Lactose content | 0 [#] | ns | 3 | † | 31 | *** | 1 | ns | 35 | *** |
| FCM 4.0 | 4 | ** | 2 | ns | 33 | *** | 2 | ns | 41 | *** |
| ECM | 4 | ** | 1 | ns | 32 | *** | 2 | ns | 39 | *** |
| Individual FA | | | | | | | | | | |
| 16:0 | 2 | † | 3 | † | 15 | ** | 10 | *** | 30 | *** |
| 18:1 <i>cis</i> -9 | 0 [#] | ns | 3 | † | 21 | *** | 6 | * | 30 | *** |
| 18:1 <i>trans</i> -11 | 0 [#] | ns | 1 | ns | 9 | *** | 55 | *** | 65 | *** |
| 18:2 n-6 | 0 [#] | ns | 0 [#] | ns | 10 | † | 15 | *** | 25 | *** |
| 18:3 n-3 | 0 [#] | ns | 1 | ns | 6 | ns | 27 | *** | 34 | *** |
| 18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 | 2 | * | 3 | * | 7 | * | 40 | *** | 52 | *** |
| Group of FA² | | | | | | | | | | |
| C4-14 | 0 [#] | ns | 3 | ns | 13 | ** | 12 | *** | 28 | *** |
| MUFA | 0 [#] | ns | 2 | ns | 21 | *** | 5 | * | 30 | *** |
| BCFA | 0 [#] | ns | 4 | ** | 33 | *** | 17 | *** | 54 | *** |
| PUFA n-6 | 0 [#] | ns | 0 [#] | ns | 6 | ns | 25 | *** | 32 | *** |
| PUFA n-3 | 0 [#] | ns | 0 [#] | ns | 6 | ns | 32 | *** | 39 | *** |

P = probability, ns = not significant, † = $P < 0.10$, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$, # = % of factors variation < 0.5 ; 1 Factors variation = proportion (%) of individual factors variation accounted for by R^2 (coefficient of determination); 2 C4-14 = saturated FA, even, MUFA = monounsaturated FA, *cis* isomers, BCFA = branched chain FA, PUFA n-6 = polyunsaturated FA n-6, PUFA n-3 = polyunsaturated FA n-3.

caused by feeding with fresh lucerne. According to Wiking *et al.* (2010) legumes have a greater effect on the n-3 group than the n-6 group.

It is also evident that different FA formation pathways have a considerable effect on factors variation. According to Bauman and Grinari (2003), FA with 4 to 14 carbons (C4-14) and about 50% of palmitic acid (16:0) are synthesised *de novo* in the mammary gland, whereas FA with ≥ 18 carbons are transported to the mammary gland from feed as unesterified FA or as preformed FA. Microbial processes in the rumen are major factors affecting odd- and branched-chain FA (Vlaeminck *et al.*, 2006).

In our study, the contribution of feeding ration to the R² in most of the preformed FA was greater than that of the three animal factors combined. For example, 18:2 n-6 15% (feeding ration) vs. 10% (animal factors), 18:3 n-3 27% vs. 7%, n-6 polyunsaturated FA 25% vs. 6%, and n-3 polyunsaturated FA 32% vs. 6%. This contrasts with FA groups formed *de novo*, where animal factors

contributed more to the R² than feeding ration: for example, C4-14 group 16% (animal factors) vs. 12% (feeding ration). This is consistent with previous works showing that coefficients of heritability are affected by the number of carbons in FA chains (Stoop *et al.*, 2008).

In agreement with previous work, we found interbreed variability of FA in milk fat. Significant differences ($P < 0.05$) were observed in palmitic acid (30.5 and 31.7% for Czech Fleckvieh and Holstein, respectively), or RA (0.42% and 0.38%) – Tab. V. The differences between the breeds could be partially caused by different fat corrected milk (FCM) 19.3 and 22.0 kg for Czech Fleckvieh and Holstein, respectively ($P < 0.05$). Performance probably also affects differences caused by parity. Lake *et al.* (2007) reported differences in FA proportion particularly between multiparous and primiparous cows. Primiparous cows have a nutritionally more desirable FA composition. This was observed also

V: Milk yield, fat corrected milk (FCM 4.0) and energy corrected milk (ECM) (kg/d), fat, protein, and lactose content (g/100 g), individual fatty acids (FA), and groups of FA (g/100 g of FA) depending on breed, parity and feeding ration.

| Number of milk samples | Breed | | Parity | | | Feeding ration | | | | Total | | | |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------|-----------|------|-----|
| | CF | H | 1 | 2 | > 3 | III | VI | IX | XII | Mean | Min.-Max. | SEM | RSD |
| | 73 | 72 | 44 | 57 | 44 | 36 | 38 | 35 | 36 | | | | |
| Milk yield and composition | | | | | | | | | | | | | |
| Milk yield | 18.7 ^a | 22.2 ^b | 18.8 ^a | 19.9 ^{ab} | 22.6 ^b | 22.1 ^b | 20.4 ^{ab} | 18.0 ^a | 21.0 ^{ab} | 20.4 | 4.5-43.3 | 0.61 | 36 |
| Fat content | 4.22 | 4.02 | 4.11 | 4.20 | 4.03 | 3.58 ^a | 4.30 ^{bc} | 4.80 ^c | 3.77 ^{ab} | 4.12 | 2.17-6.60 | 0.07 | 21 |
| Protein content | 3.62 ^b | 3.49 ^a | 3.57 | 3.56 | 3.53 | 3.36 ^a | 3.61 ^b | 3.63 ^b | 3.62 ^b | 3.55 | 2.51-4.74 | 0.03 | 11 |
| Lactose content | 4.78 | 4.75 | 4.84 | 4.75 | 4.73 | 4.84 | 4.76 | 4.74 | 4.73 | 4.77 | 3.30-5.40 | 0.03 | 7 |
| FCM 4.0 | 19.3 ^a | 22.0 ^b | 19.1 ^a | 20.1 ^{ab} | 22.8 ^b | 20.5 | 21.3 | 19.9 | 20.8 | 20.6 | 3.7-42.0 | 0.58 | 33 |
| ECM | 21.2 ^a | 24.1 ^b | 21.0 ^a | 22.0 ^{ab} | 25.0 ^b | 22.6 | 23.2 | 21.4 | 23.3 | 22.6 | 4.1-47.0 | 0.62 | 33 |
| Individual FA | | | | | | | | | | | | | |
| 16:0 | 30.5 ^a | 31.7 ^b | 30.1 | 31.4 | 31.6 | 31.3 ^b | 32.1 ^b | 32.0 ^b | 29.0 ^a | 31.0 | 23.2-39.0 | 0.30 | 11 |
| 18:1 <i>cis</i>-9 | 19.2 | 18.6 | 19.8 | 18.6 | 18.4 | 18.7 ^{ab} | 17.7 ^a | 20.1 ^b | 19.2 ^{ab} | 18.9 | 13.1-30.8 | 0.29 | 18 |
| 18:1 <i>trans</i>-11 | 1.55 | 1.49 | 1.57 | 1.54 | 1.45 | 1.20 ^a | 1.71 ^b | 1.94 ^c | 1.23 ^a | 1.52 | 0.89-2.97 | 0.04 | 28 |
| 18:2 n-6 | 1.69 | 1.66 | 1.68 | 1.67 | 1.68 | 1.58 ^{ab} | 1.80 ^{bc} | 1.51 ^a | 1.81 ^c | 1.68 | 0.67-3.20 | 0.03 | 20 |
| 18:3 n-3 | 0.44 | 0.43 | 0.45 | 0.45 | 0.40 | 0.46 ^{bc} | 0.52 ^c | 0.43 ^b | 0.33 ^a | 0.43 | 0.16-0.91 | 0.01 | 30 |
| 18:2 <i>cis</i>-9, <i>trans</i>-11 | 0.42 ^b | 0.38 ^a | 0.44 ^b | 0.36 ^a | 0.41 ^{ab} | 0.40 ^b | 0.41 ^b | 0.26 ^a | 0.51 ^c | 0.40 | 0.10-0.80 | 0.01 | 35 |
| Group of FA¹ | | | | | | | | | | | | | |
| C4-14 | 25.6 | 25.6 | 24.8 ^a | 25.5 ^{ab} | 26.5 ^b | 25.9 ^{ab} | 25.7 ^{ab} | 23.5 ^a | 27.0 ^b | 25.6 | 14.8-34.7 | 0.31 | 14 |
| MUFA | 22.5 | 22.3 | 23.1 | 22.2 | 21.9 | 22.3 ^{ab} | 21.2 ^a | 23.6 ^b | 22.6 ^{ab} | 22.4 | 16.7-34.8 | 0.28 | 15 |
| BCFA | 2.49 | 2.44 | 2.53 ^b | 2.54 ^b | 2.32 ^a | 2.47 ^b | 2.60 ^b | 2.58 ^b | 2.22 ^a | 2.47 | 1.45-3.31 | 0.03 | 13 |
| PUFA n-6 | 1.98 | 1.91 | 1.94 | 1.94 | 1.95 | 1.90 ^b | 2.12 ^b | 1.60 ^a | 2.13 ^b | 1.94 | 0.69-3.91 | 0.04 | 22 |
| PUFA n-3 | 0.56 | 0.53 | 0.56 | 0.55 | 0.52 | 0.59 ^b | 0.66 ^b | 0.45 ^a | 0.46 ^a | 0.54 | 0.16-1.10 | 0.01 | 30 |

^{a, b, c, d} = means in breed and parity groups with different superscripts within a row differ at $P < 0.05$, in feeding ration groups at $P < 0.01$, CF = Czech Fleckvieh, H = Holstein, III, VI, IX, XII = feeding rations in March, June, September, and December – see Tab. II, SEM = standard error of the mean, RSD = relative standard deviation (%) = [standard deviation/mean].100;

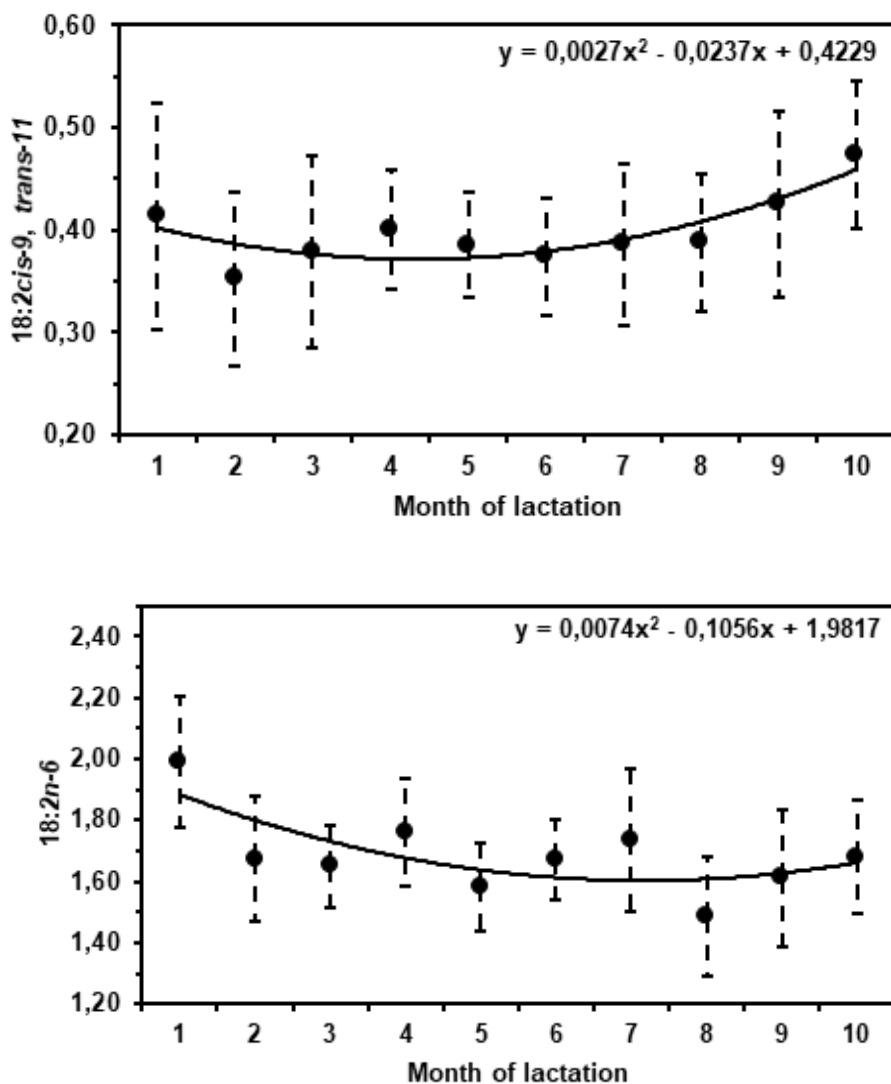
¹ C4-14 = saturated FA, even, MUFA = monounsaturated FA, *cis* isomers, BCFA = branched chain FA, PUFA n-6 = polyunsaturated FA n-6, PUFA n-3 = polyunsaturated FA n-3.

in our work. However, the differences were mostly statistically insignificant.

A more desirable FA composition was observed in cows at the beginning of lactation, i.e. between days 10 and 30. The proportions of palmitic acid and the C4-14 group were lower (27.7% and 22.6%, respectively) than during the late period of lactation; for instance, between days 211 and 240 (33.3 and 26.6%, respectively). In contrast, the proportions of oleic acid (18:1 *cis*-9), linoleic acid (18:2 *n*-6), monounsaturated FA and *n*-6 polyunsaturated FA were higher between days 10 and 30 (23.4, 1.99, 26.5 and 2.27%, respectively) than between days 211 and 240 (17.2, 1.48, 21.0 and 1.75%, respectively) – data not given in the table. The proportion of linoleic acid is elevated during the early lactation, while that of RA is maximal at the end of lactation (Fig. 1).

As mentioned above, some differences in FA composition could be affected by breed,

cow individuality, parity or month of lactation. Nevertheless, composition of feeding ration is the main factor determining the content of saturated and unsaturated FA (Kalac and Samkova, 2010). Within the common management of cow feeding, farmers strive to prepare balanced feeding rations (Slots *et al.*, 2009) and only adopt changes in feed components that give rise to changes in milk fat FA composition. In our work, the lowest proportion of palmitic acid (29.0%) was associated with the highest proportion of rape seed in the feeding ration, oleic acid proportion increased during feeding of fresh maize (up to 20.1%), and the highest proportion of alpha-linolenic acid (0.52%) and *n*-3 polyunsaturated FA (0.66%) was observed after feeding of fresh lucerne.



1: Proportion of 18:2 *n*-6, and 18:2 *cis*-9, *trans*-11 (y-axis: g/100 g of fatty acids) depending on month of lactation (x-axis); vertical bars denote 0.95 confidence intervals.

CONCLUSION

In conclusion, the fatty acid composition of milk fat in milked cows under common farm management conditions, particularly the presence of nutritionally desirable polyunsaturated fatty acids, is mainly affected by changes in feeding ration. The four tested factors – breed, parity, month of lactation and feeding ration – explained only a limited part of total variation. We therefore suppose that the unexplained variability is due to the individuality of cows (genetic predisposition) in their reaction to changes in feed composition. It therefore appears necessary to continue to study this topic.

Acknowledgements

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, project No. QJ1510336 and the Grant Agency of University of South Bohemia, project No. 002/2016/Z.

REFERENCES

- BAUMAN, D. E. and GRINARI, J. M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 23: 203–227.
- COLLOMB, M., BUTIKOFER, U., SIEBER, R. et al. 2002. Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal*, 12(8): 649–659.
- DHIMAN, T. R., NAM, S. H. and URE, A. L. 2005. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6): 463–482.
- DLG-FUTTERWERTTABELLEN. 1997. *DLG-Feedingtables – Ruminants (in German)*. 7th Edition. Frankfurt am Main, Germany: DLG-Verlag.
- ELGERSMA, A. 2015. Grazing increases the unsaturated fatty acid concentration of milk from grass-fed cows: A review of the contributing factors, challenges and future perspectives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(9): 1345–1369.
- GEBAUER, S. K., PSOTA, T. L. and KRIS-ETHERTON, P. M. 2007. The diversity of health effects of individual trans fatty acid isomers. *Lipids*, 42(9): 787–799.
- CHILLIARD, Y., FERLAY, A. and DOREAU, M. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Production Science*, 70(1-2): 31–48.
- JENSEN, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85(2): 295–350.
- KALAC, P. and SAMKOVA, E. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55(12): 521–537.
- KELSEY, J. A., CORL, B. A., COLLIER, R. J. et al. 2003. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86(8): 2588–2597.
- KRAMER, J. K. G., PARODI, P. W., JENSEN, R. G. et al. 1998. Rumenic acid: A proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids*, 33(8): 835–835.
- LAKE, S. L., WESTON, T. R., SCHOLLJEGERDES, E. J. et al. 2007. Effects of postpartum dietary fat and body conditions core at parturition on plasma, adipose tissue, and milk fatty acid composition of lactating beef cows. *Journal of Animal Science*, 85(3): 717–730.
- LEIBER, F., KREUZER, M., NIGG, D. et al. 2005. A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows' milk of alpine origin. *Lipids*, 40(2): 191–202.
- MOSLEY, E. E., SHAFII, B., MOATE, P. J. et al. 2006. cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *Journal of Nutrition*, 136(3): 570–575.
- O'DONNELL, A. M., SPATNY, K. P., VICINI, J. L. et al. 2010. Survey of the fatty acid composition of retail milk differing in label claims based on production management practices. *Journal of Dairy Science*, 93(5): 1918–1925.
- PALMQUIST, D. L., LOCK, A. L., SHINGFIELD, K. J. et al. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Advances in Food and Nutrition Research*, 50: 179–217.
- RIEDIGER, N. D., OTHMAN, R. A., SUH, M. et al. 2009. A Systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(4): 668–679.
- SAILAS, B. and SPENER, F. 2009. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutrition & Metabolism*, 6: 36.
- SAMKOVA, E., CERTIKOVA, J., SPICKA, J. et al. 2014. Eighteen-carbon fatty acids in milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows following feeding with fresh lucerne (*Medicago sativa* L.). *Animal Science Papers and Reports*, 32(3): 209–218.
- SAMKOVA, E., SPICKA, J., PESEK, M. et al. 2012. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science*, 42(2): 83–100.

- SCHENNINK, A., HECK, J. M.L., BOVENHUIS, H. et al. 2008. Milk fatty acid unsaturation: Genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). *Journal of Dairy Science*, 91(5): 2135–2143.
- SCHWENDEL, B. H., WESTER, T. J., MOREL, P. C. H. et al. 2015. Invited review: Organic and conventionally produced milk – An evaluation of influence factors on milk composition. *Journal of Dairy Science*, 98(2): 2831–2831.
- SLOTS, T., BUTLER, G., LEIFERT, C. et al. 2009. Potentials to differentiate milk composition by different feeding strategies. *Journal of Dairy Science*, 92(5): 2057–2066.
- SOMMER, A., CERESNAKOVA, Z., FRYDRYCH, Z. et al. 1994. *Nutrient requirements and tables of nutrient value of ruminant feeds*. 1st Edition. Pohorelice, Czech Republic: CZS VUVZ.
- STANTON, C., LAWLESS, F., KJELLMER, G. et al. 1997. Dietary influences on bovine milk cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid content. *Journal of Food Science*, 62(5): 1083–1086.
- STOOP, W.M., VAN ARENDONK, J.A.M., HECK, J.M.L. et al. 2008. Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*, 91(1): 385–394.
- VLAEMINCK, B., FIEVEZ, V., CABRITA, A.R.J. et al. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4): 389–417.
- WIKING, L., THEIL, P. K., NIELSEN, J. H. et al. 2010. Effect of grazing fresh legumes or feeding silage on fatty acids and enzymes involved in the synthesis of milk fat in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 77(3): 337–342.
- YANG, B., CHEN, H. Q., STANTON, C. et al. 2015. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods*, 15: 314–325.

Contact information

Robert Kala: kalarobert@seznam.cz
Eva Samková: samkova@zf.jcu.cz
Jana Koubová: p.s.e.n.i.c.e@seznam.cz
Lucie Hasoňová: faktotum@centrum.cz
Martin Kváč: kvac@paru.cas.cz
Tamara Pelikanová: tpelikan@zf.jcu.cz
Jiří Špička: spicka@zf.jcu.cz
Oto Hanuš: hanus.oto@seznam.cz

Příloha 4:

Kala, R., Samková, E., Pecová, L., Hanuš, O., Sekmokas, K., Riaukienė, D. 2018. An overview of determination of milk fat: Development, quality control measures and application. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 105, 66(4): 1055-1064. (**Jsc**)

AN OVERVIEW OF DETERMINATION OF MILK FAT: DEVELOPMENT, QUALITY CONTROL MEASURES, AND APPLICATION

Robert Kala¹, Eva Samková¹, Lenka Pecová¹,
Oto Hanuš², Kęstutis Sekmokas³, Dalia Riaukienė³

¹Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products Quality, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Branišovská 1645/31a, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

²Dairy Research Institute, Ltd., Ke Dvoru 791/12a, 160 00 Prague, Czech Republic

³SE "Pieno Tyrimai", Radvilų Dvarų str. 31, LT-48331 Kaunas, Lithuania

Abstract

KALA ROBERT, SAMKOVÁ EVA, PECOVÁ LENKA, HANUŠ OTO, SEKMOKAS KĘSTUTIS, RIAUKIENĖ DALIA. 2018. An Overview of Determination of Milk Fat: Development, Quality Control Measures, and Application. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66(4): 1055–1064.

Milk fat content is an important indicator of milk quality because of nutritional and technological aspects of dairying. In this sense the milk fat determination is important practice procedure. The work goal was to do an effective overview and comparison of reference and routine methods of fat determination during their development. Nowadays, there exist a number of methods for determining milk fat content. Reference methods require accurate analysis in compliance with the International Standard ISO, whereas routine methods perform analysis using routine instrumental techniques for faster and cheaper results with acceptable accuracy. Quality control measures have a significant role for result determination reliability and they include internal quality controls, external quality controls, precision of evaluation, and blank samples. In conclusion, due to continuous development and improvement, routine methods will be used more often.

Keywords: milk fat, raw cow's milk, reference methods, routine methods

INTRODUCTION

Milk quality is an important factor in the dairy industry. One of the major factors of milk quality is composition, which affects the properties of the milk. Milk fat plays a significant role not only in the nutritional, physical, and chemical properties of milk, but also in the purchasability of milk (Upadhyay *et al.*, 2018). Therefore, specific minimum standards of must be met in order for payment to be received by milk producers in the Czech Republic. These minimum standard values are, in accordance with standard CSN 57 0529, fat (33 g · l⁻¹), protein (28 g · l⁻¹), and solid non-fat content (8.5%) are required (CNI-Czech Normalization Institute, 1993).

Milk fat is the most variable component of ruminant milk (Samková *et al.*, 2012). The fat content can vary from about 3% to 6%, but typically in the range 3.5% to 4.7% (Lock and Bauman, 2011). Milk fat is composed of triacylglycerols (TAGs), diacylglycerols, phospholipids, free fatty acids, and cholesterol (Jensen and Newburg, 1995). The TAGs are the main component and represent about 97–98% of the total milk fat content (Vieitez *et al.*, 2016).

The aim of our work is to describe and compare reference and routine methods used for analysis of milk fat. Furthermore, this overview describes quality control measures and applications for the mentioned methods.

Development of measurement methods

Quality requirements in the food industry stimulate the development of analytical techniques capable of precise component quantification at a reasonable price of analysis (Kessler, 2013). Therefore, several analytical methods are reported for milk fat determination and quantification. In general, the efficiency of reference method results are usually more reliable, and also more expensive, than routine method results. For this reason, more routine methods for milk fat determination have been developed during the last hundred years.

The Butyrometric method is an operating method which can be used as a reference method for routine analytical procedures. The method was developed by the Swiss chemist and dairy-owner Niklaus Gerber (Gerber, 1891). In principle, proteins (mainly phospholipid envelopes of milk fat globules) are dissolved by sulfuric acid. Then, the addition of amyl-alcohol results in a sharp interface. Subsequently, the fat is quantitatively released and separated by centrifugation. Fat volume is read on the butyrometer scale which is calibrated to indicate the fat content in percentage by weight (ISO-International Standards Office, 1976). Under the conditions in the Czech Republic, this method is regulated by the COSMT-Czech Office for Standards, Metrology and Testing (2001) – CSN ISO 2446:2001. This method can be applied to raw milk, drinking milk (whole, semi-skimmed and skimmed milk), milk powder, cream and dairy products (cheese, yoghurt). In the USA and Canada the Babcock method is used with the same analytical principle as a modification of the Butyrometric method (CAES, 1894).

The Folch method (1957) is another method for fat content determination. In principle, lipid extraction is carried out with chloroform and methanol (e.g. 2:1). Then, the homogenate is filtered. The procedure enables extraction of lipid classes for subsequent fatty acid analysis (Budge *et al.*, 2006). After extraction, transesterification (formation of fatty acid methyl esters) is carried out. This method is commonly used for marine products (Oftedal *et al.*, 2014). However, the Folch method was used for milk fat determination of Weddell seal (*Leptonychotes weddellii*) (Wheatley *et al.*, 2008) and bovine milk (Liu *et al.*, 2016).

Similarly, the Bligh and Dyer method (1959) is used for extraction of fat. In principle, this method is also based on extraction using chloroform and methanol, but it was developed for lipid extraction of lean fish tissue (Iverson *et al.*, 2001). After extraction, the homogenate is filtered and filtrate is transferred to a graduated cylinder. After allowing a few minutes for complete separation and clarification, the volume of the chloroform layer is recorded and the alcoholic layer removed by suction. Nevertheless, this method was used

by Nascimento *et al.* (2017) for determination of fat content in commercial dried dairy products.

Maxwell *et al.* (1986) used a “dry-column method” for determination of fat. Firstly, the sample is dried by anhydrous sodium sulphate and diatomaceous earth (e.g. product Celite® 545 by Supelco–Sigma-Aldrich Corp., USA). Subsequently, extraction is accomplished using a mixture of dichloromethane and methanol. The lipids may be isolated and simultaneously separated into neutral and polar fractions by a sequential elution procedure. Neutral lipids (without polar lipids) are eluted first with dichloromethane, followed by elution of polar lipids with the dichloromethane/methanol (9:1) mixture (Marmer and Maxwell, 1981). This method can be applied to raw milk, drinking milk (whole, semi-skimmed and skimmed milk) and buttermilk.

Supercritical fluid extraction (SFE) was investigated by Eller and King (1996) as an alternative to solvent-based extraction methods (Manganiello *et al.*, 2000). The sample is weighed to the extraction thimble, previously loaded with 1 g of diatomaceous earth. a temperature of 100 °C and sc-CO₂ (supercritical carbon dioxide) fluid density of 0.60 mg·ml⁻¹ are used for extraction. Every fluid is characterized by a critical point, which is defined in terms of the critical temperature and critical pressure, thus CO₂ is supercritical above 31.1 °C and 7.38 MPa (Sahena *et al.*, 2009). Sc-CO₂ is removed exclusively nonpolar lipid material. Wolf *et al.* (2003) used SFE for analysis of milk infant formula powder whereas Astaire *et al.* (2003) applied method on buttermilk powders (with using microfiltration).

The Weibull-Berntrop gravimetric method involves Soxhlet extraction (García-Ayuso *et al.*, 1999) and it is used for special dairy products–infant formula (ISO–Part 1, 2005), ice creams (ISO–Part 2, 2005) or special cases (ISO–Part 3, 2005). In principle, the method include hydrolysis (by hydrochloric acid) and extraction (by *n*-hexane). Next, the solvent was released in a rotary evaporator, followed by cooling in a dessicator and weighing. Tab. I summarizes individual methods.

QUALITY CONTROL MEASURES

The most important factors of correct analysis are sampling accuracy, sample manipulation, and quality control measures. Fat content is sensitive to sampling accuracy and may be influenced by this factor (Hanus *et al.*, 2008). Therefore, bulk or individual milk sampling is done according to the standards for sampling CSN ISO 707 (COSMT, 2009) to ensure accurate results.

The quality control measures serve as a mechanism for verifying the reliability of the results. Aside from compliance with the standard operating procedure (SOP), other measures include internal quality control (with quality control material), supervision of the working processes with audits (Glanzmann *et al.*, 2017), external quality

control–proficiency testing (Kaarls *et al.*, 2017), two different methods for the same sample, precision of evaluation–repeatability and reproducibility (Verrezen *et al.*, 2017), and blank samples. Basic statistical principles as well as rules of proficiency testing for reference and routine methods of raw milk fat determination were followed. These principles and rules are valid at the national and international level (milk laboratory networks) as many authors emphasized (Grappin, 1987, 1993; Hanuš *et al.*, 1998; Leray, 2009a, 2009b, 2010).

Quality control material based on known composition is valuable in internal quality controls (Gargis *et al.*, 2012). This material is comprised of control milk and positive and negative controls for different components (fat, protein, and others). Preparation of control milk starts with analysis of raw milk (primary and fast detection of composition and quality evaluation). Then, milk is properly mixed with preservatives (bronopol or sodium azide) and is dosed into plastic vials. Subsequently, milk can be refrigerated after dosing.

Under the Czech Republic conditions (Hanus *et al.*, 2014), the proficiency testing system is based on relevant standards—CSN 57 0530 (CNI, 1973), CSN 57 0536 (CNI, 1999) and CSN EN ISO/IEC 17025 (CNI, 2005). Proficiency testing not only reveals any errors in the results, but also provides the possibility for comparison with other participants who can identify potential problems, e.g. problems with calibration (Glanzmann *et al.*, 2017). The procedure of proficiency testing is described in “Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparison” (ISO, 2010).

Before each analysis, samples are prepared by heating in a water bath, gently mixing, and then cooling to the room temperature. This procedure

applies to particular samples designated in the calibration. To verify the accuracy of the results, it is also important to prepare a blank sample.

REFERENCE METHODS

Reference methods are thoroughly studied and defined measurement procedures. These methods are used to assess the reliability of other measurement procedures (Šprongl and Paulík, 2011).

Reference methods are linked to the primary methods of measurement defined as “methods having the highest metrological properties, whose operation can be completely described and understood, for which a complete uncertainty statement can be written down in terms of SI units” (Milton and Quinn, 2001). Primary methods used for chemical measurements include coulometry, gravimetry, titrimetry, and colligative methods (Quinn, 1997).

The ultimate precision method for determination of milk fat content is the Röse-Gottlieb method (Bogomolov *et al.*, 2017), which replaced the Butyrometric method described above. The Mojonnier analytical method, which is essentially the same as the Röse-Gottlieb method with its similar reference extraction (Choi *et al.*, 2015), is used in the USA and Canada for much the same reasons that the Röse-Gottlieb method is used over the Butyrometric method (Kleyn *et al.*, 1988). In short, approximately 10 g (with precision of 0.0001 g) of cow’s milk is hydrolysed by ammonia. Subsequently, ethanol is added. Then fat is extracted with diethyl ether and petroleum ether (repeated liquid-liquid extraction, LLE). Fat content is weighed after evaporating the solvents (e.g. device SMT-Moplant series by Flohr Instrumenten and

I: Comparison of individual methods.

| Method | Principle | Use | Reference |
|---------------------------------------|--|--|---|
| Butyrometric | a dissolving of protein (particularly phospholipid envelopes of milk fat globules) by sulfuric acid | milk and dairy products | COSMT (2001) |
| Folch | a two-phase partition of the lipid fraction in the organic (chloroform) phase (chloroform-methanol-water mix to create a two-phase system) | milk | Liu <i>et al.</i> (2016) |
| Bligh and Dyer | a two-phase partition of the lipid fraction in the organic (chloroform) phase (chloroform-methanol-water mix to create a two-phase system) | milk and dairy products (dried dairy products) | Nascimento <i>et al.</i> (2017) |
| Dry column | an extraction of lipid by solvent elution (with using a dry column composed of an anhydrous sodium sulphate and diatomaceous earth) | milk and dairy products | Maxwell <i>et al.</i> (1986) |
| Supercritical fluid extraction | a separation technology that uses supercritical fluid as the solvent (sc-CO ₂) | infant formula powder; buttermilk powder | Wolf <i>et al.</i> (2003); Astaire <i>et al.</i> (2003) |
| Weibull-Berntrop | a gravimetric method including hydrolysis by hydrochloric acid and extraction by <i>n</i> -hexane | infant formula, ice cream and special products | ISO–Part 1-3 (2005) |

Sc-CO₂–supercritical CO₂

Apparatenbouw, Netherlands). Under the Czech Republic conditions, this method is regulated by CSN EN ISO 1211:2011 (COSMT, 2011). This method can be applied to raw milk and drinking milk (whole, semi-skimmed and skimmed milk).

In conclusion, reference methods (Tab. II) perform accurate analyses, which comply with the internal SOP according to the ISO International Standards. By contrast, reference methods have several disadvantages—time-consuming process of analyse and fewer analysed samples.

ROUTINE METHODS

Efficient routine analysis of milk fat is an important part of dairy production (Zhu *et al.*, 2015). Nowadays, the aim is to develop fast and cost effective analytical methods that enable the identification of components with various physico-chemical properties in a single analytical run (Tankiewicz and Biziuk, 2018). Next, routine analyses are joined with routine implementation of performance-related tests for milk payment purposes under the Czech Republic conditions (Hanus *et al.*, 1998).

The main routine milk fat measurement principle from 1950 to 1980 for milk payment and milk recording laboratories in Europe was turbidimetry (nephelometry), (e.g. Electronic Milko Tester by Foss Electric, Denmark). Turbidimetric analysis was based on the observed correlation between fat content and the detected elimination of light dispersed by a milk sample at specific wavelengths (Ashworth, 1969). At present, this method is obsolete. Furthermore, the turbidimetric method is sensitive to the size variability of milk particles (e.g.

milk fat globule), and, the testing of raw milk samples without prior treatment (by homogenization) is not very appropriate (Kucheryavskiy *et al.*, 2014). This method can be primarily applied to drinking milk (whole, semi-skimmed and skimmed milk). On the other hand, Hanuš *et al.* (2014) described good results also with raw milk samples. The next routine method for determination of milk fat and other milk components is the ultrasound analytical procedure (Perlín, 2003).

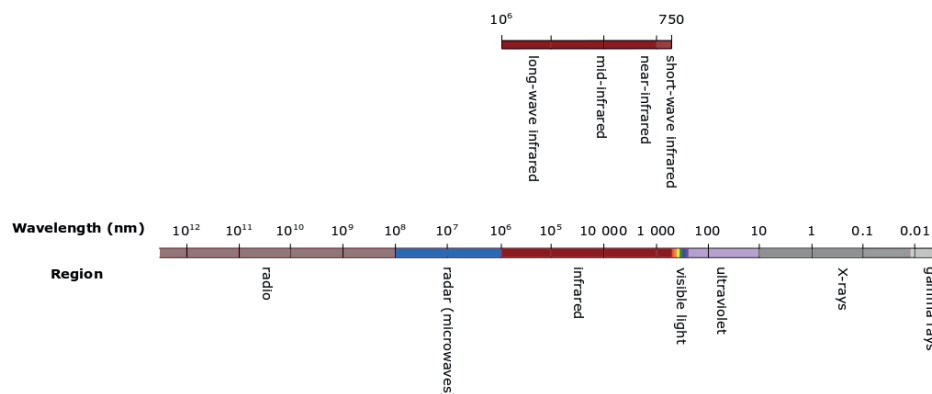
Optical spectroscopy methods have the potential to replace or at least to complement some of the classical laboratory methods (El-Abassy *et al.*, 2011). Spectroscopic methods of determination of fat are mainly based on the components absorption. The precondition is minimal to no scatter (Rinnan *et al.*, 2009). The spectral ranges (Fig. 1) that are commonly used in spectrometry include: visible (VIS), short-wave infrared (SWIR), near-infrared (NIR), mid-infrared (MIR), long-wave infrared (LWIR), or thermal infrared (TIR) light (van der Meer, 2018).

The VIS light region (360–780 nm), where the scatter strongly dominates, is rarely used in quantitative milk analysis (Crofcheck *et al.*, 2000). Cabassi *et al.* (2013) reported, that particularly in the region below 1100 nm, the scatter strongly dominates over weak absorption. Nevertheless, Bogomolov *et al.* (2013) describes scatter-based quantitative analysis of fat in the raw milk using VIS and SWIR spectroscopy. According to these authors, difference of individual spectral elements of scatter (e.g. wavelength dependence) at different-sized milk fat globules are said to be sufficient for their quantitative analysis using formal multivariate modelling, e.g. partial least-squares (PLS) regression.

II: Comparison of individual reference methods.

| Method | Principle | Use | Reference |
|---------------|---|------|---------------------------|
| Mojonnier | a gravimetric method → separation the fat fraction (limited to the lipophilic ether phase) from the rest of the milk sample | milk | Choi <i>et al.</i> (2015) |
| Röse-Gottlieb | a gravimetric method including hydrolysis by ammonia and extraction by diethyl ether and petroleum ether (repeated LLE) | milk | COSMT (2011) |

LLE—liquid-liquid extraction



1: Electromagnetic spectrum.

The NIR spectroscopic quantification of milk components makes use of the main region from 1100 to 2500 nm and relies on the component absorption overtones and combination bands (Kalinin *et al.*, 2008; Aernouts *et al.*, 2011). Upadhyay *et al.* (2018) showed that the spectral range for NIR region is from 750 to 2 500 (13 400–4 000 cm^{-1}), while for MIR it is between 2 500 and 25 000 nm (4 000–400 cm^{-1}). Tsenkova *et al.* (1999) describes the statistical accuracy (in terms of root mean-square error–RMSE) on the MIR spectroscopic analysis for fat content at very high complexity of PLS regression calibration models. NIR and MIR (Bogomolov and Melenteva, 2013; Feng *et al.*, 2013) are widespread for determination milk parameters, respectively milk fat (Bogomolov *et al.*, 2017). For example, a study by Mlček *et al.* (2016) reveals the determination of fat in milk using NIR which is calibrated by two routine methods (Gerber and Röse-Gottlieb). Nowadays, apparatuses based on MIR spectroscopy are the most used in industrial laboratories (e.g. MilkoScan series by Foss Electric, Denmark).

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy (e.g. apparatus CombiScope FTIR series by Delta Instruments B.V., Netherlands) is rapid, easy to

apply and useful for routine analysis (Wolff *et al.*, 1998). In principal, FTIR is a biochemical fingerprinting technique (Nicolaou *et al.*, 2010). During measurement, IR radiation is absorbed as it passes through the sample, which leads to changes in the rotational-vibrational energy states of the molecule depending on variations of the dipole moment of the molecule. This method can be applied to raw milk, drinking milk (whole, semi-skimmed and skimmed milk), cream and dairy products (yoghurt).

Also, Raman scattering, especially Fourier transform Raman (FT-Raman) spectroscopy, gives access to the vibrational fingerprints of molecules (El-Abassy *et al.*, 2011) and similarly to FTIR, it has been demonstrated to be successful for the determination of nutritional parameters, e.g. in conjugated linoleic acids in cow's milk fat (Meurens *et al.*, 2005).

FTIR and attenuated total reflectance (ATR) have been used by van de Voort *et al.* (1992) for determination of fat and moisture contents in butter. Inon *et al.* (2004) used FTIR and ATR techniques with chemometric analyses (multivariate statistics) to classify drinking milks. Next, diffuse reflectance

III: Comparison of individual routine methods.

| Method | Principle | Use | Reference |
|-------------------------------|--|-------------------------|--|
| Turbidimetric analysis | a measurement of intensity light passing through the sample in the original direction | milk | Ashworth (1969) |
| Ultrasound procedure | a measurement of high-frequency ultrasound radiation passing through the sample | milk | Perlín (2003) |
| MW irradiation | a part of the electromagnetic wave spectrum and have wavelengths ranging from 1 mm to 1 m | milk | García-Ayuso <i>et al.</i> (1999) |
| NMR | based on the absorption of radiofrequency electromagnetic radiation of the nuclei of some atoms (e.g. ^1H -, ^{13}C -) in the molecules of the analyzed samples located in the magnetic field | milk and dairy products | Belloque and Ramos (1999) |
| TD-NMR | a method consist in a combined relaxation analysis (the magnetization at a certain time is determined by both the longitudinal (T1) and the transverse (T2) NMR relaxation processes) | milk and dairy products | Nascimento <i>et al.</i> (2017) |
| IR spectroscopy | a measurement of infrared irradiation (in near, mid etc. spectrum) absorbed or reflected by sample; occur to changes in the rotational-vibrational energy states of the molecule depending on variations of the dipole moment of the molecule | | |
| FTIR | vibrational fingerprints of molecules with integral transformation (conversion of the signal from time domain to frequency domain) | milk and dairy products | Nicolaou <i>et al.</i> (2010) |
| FT-Raman | an interaction between photons of incident light with rotational-vibrational energy states of the molecule (the scattered irradiation has a different wavelength than the incident irradiation) | milk and dairy products | Meurens <i>et al.</i> (2005) |
| ATR-FTIR | a reflective technique (occur to total reflection of the IR beam from modified prism–diamond, germanium etc.) | milk; butter | Inon <i>et al.</i> (2004); Van de Voort <i>et al.</i> (1992) |
| DRIFTS | a reflective technique (diffuse reflection consist in focusing the IR beam on a sample, mostly in a powder form) | milk | Pappas <i>et al.</i> (2008) |

MW–microwave; NMR–nuclear magnetic resonance; TD–time-domain; IR–infrared; FT–Fourier transform; ATR–attenuated total reflectance; DRIFTS–diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy;

Fourier transform infrared spectroscopy (DRIFTS) has been applied to distinguish sheep milk from goat milk (Pappas *et al.* 2008). In principle, diffuse reflection consist in focusing the IR beam on a sample. The diffuse scattered irradiation is converted by a suitable optical device to the spectroscope detector (Machovič and Novák, 1998).

In general and according to the results of other authors (Tsenkova *et al.*, 1999; Kukačková *et al.*, 2000; Jankovská and Šustová, 2003; Hanuš *et al.*, 2009, 2014; Mlček *et al.*, 2016), the reliability of fat contents in raw milk (in terms of the gradual decreasing of individual differences (variability) in standard deviation value between routine and reference method results) by routine methods (in practical use under the conditions of their today technical design) is growing in the following order: IR spectroscopy with filter technology and in mid-range of spectrum = IR spectroscopy with whole spectrum and FT in mid-range of spectrum > IR spectroscopy in the near-range spectrum \geq turbidimetric method > ultrasound method. The reliability order is also given by a growing correlation between coefficients of routine and reference results of milk fat in the same sources.

Microwave (MW) irradiation is the next method used for determination of fat. This method is used to accelerate hydrolysis of the matrix and extraction step of milk lipids (García-Ayuso *et al.*, 1999). MW irradiation have been developed as an alternative to conventional Soxhlet extraction (García-Ayuso

and de Castro, 1999). Despite this, the method has quantitative results similar to the Weibull-Berntrop extraction procedure but with lesser chemical transformation of triglycerides. However, MW irradiation is not used much for fat determination. Garber and Thole (2015) used this method for buffered dilute non-fat milk sample.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy provides unique qualitative and quantitative information regarding the physical properties (e.g. crystallization, thermal properties) of milk fat (Belloque and Ramos, 1999). Also, the structural characteristics (e.g. binding, spatial distance) can be determined using NMR spectroscopy. The method can be applied to raw milk, drinking milk (whole, semi-skimmed and skimmed milk), cheese, and ice cream.

Time-domain (TD)-NMR spectroscopy has been an alternative technique for fat analysis (Castell-Palou *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015). Compared with lipid extraction or NIR spectroscopy methods, TD-NMR has certain benefits. TD-NMR is rapid, non-invasive and provides analysis of the bulk milk composition (Nascimento *et al.*, 2017).

In conclusion, routine methods (Tab. III) perform analyses using routine instrumental techniques for faster and less accurate results. Utilizing routine methods, a large of number of samples can be analysed. However, the disadvantages are the high acquisition cost of the apparatus equipment and the necessity of verification.

CONCLUSION

Nowadays, routine methods are an integral part for checking the quality of milk and dairy products. However, reference methods are also very important in terms of detailed description and verification. Reference method results are used regularly in individual milk laboratories and laboratory network, not only for routine method calibration purposes but also for estimation of combined enlarged uncertainties of measurement results by routine methods. Compared to routine methods, reference methods have the disadvantage of being limited in the number of determined samples. In the future, due to continuous development and improvement, routine methods will be used more often.

Acknowledgments

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, project No. QJ1510336 and the Grant Agency of University of South Bohemia, project No. 002/2016/Z. Authors thank to native English speaker for language improvements.

REFERENCES

- AERNOUTS, B., POLSHIN, E., LAMMERTYN, J. *et al.* 2011. Visible and near-infrared spectroscopic analysis of raw milk for cow health monitoring: reflectance or transmittance? *J. Dairy Sci.*, 94(11): 5315–5329.
- ASHWORTH, U.S. 1969. Turbidimetric Methods for Measuring Fat Content of Homogenized Milk. *J. Dairy Sci.*, 52(2): 262–263.
- ASTAIRE, J. C., WARD, R., GERMAN, J. B. *et al.* 2003. Concentration of polar MFGM lipids from buttermilk by microfiltration and supercritical fluid extraction. *J. Dairy Sci.*, 86(7): 2297–2307.
- BELLOQUE, J. and RAMOS, M. 1999. Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products. *Trends Food Sci. Technol.*, 10(10): 313–320.
- BLIGH, E. G. and DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37(8): 911–917.
- BOGOMOLOV, A. and MELENTEVA, A. 2013. Scatter-based quantitative spectroscopic analysis of milk fat and total protein in the region 400–1100 nm in the presence of fat globule size variability. *Chem. Intelligent Lab. Syst.*, 126: 129–139.

- BOGOMOLOV, A., BELIKOVA, V., GALYANIN, V. *et al.* 2017. Reference-free spectroscopic determination of fat and protein in milk in the visible and near infrared region below 1000 nm using spatially resolved diffuse reflectance fiber probe. *Talanta*, 167: 563–572.
- BOGOMOLOV, A., MELENTEVA, A. and DAHM, D. J. 2013. Fat Globule Size Effect on Visible and Shortwave near Infrared Spectra of Milk. *J. Near Infrared Spectr.*, 21(5): 435–440.
- BUDGE, S. M., IVERSON, S. J. and KOOPMAN, H. N. 2006. Studying the trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: A primer on analysis and interpretation. *Mar. Mamm. Sci.*, 22(4): 759–801.
- CABASSI, G., PROFIZER, M., MARINONI, L. *et al.* 2013. Estimation of fat globule size distribution in milk using an inverse light scattering model in the near infrared region. *J. Near Infrared Spectr.*, 21(5): 359–373.
- CAES. 1894. The Babcock method of determining the proportion of fat in milk and milk products. In: *Bulletin No. 117: The Babcock method of determining fat in milk and milk products*. Connecticut Agricultural Experiment Station, January. New Haven, 3–11.
- CASTELL-PALOU, A., ROSSELLÓ, C., FEMENIA, A. *et al.* 2013. Simultaneous Quantification of Fat and Water Content in Cheese by TD-NMR. *Food Bioprocess Technol.*, 6(10): 2685–2694.
- CHOI, A., FUSCH, G., ROCHOW, N. *et al.* 2015. Establishment of micromethods for macronutrient contents analysis in breast milk. *Matern. Child Nutr.*, 11(4): 761–772.
- CROFCHECK, C. L., PAYNE, F. A., HICKS, C. L. *et al.* 2000. Fiber Optic Sensor Response to Low Levels of Fat in Skim Milk. *J. Food Process. Eng.*, 23: 163–175.
- CNI. 1973. *Methods for testing of milk and milk products [in Czech: Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků]*. CSN 57 0530:1973. Prague: Czech Normalization Institute.
- CNI. 1993. *Raw cow's milk for dairy treatment and processing [in Czech: Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování]*. CSN 57 0529:1993. Prague: Czech Normalization Institute.
- CNI. 1999. *Determination of milk composition by mid-infrared analyzer [in Czech: Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem]*. CSN 57 0536:1999. Prague: Czech Normalization Institute.
- CNI. 2005. *Conformity assessment - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [in Czech: Posuzování shody - Všeobecné požadavky na působnost zkušebních a kalibračních laboratoří]*. CSN EN ISO/IEC 17025:2005. Prague: Czech Normalization Institute.
- COSMT. 2001. *Milk - Determination of fat content (Routine method) [in Czech: Mléko - Stanovení obsahu tuku (Rutinní metoda)]*. CSN ISO 2446:2001. Prague: Czech Office for Standards, Metrology and Testing.
- COSMT. 2009. *Milk and milk products - Guidance on sampling [in Czech: Mléko a mléčné výrobky - Směrnice pro odběr vzorků]*. CSN ISO 707 (57 0003). Prague: Czech Office for Standards, Metrology and Testing.
- COSMT. 2011. *Milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method) [in Czech: Mléko - Stanovení obsahu tuku - Vážková metoda (Referenční metoda)]*. CSN EN ISO 1211:2011 (57 0534). Prague: Czech Office for Standards, Metrology and Testing.
- EL-ABASSY, R. M., ERAVUCHIRA, P. J., DONFACK, P. *et al.* 2011. Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.*, 56(1): 3–8.
- ELLER, F. and KING, J. 1996. Determination of fat content in foods by analytical SFE. *Seminars Food Anal.*, 1: 145–162.
- FENG, X.-D., SU, R., XU, N. *et al.* 2013. Portable analyzer for rapid analysis of total protein, fat and lactose contents in raw milk measured by non-dispersive shortwave near-infrared spectrometry. *Chem. Res. Chinese Univ.*, 2013, 29(1): 15–19.
- FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE STANLEY, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226(1): 497–509.
- GARBER, E. A. E. and THOLE, J. 2015. Application of Microwave Irradiation and Heat to Improve Gliadin Detection and Ricin ELISA Throughput with Food Samples. *Toxins*, 7(6): 2135–2144.
- GARCÍA-AYUSO, L. E., and DE CASTRO, M. D. L. 1999. A multivariate study of the performance of a microwave-assisted Soxhlet extractor for olive seeds. *Anal. Chim. Acta*, 382(3): 309–316.
- GARCÍA-AYUSO, L. E., VELASCO, J., DOBARGANES, M. C. *et al.* 1999. Double use of focused microwave irradiation for accelerated matrix hydrolysis and lipid extraction in milk samples. *Int. Dairy J.*, 9(10): 667–674.
- GARGIS, A. S., KALMAN, L., BERRY, M. W. *et al.* 2012. Assuring the quality of next generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat. Biotech.*, 30(11): 1033–1036.
- GERBER, N. 1891. *Neuer Butyrometer*. CH Patent 2621. Swiss Federal Institute of Intellectual Property.
- GLANZMANN, B., GERMANN, U. and COSSU, C. 2017. Experiences in organising of proficiency tests since six years. *For. Sci. Int. Gen. Suppl. Series*, 6: 332–334.
- GRAPPIN, R. 1987. Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. *Bullet. of IDF*, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, 3–122.
- GRAPPIN, R. 1993. European network of dairy laboratories. In: *Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories*. Sonthofen, 18–20 May 1992. Brussels: International Dairy Federation, pp 205–211.

- HANUŠ, O., BENDA, P., JEDELSKÁ, R. *et al.* 1998. Design and evaluation of the first national qualitative testing of routine milk analyses. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.*, 46(3): 33–53.
- HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., YONG, T. *et al.* 2009. Reference and indirect instrumental determination of basic milk composition and somatic cell count in various species of mammals. *Sci. Agricult. Bohem.*, 40(4): 196–203.
- HANUŠ, O., ŘÍHA, J., SAMKOVÁ, E. *et al.* 2014. A comparison of result reliability for investigation of milk composition by alternative analytical methods in Czech Republic. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.*, 62(5): 929–937
- HANUŠ, O., VEGRICHT, J., FRELICH, J. *et al.* 2008. Analyse of raw cow milk quality according to free fatty acids contents in the Czech Republic. *Czech J. Anim. Sci.*, 53(1): 17–30.
- INON, F. A., GARRIGUES, S. and GUARDIA, M. 2004. Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. *Anal. Chim. Acta*, 513(2): 401–412.
- ISO. 1976. *Milk-determination of fat content (Butyrometric routine method)*. ISO 2446:1976. Geneva: International Standards Office.
- ISO. 2005. *Milk products and milk-based foods-determination of fat content by the Weibull-Berntrop gravimetric method (Reference method) – Part 1: Infant foods*. ISO 8262-1:2005. Geneva: International Standards Office.
- ISO. 2005. *Milk products and milk-based foods-determination of fat content by the Weibull-Berntrop gravimetric method (Reference method) – Part 2: Edible ices and ice-mixes*. ISO 8262-2:2005. Geneva: International Standards Office.
- ISO. 2005. *Milk products and milk-based foods-determination of fat content by the Weibull-Berntrop gravimetric method (Reference method) – Part 3: Special cases*. ISO 8262-3:2005. Geneva: International Standards Office.
- ISO. 2010. *Conformity assessment - general requirements for proficiency testing*. ISO 17043:2010. Geneva: International Standards Office.
- IVERSON, S. J., LANG, S. L. C. and COOPER, M. H. 2001. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36(11): 1283–1287.
- JANKOVSKÁ, R. and ŠUSTOVÁ, K. 2003. Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. *Czech J. Food Sci.*, 21(4): 123–128.
- JENSEN, R. G. and NEWBURG, D. S. 1995. Bovine milk lipids. In: JENSEN, R. G. (Ed.). *Handbook of Milk Composition*. 1st edition. London: Academic Press, pp. 543–575.
- KAARLS, R., MACKAY, L., SAMUEL, A. *et al.* 2017. Laboratory capacity building through the use of metrologically traceable reference values in proficiency testing programmes. *Accred. Qual. Assur.*, 22(6): 321–334.
- KALININ, A., KRIVTSUN, V., KRASHENINNIKOV, V. *et al.* 2008. Calibration models for multi-component quantitative analyses of dairy with the use of two different types of portable near infrared spectrometer. *J. Near Infrared Spectr.*, 16(3): 343–348.
- KESSLER, R. W. 2013. Perspectives in process analysis. *J. Chemometrics*, 27(11): 369–378.
- KLEYN, D. H., TROUT, J. R. and WEBER, M. 1988. Determination of fat in raw milk: comparison of mojonnier (ether extraction) and Gerber method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1988, 71(4): 851–853.
- KUCHERYAVSKIY, S., MELENTEVA, A. and BOGOMOLOV, A. 2014. Determination of fat and total protein content in milk using conventional digital imaging. *Talanta*, 121: 144–152.
- KUKAČKOVÁ, O., ČURDA, L. and JINDŘICH, J. 2000. Multivariate calibration of raw cow milk using NIR spectroscopy. *Czech J. Food Sci.*, 18(1): 1–4.
- LERAY, O. 2009a. ICAR AQA strategy - International anchorage and harmonization. In: *Proceedings of the 36th ICAR Biennial Session*. Niagara Falls, 16–20 June. Rome: ICAR Technical Series, pp 295–300.
- LERAY, O. 2009b. Interlaboratory reference system and centralized calibration – Prerequisites and standard procedures. In: *Proceedings of the 36th ICAR Biennial Session*. Niagara Falls, 16–20 June. Rome: ICAR Technical Series, pp 301–305.
- LERAY, O. 2010. Analytical precision performance in ICAR proficiency testing programmes. In: *Proceedings of the 37th ICAR Biennial Session*. Riga, 31 May – 4 June. Rome: ICAR Technical Series, pp 263–270
- LIU, Z. Q., ROCHFORD, S. and COCKS, B. G. 2016. Optimization of a single phase method for lipid extraction from milk. *J. Chromatogr. A*, 1458: 145–149.
- LOCK, A. L. and BAUMAN, D. E. 2011. Milk fat and human health – separating fats from fiction. In: *Proceedings 2011 Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. Cornell University, 18–20 October. New York: Department of Animal Science, Cornell University, pp. 126–135.
- MACHOVIČ, V. and NOVÁK, F. 1998. Diffuse reflectance infrared spectroscopy of soil bitumens from Sumava region [in Czech: *Difúzně-reflexní infračervená spektroskopie půdních bitumenů z oblasti Šumavy*]. *Chem. Listy*, 92(2): 151–156.
- MANGANIELLO, L., RÍOS, A. and VALCÁRCEL, M. 2000. Automatic microgravimetric determination of fats in milk products by use of supercritical fluid extraction with on-line piezoelectric detection. *J. Chromatography A*, 874(2): 265–274.
- MARMER, W. N. and MAXWELL, R. J. 1981. Dry Column Method for the Quantitative Extraction and Simultaneous Class Separation of Lipids from Muscle Tissue. *Lipids*, 16(5): 365–371.

- MAXWELL, R. J., MONDIMORE, D. and TOBIAS, J. 1986. Rapid method for the quantitative extraction and simultaneous class separation of milk lipids. *J. Dairy Sci.*, 69(2): 321–325.
- MEURENS, M., BAETEN, V., YAN, S. H. *et al.* 2005. Determination of the conjugated linoleic acids in cow's milk fat by Fourier transform Raman spectroscopy. *J. Agri. Food Chem.*, 53(15): 5831–5835.
- MILTON, M. J. T. and QUINN, T. J. 2001. Primary Methods for the Measurement of Amount of Substance. *Metrologia*, 38(4): 289–296.
- MLČEK, J., DVOŘÁK, L., ŠUSTOVÁ, K. *et al.* 2016. Accuracy of the FT-NIR Method in Evaluating the Fat Content of Milk Using Calibration Models Developed for the Reference Methods According to Röse-Gottlieb and Gerber. *J. AOAC Int.*, 99(5): 1305–1309.
- NASCIMENTO, P. A. M., BARSANELLI, P. L., REBELLATO, A. P. *et al.* 2017. Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) and Chemometrics for Determination of Fat Content in Commercial Products of Milk Powder. *J. AOAC Int.*, 100(2): 330–334.
- NICOLAOU, N., XU, Y. and GOODACRE, R. 2010. Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *J. Dairy Sci.*, 93(12): 5651–5660.
- OFTEDAL, O. T., EISERT, R. and BARRELL, G. K. 2014. Comparison of analytical and predictive methods for water, protein, fat, sugar, and gross energy in marine mammal milk. *J. Dairy Sci.*, 97(8): 4713–4732.
- PAPPAS, C. S., TARANTILIS, P. A., MOSCHOPOULOU, E. *et al.* 2008. Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chem.*, 106(3): 1271–1277.
- PEREIRA, F. M. V., REBELLATO, A. P., PALLONE, J. A. L. *et al.* 2015. Through-package fat determination in commercial Samples of mayonnaise and salad dressing using time-domain nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. *Food Control*, 48: 62–66.
- PERLÍN, C. 2003. Ultrasonic milk analyzer. UZEI 15557 [in Czech: *Ultrazvukový analyzátor mléka*]. [Online]. Available at: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=15&typ=1&val=15557&ids=199>. [Accessed: 2018, July 19].
- QUINN, T. J. 1997. Primary methods of measurement and primary standards. *Metrologia*, 34(1): 61–65.
- RINNAN, Á., VAN DER BERG, F. W. J. and ENGELSEN, S. B. 2009. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TRAC Trends Anal. Chem.*, 28(10): 1201–1222.
- SAHENA, F., ZAIDUL, I. S. M., JINAP, S. *et al.* 2009. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *J. Food Eng.*, 95(2): 240–253.
- SAMKOVÁ, E., ŠPIČKA, J., PEŠEK, M., *et al.* 2012. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South Afr. J. Anim. Sci.*, 42(2): 83–100.
- ŠPRONGL, L. and PAULÍK, M. 2011. Quality systems in the laboratory. In: BARTŮŇKOVÁ, J., HRUŠÁK, O., PAULÍK, M. *et al.* (eds). *Investigative methods in immunology [in Czech: Systémy jakosti (kvality) v laboratoři. Vyšetřovací metody v imunologii]*. 2nd edition. Prague: Grada Publishing, pp 149–155.
- TANKIEWICZ, M. and BIZIUK, M. 2018. Fast, sensitive and reliable multi-residue method for routine determination of 34 pesticides from various chemical groups in water samples by using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 410(5): 1533–1550.
- TSENKOVA, R., ATANASSOVA, S., TOYODA, K. *et al.* 1999. Near-infrared spectroscopy for dairy management: Measurement of unhomogenized milk composition. *J. Dairy Sci.*, 82(11): 2344–2351.
- UPADHYAY, N., JAISWAL, P. and JHA, S. N. 2018. Application of attenuated total reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR) in MIR range coupled with chemometrics for detection of pig body fat in pure ghee (heat clarified milk fat). *J. Mol. Struct.*, 1153: 275–281.
- VAN DE VOORT, F. R., SEDMAN, J., EMO, G. *et al.* 1992. A Rapid FTIR quality control method for fat and moisture determination in butter. *Food Res. Int.*, 25(3): 193–198.
- VAN DER MEER, F. 2018. Near-infrared laboratory spectroscopy of mineral chemistry: A review. *Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf.*, 65: 71–78.
- VERREZEN, F., VASILE, M., LOOTS, H. *et al.* 2017. Method validation and verification in liquid scintillation counting using the long-term uncertainty method (LTUM) on two decades of proficiency test data. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 314(2): 737–742.
- VIEITEZ, I., IRIGARAY, B., CALLEJAS, N. *et al.* 2016. Composition of fatty acids and triglycerides in goat cheeses and study of the triglyceride composition of goat milk and cow milk blends. *J. Food Comp. Anal.*, 48: 95–101.
- WHEATLEY, K. E., BRADSHAW, C. J. A., HARCOURT, R. G. *et al.* 2008. Feast or famine: Evidence for mixed capital-income breeding strategies in Weddell seals. *Oecologia*, 155(1): 11–20.
- WOLF, W. R., LACROIX, D. E., GOEL, R. *et al.* 2003. Total fat analysis in milk- and soy-based infant formula powder by supercritical fluid extraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80(9): 853–857.
- WOLFF, R. L., COMBE, N. A., PRECHT, D. *et al.* 1998. Accurate determination of *trans*-18:1 isomers by capillary gas-liquid-chromatography on cyanoalkyl polysiloxane stationary phases. *Oil. Fats Crops Lipids*, 5(4): 295–300.
- ZHU, X., GUO, W. and LIANG, Z. 2015. Determination of the Fat Content in Cow's Milk Based on Dielectric Properties. *Food Bioproc. Technol.*, 8(7): 1485–1494.

Contact information

Robert Kala: kalaro00@zf.jcu.cz

Eva Samková: samkova@zf.jcu.cz

Lenka Pecová: pecovl00@zf.jcu.cz

Oto Hanuš: hanus.oto@seznam.cz

Kęstutis Sekmokas: kestutis.sekmokas@pieno-tyrimai.lt

Dalia Riaukienė: dalia@pieno-tyrimai.lt

Příloha 5:

Samková, E., **Kala, R.**, Hasoňová, L., Pecová, L., Hanuš, O. 2018. Využití rutinního stanovení mastných kyselin při odhadu heritability (Use of routine determination of fatty acids for heritability estimates). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 168, 29(3): 13-16.

(J_{REC})

Seznam literatury

- Belhamidi S., Larif M., Quabli H., Elghizel S., Jalte H., Chouni S., Elmidaoui A.: Study the performance of the organic membrane ultrafiltration on whey treatment., IJEAS, Volume 2, Issue 9, 2015.
 ČSN ISO 4832, 4833, 6611, 6730, 7889 (normy pro mikrobiologii).
 Nielsen P. S.: Membrane Filtration for Whey Protein Concentrate, Marketing bulletin APV Pasilac AS, 1988.
 Palatý Z. a kol.: Membránové procesy, VŠCHT v Praze, 2012.
 Roubal P., Binder M., Drbohlav J., Pechačová M.: Technická zpráva projektu KUSmem, ev.č. QJ 1510341, dílčí cíl 3, 12/2017, VÚM s.r.o.
 Vyhláška č. 397/2016 Sbírky zákonů
 Vyhláška č. 124/2004 Sbírky zákonů

Kontaktní adresa:

Ing. Michael Binder, VÚM s.r.o., Ke Dvoru 12a,
 160 00 Praha 6, tel. 00420 235 354 551,
 mobil: 734 644 321, e-mail: binder@milcom-as.cz

Přijato do tisku: 22.5.2018

Lektorováno: 9.6.2018

VYUŽITÍ RUTINNÍHO STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN PŘI ODHADU HERITABILITY

**Eva Samková¹, Robert Kala¹, Lucie Hasoňová¹,
 Lenka Pecová¹, Oto Hanuš²**

¹ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
 Zemědělská fakulta, Studentská 1668,
 370 05 České Budějovice

² Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Ke Dvoru 12a,
 160 00 Praha 6

Use of routine determination of fatty acids for heritability estimates

Abstrakt

Obsah mléčného tuku a jeho vlastnosti podmíněné zastoupením mastných kyselin (MK) jsou důležitým ukazatelem kvality mléka i mléčných výrobků. Pro žádoucí intervenci do složení mléčného tuku a zvýšení zdravotně prospěšných MK je nejdůležitější výživa dojníc. S rozvojem mlékařských analytických metod (infračervená spektroskopie) byl však umožněn i efektivnější výzkum genetických parametrů profilu MK mléčného tuku. Korelace pro výsledky MK mezi referenční a rutinní metodou jsou akceptovatelné pro řadu důležitých MK a jejich skupin s výpovědí k předpokládaným humánním zdravotním benefitům. Na tomto základě, další studium populační genetiky na uvedeném vědeckém a odborném poli přineslo sice variabilní, nicméně často přijatelné hodnoty genetických parametrů použitelných pro selekci a šlechtění dojeného skotu ke zlepšení profilu MK. To otevírá cestu k úvahám o zlepšení přístupu k možnosti produkce specifických mléčných potravin s ambicemi funkčních potravin.

Klíčová slova: dojnice, mléko, mastné kyseliny, heritabilita, infračervená spektroskopie

Abstract

The milk fat content and its properties under fatty acid (FA) profile impact are an important indicator of the quality of milk and following dairy products. For the desired intervention into the profile of FAs and the increase of their health-promoting forms the nutrition of dairy cows is the most important factor. However, with the development of dairy analytical methods (infrared spectroscopy) more efficient research about the genetic parameters of the FA profile of milk fat has been made possible. Correlations for FA results between the reference and indirect methods are acceptable for many important FAs and their groups with testimony to the expected human health benefits. On this basis, the further study of population genetics in this scientific and professional field brought variable yet often acceptable values of genetic parameters useful for the selection and breeding of milked cattle to improve the FA profile. This opens the way to thinking about improving access to the possibility of producing specific dairy foods with the ambitions of functional foods.

Keywords: dairy cows, milk, fatty acids, heritability, infrared spectroscopy

Úvod

Obsah mléčného tuku a jeho vlastnosti podmíněné zastoupením mastných kyselin (MK) jsou důležitým ukazatelem kvality mléka i mléčných výrobků. S uvedeným souvisí i neméně významné ekonomické hledisko, neboť obsah tuku je pro výrobce mléka důležitým kritériem zhodnocení mléka. Rovněž pro zpracovatele mléka je tuk vedle bílkoviny hlavní složkou, jež ovlivňuje rentabilitu výroby. Aromatické látky navázané na tuk jsou určující z hlediska chuti, a tedy tuk významně přispívá k celkovému dojmu z daného mléčného produktu a může být rozhodující ve výběru konkrétních výrobků spotřebiteli.

Kromě složek příznivých a žádoucích, jsou často diskutovány i méně příznivé látky jako jsou například nasycené MK (SFA). V nazírání na poslední zmíněné hledisko dochází podobně jako u ostatních, řekněme poněkud kontroverznějších témat, k neustálému vývoji. I přesto, že byl za poslední období zdravotní aspekt MK značně přehodnocen (*German et al., 2009*), vysoké množství publikací na téma zdravotních benefitů a možností modifikace profilu MK mléčného tuku ve prospěch žádoucích MK a jejich skupin (nenasycené MK (UFA), zejména polynenasycené MK (PUFA) řady n-3) naznačuje, že téma zůstává stále aktuálním a neuzavřeným (*Barlowska et al., 2011 aj.*).

Donedávna bylo stanovení MK možné pouze s použitím referenční metody (GC, plynová chromatografie), která je však ekonomicky i časově vysoce náročná (např. *Hanuš et al., 2015*). S tím byla pochopitelně spojena i obtížnost při provádění plošných, resp. populačních analýz. Uvedený

problém vyřešilo až zavedení rutinní metody stanovení MK. U rutinní metody se uplatňuje potenciál infračervené (IR) spektroskopie ve středové oblasti vlnových délek IR záření (MIR, obvykle s technologií optických filtrů). Podobně jako u dalších minoritních složek mléka, např. *Hering et al. (2008)* - močovina, *Hanuš et al. (2014)* - aceton aj., se určuje profil celého IR spektra prostřednictvím Michelsonova interferometru s následným matematicko-statistickým vyhodnocením signálu Fourierovými transformacemi (MIR-FT). Metoda MIR, k jejímuž praktickému rozšíření došlo v 80. letech 20. století (*Griffiths a de Haseth, 1986*), značně usnadnila studium nejen samotného složení mléčného tuku (*Soyeurt et al., 2006; Coppa et al., 2010*), ale v souvislosti s tím podnítila rozvoj i dalších výzkumných oblastí (již v modifikaci MIR-FT), především genetiky.

Vzhledem k tomu, že mléčný tuk je v porovnání s ostatními složkami mléka mnohem více proměnlivý a velká variabilita byla zjištěna i v obsazích jednotlivých MK a jejich skupin, lze využívat genetické poznatky (zejména o heritabilitě) ve snaze ovlivnit cíleně složení tuku. Ačkoliv první práce o heritabilitě obsahu MK byly vypracovány před téměř 50 lety, skutečný rozmach nastal právě až s možností rozsáhlých analýz MK ve vzorcích mléka (*Samková, 2011*) s vyloučením dřívější náročné přípravy vzorků v podobě lyofilizace, extrakce a derivatizace. Markantní zefektivnění nastalo i díky možnosti využívání bohatých databází chovatelské evidence.

Cílem práce bylo shrnout současné výsledky studií zabývajících se odhady heritability pro významné MK a jejich skupiny, které byly stanoveny pomocí MIR-FT.

Materiál a metody

Prostřednictvím databáze Web of Science a sítě pro vědeckou komunitu Research Gate byly vyhledány dostupné studie vztahující se k heritabilitě MK mléčného tuku publikované od roku 2010 do března 2018. Klíčovými slovy byly: "genetické parametry nebo heritabilita", "mastné kyseliny", "mléko", "mid infrared" "skot nebo kráva".

Tab. 1 Přehled publikací použitých pro statistické vyhodnocení

| Zdroj | Počet | | | Plemeno ¹ | Země ² |
|--|---------|---------|-------|----------------------|-------------------|
| | vzorků | dojnic | býků | | |
| <i>Bastin et al., 2011</i> | 143,332 | 29,792 | | H | BE |
| <i>Bastin et al., 2013</i> | | 68,555 | | H | BE |
| <i>Poulsen et al., 2014</i> | | 371 | | H | DK |
| <i>Maurice-Van Eijndhoven et al., 2015</i> | 155,319 | 96,315 | | HF | NL |
| <i>Maurice-Van Eijndhoven et al., 2015</i> | 2,916 | 2,049 | | MRI | NL |
| <i>Penasa et al., 2015</i> | 72,848 | 17,873 | 1,235 | H | IT |
| <i>Petrini et al., 2016</i> | 36,457 | 4,203 | 226 | H | BR |
| <i>Vanrobays et al., 2016</i> | 241,236 | 33,555 | | H | BE |
| <i>Hein et al., 2018</i> | 95,920 | 21,967 | | J | DK |
| <i>Hein et al. 2018</i> | 612,321 | 132,731 | | H | DK |

¹ H - holštýnské, HF - holštýnsko-fríské, J - jerseyké, MRI - maas-rýn-iselské;

² BE - Belgie, BR - Brazílie, DK - Dánsko, IT - Itálie, NL - Nizozemí.

Pro výpočet průměrných hodnot byla použita dostupná data z publikací uvedených v tabulce 1.

Mastné kyseliny vyjádřené v g na 100 ml mléka byly přepočítané rovněž na obsah tuku, pokud tento byl v publikaci uveden, a to dle vzorce: $(A_n \cdot 100) / (B_n \cdot 0,95)$, kde A_n je hodnota MK vyjádřená v g/100 ml mléka, B_n je hodnota obsahu tuku v g/100 g mléka a 0,95 je koeficient přepočtu obsahu tuku na MK. K výpočtu popisných statistik byl použit program Statistika CZ 12 (StatSoft CR, s.r.o.).

Výsledky a diskuze

Obsahy MK v mléce

Při stanovení MK rutinní metodou (MIR-FT) se obvykle stanovují obsahově významné individuální MK: C14:0, C16:0, C18:0 a C18:1 a skupiny MK: 1) dle nasycenosti - SFA, UFA, mononenasyčené MK (MUFA), PUFA a 2) dle délky uhlíkového řetězce - MK s krátkým (SCFA), středním (MCFA) a dlouhým (LCFA) uhlíkovým řetězcem. Je třeba zdůraznit, že věrohodnost výsledků rutinní analýzy MK bude vždy záviset především na kvalitě kalibračních provedených podle výsledků referenční metody (GC). V zahraničí se touto problematikou zabývali např. *Soyeurt et al. (2006)*, *Maurice-Van Eijndhoven et al. (2013)*, *Ferrand-Calmels et al. (2014)*; v našich podmínkách *Hanuš et al. (2015)* a *Samková et al. (2015)*, přičemž bylo konstatováno, že většinu MK a jejich skupin lze stanovovat s poměrně vysokou mírou věrohodnosti.

Z tabulky 2 je patrné, že zcela ve shodě s literaturou (např. *Krag et al., 2013*) jsou vyšší variační koeficienty pro zjištěné obsahy (v g/100 ml mléka) u skupin UFA (9,0 %), MUFA (10,3 %) i PUFA (19,2 %) než u skupin SFA (8,1 %), SCFA (2,8 %), resp. MCFA (2,3 %). Obsahy MK a jejich skupin stanovené MIR-FT vyjádřené v g na 100 ml mléka odpovídají po přepočtu na g na 100 g tuku převážně údajům zastoupení MK stanovených referenční metodou. Průměrný obsah SFA byl 2,72 g/100 ml mléka (72,85 g/100 g tuku) a UFA 1,25 g/100 ml mléka (33,41 g/100 g tuku), tedy vypočítaný poměr SFA/UFA (2,176) odpovídá údajům, které ve svém přehledovém článku uvádějí *Kalač a Samková (2010)*.

Nicméně, z výsledků porovnání GC a MIR-FT u bazénových (*Hanuš et al., 2015*) a u individuálních vzorků mléka (*Samková et al., 2015*) vyplývá, že hodnoty MK zjištěné MIR-FT mohou být mírně nadhodnocené v porovnání s hodnotami zjištěnými GC.

Odhady heritability pro MK

Také z výsledků zjištěných při odhadech heritability pro MK a jejich skupiny vyplývá, že heritabilita (podobně jako variabilita v obsazích MK) souvisí především s nasyceností a délkou uhlíkového řetězce MK. Z individuálních MK měly vyšší heritabilitu C14:0 (0,36) a C16:0 (0,36) a ze skupin SFA (0,35), zatímco C18:1 (0,17), UFA (0,20), MUFA (0,19) a PUFA (0,23) měly heri-

Tab. 2 Průměrné hodnoty vybraných mastných kyselin (MK) a jejich skupin¹ vyjádřené v g/100 ml mléka, v g/100 g tuku a heritabilita pro uvedené MK

| | g/100 ml mléka | | | g/100 g tuku | | | heritabilita | | | | |
|-------|----------------|-------|--------|--------------|-------|--------|--------------|-------|-----------|-----------|--------|
| | \bar{x} | s_x | CV^2 | \bar{x} | s_x | CV^2 | \bar{x} | s_x | x_{min} | x_{max} | CV^2 |
| C14:0 | 0,48 | 0,01 | 2,6 | 12,38 | 0,32 | 2,6 | 0,36 | 0,18 | 0,07 | 0,68 | 50,1 |
| C16:0 | 1,19 | 0,16 | 13,2 | 31,44 | 2,91 | 9,3 | 0,36 | 0,14 | 0,14 | 0,67 | 37,2 |
| C18:0 | 0,43 | 0,61 | 18,2 | 11,97 | 3,26 | 27,2 | 0,23 | 0,13 | 0,09 | 0,60 | 54,7 |
| C18:1 | 0,80 | 0,01 | 1,1 | 20,85 | 0,46 | 2,2 | 0,17 | 0,11 | 0,07 | 0,52 | 67,7 |
| SFA | 2,72 | 0,22 | 8,1 | 72,85 | 2,40 | 3,3 | 0,35 | 0,15 | 0,10 | 0,68 | 42,5 |
| UFA | 1,25 | 0,11 | 9,0 | 33,41 | 1,39 | 4,2 | 0,20 | 0,14 | 0,07 | 0,60 | 68,6 |
| MUFA | 1,07 | 0,11 | 10,3 | 28,51 | 1,64 | 5,8 | 0,19 | 0,13 | 0,07 | 0,58 | 67,5 |
| PUFA | 0,16 | 0,03 | 19,2 | 4,25 | 0,76 | 18,0 | 0,23 | 0,16 | 0,08 | 0,69 | 70,6 |
| SCFA | 0,35 | 0,01 | 2,8 | 9,25 | 0,25 | 2,7 | 0,38 | 0,15 | 0,16 | 0,68 | 39,2 |
| MCFA | 2,17 | 0,05 | 2,3 | 56,48 | 1,32 | 2,3 | 0,39 | 0,17 | 0,12 | 0,68 | 42,5 |
| LCFA | 1,61 | 0,04 | 2,7 | 42,30 | 0,84 | 2,0 | 0,21 | 0,13 | 0,09 | 0,56 | 59,0 |

¹ SFA - nasycené MK, UFA - nenasycené MK, MUFA - mononenasycené MK, PUFA - polynenasycené MK, SCFA - MK s krátkým řetězcem, MCFA - MK se středně dlouhým řetězcem, LCFA - MK s dlouhým řetězcem; ² CV - variační koeficient (%) = $(s_x/\bar{x}) \cdot 100$

tabilitu nižší. Pro skupiny MK SCFA a MCFA byly zjištěny heritability 0,38 a 0,39, zatímco pro LCFA 0,21. Rozdílné hodnoty pravděpodobně souvisí s odlišným procesem syntézy MK <C16 a >C16, neboť obsahy MK s počtem uhlíků nad 16 ovlivňuje především výživa (Bauman a Griinari, 2003).

K obdobným závěrům dospěli při odhadech heritability také autoři, kteří při stanovení MK využili GC (Stoop et al., 2008; Garnsworthy et al., 2010). Skutečné porovnání obou metod provedl Poulsen et al. (2014), z jehož výsledků je patrné, že i když jsou hodnoty heritability pro obě metody (GC i MIR-FT) srovnatelné, u většiny MK byla v případě použití metody MIR-FT zjištěná heritabilita vyšší.

Je však třeba zdůraznit, že hodnoty heritability se v jednotlivých pracích značně liší, ať už byla použita metoda GC nebo MIR-FT. Tyto rozdíly jsou dány do souvislosti mimo jiné s rozdílným vyjádřením MK (např. Bobe et al. (2008) a Soyeurt et al. (2008) zjistili převážně vyšší heritabilitu pro MK v případě, že jejich množství byla vyjádřena nikoliv na 100 g tuku, ale na 100 g mléka, resp. v gramech na den), dále souvisí s použitým modelem při výpočtu heritability (Penasa et al., 2015; Petrini et al., 2016) a samozřejmě také s již zmíněnou metodou stanovení MK (Poulsen et al., 2014). Nejvýznamnější roli však bezesporu hraje struktura databáze, ze které se výsledky vypočítávají, tj. počet stád, plemen, dojnic, býků a analyzovaných vzorků mléka (Mele et al., 2009; Poulsen et al., 2014 aj.). Bastin et al. (2013) mimo jiné zjistili, že heritabilita se snižuje s počtem laktací, což však mohlo být ovlivněno právě počtem sledovaných zvířat.

Závěr

Ačkoliv pro intervenci do profilu mastných kyselin mléčného tuku, ve smyslu podpory vyššího výskytu jejich zdravotně prospěšných variant, lze za účinnou metodu na prvním místě pokládat příslušnou modifikaci výživy dojnic, také cesta selekce zvířat a jejich šlechtění je, v závislosti na zjištěných genetických parametrech, považo-

vána za možnou, resp. přínosnou. V tomto smyslu může dále podporně přispět i souběžný výzkum kandidátních genů genetického polymorfismu pro možnou dílčí determinaci výskytu mastných kyselin. Z provedeného meta-analytického hodnocení je zřejmé, že technologický vývoj analytických mlékařských metod otevřel cestu nových úvah a pozitivně přispěl k dalším možnostem a cestám produkce specifických mléčných výrobků s ambicemi funkčních potravin.

Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou Ministerstva zemědělství ČR (NAZV KUS QJ1510336) a Grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (GAJU 002/2016/Z).

Seznam literatury

- BARLOWSKA J., SZWAJKOWSKA M., LITWIŃCZUK Z., KRÓL J. (2011): Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 291-302.
- BASTIN C., SOYEURT H., GENGLER N. (2013): Genetic parameters of milk production traits and fatty acid contents in milk for Holstein cows in parity 1 - 3. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 130, 118-127.
- BASTIN C., SOYEURT H., VANDERICK S., GENGLER N. (2011): Genetic relationships between milk fatty acids and fertility of dairy cows. *Interbull Bulletin*, 44, 1-5.
- BAUMAN D.E., GRIINARI J.M. (2003): Nutritional Regulation of Milk Fat Synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 23, 203-227.
- BOBE G., BORMANN J.A.M., LINDBERG G.L., FREEMAN A.E., BEITZ D.C. (2008): Short communication: Estimates of genetic variation of milk fatty acids in US Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91, 1209-1213.
- COPPA M., FERLAY A., CHASSAING C., AGABRIEL C., GLASSER F., CHILLIARD Y., BORREANI G., BARCAROLO R., BAARS T., KUSCHE D., HARSTAD O.M., VERBIČ J., GOLECKÝ J., MARTIN B. (2013): Prediction of bulk milk fatty acid composition based on farming practices collected through on-farm surveys. *Journal of Dairy Science*, 96, 4179-4211.
- FERRAND-CALMELS M., PALHIÈRE I., BROCHARD M., LERAY O., ASTRUC J.M., AUREL M.R., BARBEY S., BOUVIER F., BRUNSCHWIG P., CAILLAT H. ET AL. (2014): Prediction of fatty acid profiles in cow, ewe, and goat milk by mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 97, 17-35.

- GARNSWORTHY P.C., FENG S., LOCK A.L., ROYAL M.D. (2010): Short communication: Heritability of milk fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase indices in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 1743-1748.
- GERMAN J.B., GIBSON R.A., KRAUSS R.M., NESTEL P., LAMARCHE B., VAN STAVEREN W.A., STEIJNS J.M., DE GROOT L., LOCK A.L., DESTAILLATS F. (2009): A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *European Journal of Nutrition*, 48, 191-203.
- GRIFFITHS P.H., DE HASETH J.A. (1986): *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. Wiley Interscience, New York, 656 s.
- HANUŠ O., ROUBAL P., ŘÍHA J., VYLETĚLOVÁ KLIMEŠOVÁ M., SAMKOVÁ E., JEDELSKÁ R., KOPECKÝ J. (2014): Development in indirect infrared determination of milk acetone. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 62, 919-927.
- HANUŠ O., SAMKOVÁ E., ŠPIČKA J., HASONOVÁ L., KALA R., KLÍMOVÁ Z., KOPUNECZ P., KOPECKÝ J. (2015): Porovnání metod používaných při stanovení zastoupení zdravotně významných mastných kyselin mléčného tuku v bazénových vzorcích mléka dojnic. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 151, 12-15.
- HEIN L., SORENSEN L.P., KARGO M., BUITENHUIS A.J. (2018): Genetic analysis of predicted fatty acid profiles of milk from Danish Holstein and Danish Jersey cattle populations. *Journal of Dairy Science*, 101, 2148-2157.
- HERING P., HANUŠ O., FRELICH J., PYTLOUN J., MACEK A., JANŮ L., KOPECKÝ J. (2008): Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech Journal of Animal Science*, 53, 64-76.
- KALÁČ P., SAMKOVÁ E. (2010): The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55, 521-537.
- KRAG K., POULSEN N.A., LARSEN M.K., LARSEN L.B., JANSS L.L., BUITENHUIS B. (2013): Genetic parameters for milk fatty acids in Danish Holstein cattle based on SNP markers using a Bayesian approach. *BMC Genetics*, 14, 79.
- MAURICE-VAN EIJNDHOVEN M.H.T., VEERKAMP R.F., SOYEURT H., CALUS M.P.L. (2015): Heritability of milk fat composition is considerably lower for Meuse-Rhine-Yssel compared to Holstein Friesian cattle. *Livestock Science*, 180, 58-64.
- MELE M., DAL ZOTTO R., CASSANDRO M., CONTE G., SERRA A., BUCCHIONI A., BITTANTE G., SECCHIARI P. (2009): Genetic parameters for conjugated linoleic acid, selected milk fatty acids, and milk fatty acid unsaturation of Italian Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 92, 392-400.
- PENASA M., TIEZZI F., GOTTARDO P., CASSANDRO M., DE MARCHI M. (2015): Genetics of milk fatty acid groups predicted during routine data recording in Holstein dairy cattle. *Livestock Science*, 173, 9-13.
- PETRINI J., IUNG L.H.S., RODRIGUEZ M.A.P., SALVIAN M., PERTILLE F., ROVADOSKI G.A., CASSOLI L.D., COUTINHO L.L., MACHADO P.F., WIGGANS G.R. ET AL. (2016): Genetic parameters for milk fatty acids, milk yield and quality traits of a Holstein cattle population reared under tropical conditions. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 133, 384-395.
- POULSEN N.A., ESKILDSEN C.E.A., SKOV T., LARSEN L.B., BUITENHUIS A.J. (2014): Comparison of genetic parameters estimation of fatty acids from gas chromatography and FT-IR in Holsteins. In: *Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*, Vancouver, Canada.
- SAMKOVÁ E. (2011): *Faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin mléčného tuku skotu*. České Budějovice: ZF JU. [Habilitation práce]. 60 s.
- SAMKOVÁ E., HANUŠ O., ŠPIČKA J., KALA R., KOUBOVÁ J., SMETANA P., HASONOVÁ L., KRÍŽOVÁ Z., KOPUNECZ P., KOPECKÝ J. (2015): Porovnání referenční a rutinní metody stanovení mastných kyselin mléčného tuku v individuálních vzorcích mléka dojnic - dílčí výsledky. *Náš chov*, 9, 74-76.
- SOYEURT H., DARDENNE P., DEHARENG F., BASTIN C., GENGLER N. (2008): Genetic parameters of saturated and monounsaturated fatty acid content, and the ratio of saturated to unsaturated fatty acids in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 91, 3611-3626.
- SOYEURT H., DARDENNE P., DEHARENG F., LOGNAY G., VESELKO D., MARLIER M., BERTOZZI C., MAYERES P., GENGLER N. (2006): Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 89, 3690-3695.
- STOOP W.M., VAN ARENDONK J.A.M., HECK J.M.L., VAN VALENBERG H.J.F., BOVENHUIS H. (2008): Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*, 91, 385-394.
- VANROBAYS M.L., BASTIN C., VANDENPLAS J., HAMMAMI H., SOYEURT H., VANLIERDE A., DEHARENG F., FROIDMONT E., GENGLER N. (2016): Changes throughout lactation in phenotypic and genetic correlations between methane emissions and milk fatty acid contents predicted from milk mid-infrared spectra. *Journal of Dairy Science*, 99, 7247-7260.

Kontaktní adresa:

doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.,
Katedra potravinářských biotechnologií
a kvality zemědělských produktů, Zemědělská fakulta,
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Studentská 809, 370 05 České Budějovice,
Česká republika, e-mail: samkova@zf.jcu.cz

Přijato do tisku: 22.5.2018

Lektorováno: 13.6.2018

NÁVRH PRACOVNÍHO POSTUPU IZOLACE CELKOVÉ BAKTERIÁLNÍ DNA Z DOHRÍVANÝCH SÝRŮ

Eva Šviráková¹, Irena Němečková², Jürgen Felsberg³

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

² Výzkumný ústav mlékárenský s. r. o.

³ Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

**Design of working procedure for the isolation
of total bacterial DNA from semi-hard and
hard cheeses**

Abstrakt

Z odborné literatury je známo, že izolace DNA z mlékařských výrobků je poměrně obtížná vzhledem k vysokému obsahu kationtů Ca²⁺, tuků a dalších látek, které brání působení enzymů nutných pro její úspěšnou izolaci. Na trhu existuje několik komerčních souprav pro izolaci bakteriální DNA z mlékařských výrobků, ovšem jejich výtěžnost je poměrně nízká a cena za izolaci vysoká. Vzhledem k tomu, že zastoupení případných zdravotně i technologicky nežádoucích bakterií bývá ve srovnání s celkovým složením bakteriální populace v mlékařských výrobcích minoritní, je zapotřebí použít takovou metodu izolace celkové bakteriální DNA, která zaručí získání dostatečného množství DNA o vysoké kvalitě. Tato práce přináší návrh nového postupu izolace celkové bakteriální DNA vyskytující se v sýrech polotvrdých a tvrdých, s různými obsahy sušiny a mléčného tuku, pro následnou

Příloha 6:

Hanusová, L., Čítek, J., Samková, E., **Kala, R.**, Křížová, Z., Hanuš, O. 2018. Frekvence polymorfismů v genech *DGATI*, *FASN*, *LEP* a *SCD1* v dojené populaci skotu v České republice (Polymorphism frequencies of *DGATI*, *FASN*, *LEP* and *SCD1* genes in milking cattle in the Czech Republic). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 170, 29(5): 31-34. (**J_{REC}**)

Webové stránky
<https://www.celostnimediceina.cz/jak-zdrave-zhubnout-jednou-provzdy-11-bilkoviny-zakladni-stavebni-kameny-tela.htm>
<http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92087.aspx>
<https://www.healthyeating.org/Milk-Dairy/Nutrients-in-Milk-Cheese-Yogurt/Nutrients-in-Cheese>
<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>

Kontakt: Prof. Ing. Květoslava Šustová, Ph.D.
 Vysoká škola obchodní a hotelová, s.r.o.
 Bosonožská 9, 625 00 Brno
 E-mail: Kvetoslavas@seznam.cz

Přijato do tisku: 23. 9. 2018
 Lektorováno: 10. 10. 2018

FREKVENCE POLYMORFISMŮ V GENECH *DGAT1*, *FASN*, *LEP* A *SCD1* V DOJENÉ POPULACI SKOTU V ČESKÉ REPUBLICE

Lenka Hanusová¹, Jindřich Čítek¹, Eva Samková¹,
 Robert Kala¹, Zuzana Křížová¹, Oto Hanuš²

¹ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
 Zemědělská fakulta

² Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

Polymorphism frequencies of *DGAT1*, *FASN*, *LEP* and *SCD1* genes in milking cattle in the Czech Republic

Abstrakt

Práce měla za cíl stanovit genotypové a alelové frekvence v genech *DGAT1*, *FASN*, *LEP* a *SCD1* v populaci krav v České republice. Analyzováno bylo 743 zvířat pro polymorfismy v genech *DGAT1*, *FASN* a *SCD1*, 631 pro gen *LEP*. Nejčtenějším zjištěným genotypem v genu

DGAT1 byl AA s frekvencí 0,960. Genotyp *LL* nebyl zjištěn a zcela převažovala alela *A* s frekvencí 0,980. V genu *FASN* výrazně převažoval genotyp *GG* (0,725). Nejméně četný genotyp *AA* byl zjištěn pouze u 2 jedinců. Pořadí genotypů v genu *LEP* podle frekvencí bylo *MM* (0,770), *MW* (0,190) a *WW* (0,040). Alela *M* byla v tomto genu výrazně převažující (0,865). V genu pro *SCD1* byly frekvence genotypů *CC* (0,279), *CT* (0,584) a *TT* (0,137), frekvence alel *C* (0,571), *T* (0,429).

Klíčová slova: dojnice, mléčný tuk, kandidátní geny, polymorfismus

Abstract

The aim was to set genotype and allele frequencies of *DGAT1*, *FASN*, *LEP* and *SCD1* genes in milking cattle of Czech Republic. In total 743 cows were analysed for polymorphisms in *DGAT1*, *FASN* and *SCD1*, and 631 for *LEP*. The most frequent genotype in *DGAT1* was AA (0.960), genotype *LL* was not present, and allele *A* was prevailing (0.980). As for *FASN*, genotype *GG* was prevailing (0.725), the fewest genotype *AA* was found in two animals only. The ranking of genotypes in *LEP* gene was *MM* (0.770), *MW* (0.190) and *WW* (0.040). In *SCD1* gene, the frequencies were *CC* (0.279), *CT* (0.584) and *TT* (0.137), allele frequencies *C* (0.571), *T* (0.429).

Keywords: dairy cows, milk fat, candidate genes, polymorphism

Úvod

Zvyšování výkonnosti a ekonomické efektivity patří k hlavním cílům nejen v chovu dojeného skotu, ale v zemědělství obecně. Jedním ze způsobů, jak vytyčeného cíle dosáhnout, je také nalezení výkonného a ekonomicky přínosného způsobu zvyšování mléčné produkce bez nutnosti nárůstu počtu chovaných dojnic. K tomuto účelu slouží opakovaný výběr jedinců s vhodným genetickým založením a jejich využití pro tvorbu nových generací. Klasické metody výběru nejvhodnějších jedinců na základě

Ilustrativní foto J. Sobišková



jejich výkonnosti jsou stále častěji doplňovány metodami, jejichž základem je stanovení genotypu ve vybraných genech se vztahem k požadovaným vlastnostem.

Vzhledem k ekonomickému významu mléčné produkce a zpracování mléka se v současné době genetický výzkum v oblasti dojeného skotu zaměřuje na genetické založení tvorby mléka a zdraví vemene. Výsledkem by mělo být především prokazatelné zlepšení mléčné produkce jako celku. Nicméně, pokrok především v oblasti genetického založení jedince ve vztahu ke kvalitativním vlastnostem mléka je relativně pomalý (Ogorevc et al., 2009).

V současné době narůstá počet genů, u nichž byla popsána asociace s mléčnou produkcí dojeného skotu a technologickými vlastnostmi mléka. Mezi slibné kandidátní lokusy lze ve zmiňované oblasti zařadit i lokusy *DGATI*, *FASN*, *LEP* a *SCDI* (Berry et al., 2010; Marques et al., 2011; Inostroza et al., 2013; Li et al., 2016; Houaga et al., 2018).

Tyto čtyři potenciální geny se známou fyziologickou funkcí byly vybrány pro studii, zaměřenou na zlepšení kvalitativních vlastností mléka v populaci krav v České republice. Předkládaná práce je pouze malou částí již provedených analýz a vyhodnocuje zastoupení jednotlivých genotypů a alel v uvedených genech. Současně zjištěné frekvence porovnává s frekvencemi stanovenými v jiných populacích.

Materiál a metody

Studie byla prováděna v pěti chovech na populaci krav, které byly převážně na 1. laktaci. Z plemenného hlediska byly v analyzovaném souboru zastoupeny dojnice českého strakatého skotu (35 %), holštýnského skotu (44 %) a skupina kříženek (21 %), kde převažovaly kříženky českého strakatého skotu (87 %). V rámci studie byly stanovovány genotypy ve čtyřech genech, a to pro diacylglycerol O-acyltransferázu 1 (*DGATI*), syntázu mastných kyselin (*FASN*) a stearoyl CoA desaturázu (*SCDI*), u všech $n=743$ a leptin (*LEP*) $n=631$.



Od dojnic, zahrnutých do studie, byly odebrány vzorky mléka, byla provedena izolace DNA pomocí automatického izolátoru DNA MagCore HF16 Plus (RBC Bioscience). Izolace probíhala podle návodu výrobce za použití izolačních kitů MagCore DNA Whole Blood Kit a MagCore Genomic DNA Tissue Kit (RBC Bioscience). Kvalita a kvantita izolované DNA byla ověřována elektroforeticky a spektrofotometricky.

Genotypizace všech lokusů byly provedeny metodou PCR/RFLP. Metodiky jednotlivých genotypizací vycházely z následujících studií. Gen *DGATI* byl prováděn podle metodiky Kuhn et al. (2004), gen *FASN* podle Roy et al. (2006), gen *LEP* podle Buchanan et al. (2002) a gen *SCDI* dle Inostroza et al. (2013). Výsledné genotypy byly stanoveny elektroforeticky. Ze stanovených genotypů byly vypočteny genotypové a alelové frekvence. Genetická rovnováha byla ověřena χ^2 testem.

Výsledky a diskuze

Nejčtenějším genotypem *DGATI* byl AA (0,960), genotyp LA měl četnost 0,040. Genotyp LL nebyl zjištěn ani u jedné dojnice (Tabulka 1). Podobné výsledky byly zjištěny ve studii Pannier et al. (2010). Z devíti studovaných masných plemen se genotyp LL vyskytl pouze u dvou, a to v minimálních frekvencích. Těmito plemeny byly charolais (0,045) a fríský skot (0,036). Nejčastěji se vyskytujícím genotypem u všech studovaných plemen byl shodně s naší studií AA. Existuje však řada studií, v nichž byly genotypové frekvence odlišné od našich. Například v práci Kaupé et al. (2007) byl nejčtenějším genotyp LA (0,51), dále AA (0,31) a nejméně četným genotyp LL (0,16). Szyda a Komisarek (2007) dokonce popsali jako nejčtenější genotyp LL s frekvencí 0,45. Genotypy LA a AA v jejich studii měly téměř stejnou četnost výskytu (0,26, resp. 0,27).

V námi studované populaci velmi výrazně převažovala alela A, jejíž frekvence dosahovala hodnoty 0,98. Tyto výsledky by mohly odkazovat na vysokou prošlechtěnost studované populace v lokusu *DGATI*. Carvajal et al. (2016) genotypizovali *DGATI* u pěti plemen skotu, alela A byla převažující u čtyř z nich včetně holštýnského skotu. U plemene jersey byla převažující alela L (0,72). Frekvence

Tab. 1 Frekvence alel a genotypů u dojených plemen českého strakatého a holštýnského skotu v ČR

| DGAT1 | | | | | |
|---------|-----|-----------|---------------------|-------|-----------|
| Genotyp | n | Frekvence | χ^2 | Alela | Frekvence |
| AA | 713 | 0,960 | 0,003 ^{ns} | A | 0,980 |
| LA | 30 | 0,040 | | L | 0,020 |
| LL | 0 | - | | | |
| FASN | | | | | |
| Genotyp | n | Frekvence | χ^2 | Alela | Frekvence |
| AA | 2 | 0,003 | 1,838 ^{ns} | A | 0,139 |
| AG | 202 | 0,272 | | G | 0,861 |
| GG | 539 | 0,725 | | | |
| LEP | | | | | |
| Genotyp | n | Frekvence | χ^2 | Alela | Frekvence |
| MM | 486 | 0,770 | 3,548 ^{ns} | M | 0,865 |
| MW | 120 | 0,190 | | W | 0,135 |
| WW | 25 | 0,040 | | | |
| SCD1 | | | | | |
| Genotyp | n | Frekvence | χ^2 | Alela | Frekvence |
| CC | 207 | 0,279 | 3,681 ^{ns} | C | 0,571 |
| CT | 434 | 0,584 | | T | 0,429 |
| TT | 102 | 0,137 | | | |

^{ns} non-significant

u holštýnského, jerseykého a montbeliardského plemene se nelišila od frekvencí zjištěných v dřívějších studiích (Berry et al., 2010). Oproti tomu ve studiích Szyda a Komisarek (2007) a Kaupe et al. (2007) byla jako čtenější stanovena alela *L*. Její frekvence se pohybovala v jednotlivých studiích mezi 0,62 a 0,54. Zajímavostí je, že všechny uvedené studie byly prováděny na populacích holštýnského skotu.

V genu *FASN* byl jako nejčastější zjištěn genotyp *GG*. Genotyp *AA* měl minimální frekvenci pouze 0,003. Pochopitelně alela *G* převažovala s frekvencí 0,870. Genotyp *GG* byl jako převažující s frekvencí 0,599 popsán rovněž Bartoněm et al. (2016), alelové frekvence odpovídaly frekvencím zjištěným u námi studované populace. Odlišné

výsledky uvádí Hayakawa et al. (2015) u japonského černého skotu, *AA* (0,68), *AG* (0,29) a *GG* (0,03). Potvrdili tak dřívější výsledky uváděné Matsuhashi et al. (2011).

Dalším genem, u něhož byly v této části studie stanoveny genotypy, byl *LEP*. I v tomto genu výrazně dominoval jeden genotyp, a to *MM*. Nejméně čteným byl genotyp *WW* s frekvencí pouhých 0,040. Alelové frekvence plně odpovídaly frekvencím genotypovým, alela *M* měla frekvenci 0,865 a výrazně tak převažovala nad frekvencí alely *W*. Tyto výsledky odpovídaly studii da Silvy et al. (2012), u plemene nellore měl nejčtenější genotyp *MM* frekvenci 0,876, *MW* (0,119) a *WW* (0,05). V další práci (Silva et al., 2014) byly genotypové frekvence posunuty směrem k heterozygotnímu genotypu *MW* (0,54). Podobné alelové frekvence popsala i Trakovická et al. (2012) u slovenského strakatého a pinzgavského skotu. Odlišné výsledky zjistili u holštýnského skotu Chebel et al. (2008), nejčtenějším genotypem byl *MW* (0,482) a nejméně čteným genotypem *MM* (0,172).

V genu *SCD1* převažovaly heterozygotní genotypy *CT* (0,584) a alela *C* (0,571). Inostroza et al. (2013) uvádí frekvenci genotypů *CC* (0,384), *CT* (0,472) a *TT* (0,144), alel *C* (0,620) a *T* (0,380). Alela *C* je spojována s vyšší enzymatickou aktivitou a koncentrací mononenasyčených mastných kyselin (MUFA) v mléčném tuku (Milanesi et al., 2007). *SCD1* spolu s *FASN* jsou považovány za klíčové geny v syntéze MUFA, přičemž role *SCD1* v desaturaci mastných kyselin může být epistaticky ovlivňována genotypem na *FASN* a vice versa (Kim a Ntambi, 1999; Li et al., 2011). Všechny geny byly ve sledované skupině dojníc v Hardy-Weinbergově rovnováze.

Závěr

Byla provedena genotypizace a stanoveny alelové a genotypové frekvence u genů *DGAT1*, *FASN*, *LEP* a *SCD1* v populaci dojníc v České republice. Zjištěné výsledky byly porovnány s frekvencemi genotypů a alel



Ilustrativní foto J. Sobišková



stejných lokusů u populací, chovaných v různých zemích. V další fázi výzkumu bude provedena asociační analýza vlivu polymorfních variant na produkci mléka, syntézu mléčného tuku a spektrum mastných kyselin.

Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou Ministerstva zemědělství ČR (NAZV KUS QJ1510336) a Grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (GAJU 002/2016/Z).

Seznam literatury

- BARTOŇ L., BUREŠ D., KOTT T., ŘEHÁK D. (2016): Association of polymorphisms in bovine *DGAT1*, *FABP4*, *FASN* and *PPARGC1A* genes with intramuscular fat content and the fatty acid composition of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Science*, 114, s. 18-23.
- BERRY D.P., HOWARD D., BOYLE P.O., WATERS S., KEARNEY J.F., MCCABE M. (2010): Associations between the K232A polymorphism in the diacylglycerol-O-transferase 1 (*DGAT1*) gene and performance in Irish Holstein-Friesian dairy cattle. *Irish Journal of Agricultural & Food Research*, 49, s. 1-9.
- BUCHANAN F.C., FITZSIMMONS C.J., VAN KESSEL A.G., THUE T.D., WINKELMAN-SIM D.C., SCHMUTZ S.M. (2002): Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*, 34, s. 105-116.
- CARVAJAL A.M., HUIRCAN P., DEZAMOUR J.M., SUBIABRE I., KERR B., MORALES R., UNGERFELD E.M. (2016): Milk fatty acid profile is modulated by *DGAT1* and *SCD1* genotypes in dairy cattle on pasture and strategic supplementation. *Genetics and Molecular Research*, 15, 2.
- DA SILVA R.C., FERRAZ J.B.S., MEIRELLES F.V., ELER J.P., BALEIRO J.C.C., CUCCO D.C., MATTOS E.C., REZENDE F.M., SILVA S.L. (2012): Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin and leptin receptor genes with growth and ultrasound carcass traits in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*, 11, s. 3721-3728.
- HAYAKAWA K., SAKAMOTO T., ISHII A., YAMAJI K., UEMOTO Y., SASAGO N., KOBAYASHI E., KOBAYASHI N., MATSUHASHI T., MARUYAMA S., MATSUMOTO H., OYAMA K., MANNEN H., SASAZAKI S. (2015): The g.841G-C SNP of *FASN* gene is associated with fatty acid composition in beef cattle. *Animal Science Journal*, 86, s. 737-746.
- HOUAGA I., MUIGAI A.W.T., NG ANG A.F.M., IBEAGHA-AWEMU E.M., KYALLO M., YOUSAO I.A.K., STOMELO F. (2018): Milk fatty acid variability and association with polymorphisms in *SCD1* and *DGAT1* genes in White Fulani and Borgou cattle breeds. *Molecular Biology Reports*, [Epub ahead of print].
- CHEBEL R.C., SUSCA F., SANTOS J.E. (2008): Leptin genotype is associated with lactation performance and health of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91, s. 2893-2900.
- INOSTROZA K.B., SCHEUERMANN E.S., SEPULVEDA N.A. (2013): Stearoyl CoA desaturase and fatty acid synthase gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Chilean Black Friesian cows. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26, s. 263-269.

- KAUPE B., BRANDT H., PRINZENBERG E.M., ERHARDT G. (2007): Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction and productive lifespan in German Holstein cattle. *Journal of Animal Science*, 85, s. 11-21.
- KIM Y.C., NTAMBI J.M. (1999): Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266, s. 1-4.
- KUHN C., THALLER G., WINTER A., BININDA-EDMONDS O.R.P., KAUPE B., ERHARDT G., BENNEWITZ J., SCHWERIN M., FRIES R. (2004): Evidence for multiple alleles at the *DGAT1* locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics*, 167, s. 1873-1881.
- LI C., ALDAI N., VINSKY M., DUGAN M.E., MCALLISTER T.A. (2011): Association analyses of single nucleotide polymorphisms in bovine stearoyl-CoA desaturase and fatty acid synthase genes with fatty acid composition in commercial cross-bred beef steers. *Animal Genetics*, 43, s. 93-97.
- LI C., SUN D., ZHANG S., YANG S., ALIM M.A., ZHANG Q., LI Y., LIN L. (2016): Genetic effects of *FASN*, *PPARGC1A*, *ABCG2* and *IFG1* revealing the association with wide fatty acids in a Chinese Holstein cattle population based on a post genome-wide association study. *BMC Genetics*, 17, s. 110-125.
- MARQUES E., GRANT J.R., WANG Z., KOLBEHDARI D., STOTHARD P., PLACHOW G., MOORE S. (2011): Identification of candidate markers on bovine chromosome 14 (BTA14) under milk production quantitative trait loci in Holsteins. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 128, s. 305-313.
- MATSUHASHI T., MARUYAMA S., UEMOTO Y., KOBAYASHI N., MANNEN H., ABE T., SAKAGUCHI S., KOBAYASHI E. (2011): Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science*, 89, s. 12-22.
- MILANESI E., NICOLOSO L., CREPALDI P. (2007): Stearoyl CoA desaturase (SCD) gene polymorphisms in Italian cattle breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125, s. 63-67.
- OGOREVC J., KUNEJ T., RAZPET A., DOVC P. (2009): Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics*, 40, s. 832-851.
- PANNIER L., MULLEN A.M., HAMILL R.M., STAPLETON P.C., SWEENEY T. (2010): Association analysis of single nucleotide polymorphisms in *DGAT1*, *TG* and *FABP4* genes and intramuscular fat in crossbred Bos taurus cattle. *Meat Science*, 85, s. 515-518.
- ROY R., ORDOVAS L., ZARAGOSA P., ROMERO A., MORENO C., ALTARIBA J., RODELLAR C. (2006): Association of polymorphisms in the bovine *FASN* gene with the milk fat content. *Animal Genetics*, 37, s. 215-218.
- SILVA D.B., CRISPIM B.A., SILVA L.E., OLIVEIRA J.A., SIQUEIRA F., SENO L.O., GRISOLIA A.B. (2014): Genetic variations in the leptin gene associated with growth and carcass traits in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*, 13, s. 3002-3012.
- SZYDA J., KOMISAREK J. (2007): Statistical modeling of candidate gene effects on milk production traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 90, s. 2971-2979.
- TRAKOVICKÁ A., MORAVČIKOVÁ N., KASARDA R. (2013): Genetic polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction trait in cattle. *Acta Biochimica Polonica*, 60, s. 73-787.

Kontaktní adresa: doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.,
Katedra potravinářských biotechnologií a kvality
zemědělských produktů, Zemědělská fakulta,
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Studentská 809, 370 05 České Budějovice,
Česká republika, e-mail: samkova@zf.jcu.cz

Přijato do tisku: 23. 9. 2018

Lektorováno: 10. 10. 2018

Příloha 7:

Kala, R., Samkova, E., Citek, J., Hasonova, L., Hanusova, L., Tothova, L. 2017. Association of selected genes with milk fat in two breeds of cattle. In: *24th International PhD Students Conference MendelNet 2017*. Brno, 8-9 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 696-701. ISBN 978-80-7509-529-9 **(D)**

ASSOCIATION OF SELECTED GENES WITH MILK FAT IN TWO BREEDS OF CATTLE

ROBERT KALA¹, EVA SAMKOVA¹, JINDRICH CITEK², LUCIE HASONOVA¹,
LENKA HANUSOVA², LUCIE TOTHOVA²

¹Department of Food Biotechnology and Agricultural Products Quality

²Department of Animal Husbandry Sciences

University of South Bohemia in Ceske Budejovice

Studentska 1668, 370 05 Ceske Budejovice

CZECH REPUBLIC

kalarobert@seznam.cz

Abstract: The aim of the work was to evaluate genotype and allelic frequencies of selected genes affecting milk fat synthesis and to investigate possible association between gene polymorphisms and milk production traits. For this purpose, the analysis of *DGATI* (diacylglycerol acyltransferase 1), *FASN* (fatty acid synthase) and *LEP* (leptin) was carried out on 754 dairy cows distributed in five farms located in the Czech Republic. The tested animals were divided into three groups: Czech Fleckvieh (CF; n=266), Holstein (H; n=329) and crossbreeds (CB; n=159, with 87% of CF crossbreeds). The dominant genotypes for all observed groups were: AA genotype for *DGATI* gene (0.962, 0.973 and 0.912; $p < 0.01$), GG genotype for *FASN* gene (0.770, 0.662 and 0.774; $p < 0.01$), and MM genotype for *LEP* gene (0.714, 0.783 and 0.826; $p > 0.05$). The evaluation of milk production traits in the first lactation has shown, that the highest fat yield was found out in dairy cows with genotypes AA (327 kg), AG (330 kg) and MM (328 kg). The differences were statistically significant only for *DGATI* gene. These results suggested, that milk from dairy cows with *DGATI* gene A allelic variant would be more appropriate for the production of dairy products (butter, cheeses).

Key Words: *DGATI*, *FASN*, *LEP*, milk fat, genetic polymorphism

INTRODUCTION

The content, composition, as well as physical-chemical properties of milk fat are important aspects in the production of dairy products. In comparison with other milk constituents, milk fat is the most variable compound, mainly influenced by feed factors (Kalac and Samkova 2010). Nevertheless, animal factors including genetic variability between -and within- breed have been also extensively studied over the last decades (Soyeurt et al. 2006, Samkova et al. 2012). The knowledge of genetic relationships plays a key role here (Goddard 2001, Dekkers 2012).

Milk fat belongs to quantitative traits whose composition and content are controlled by numerous genes. Among genes involved of milk fat biosynthesis belongs for example *DGATI* (diacylglycerol acyltransferase 1), *GH* (growth-hormone), *GHR* (growth-hormone receptor), *SCD1* (stearoyl-CoA desaturase 1) – Buitenhuis et al. (2014) and Fontanesi et al. (2014), *FASN* (fatty acid synthase) – Alim et al. (2014), *LEP* (leptin) – Tomka et al. (2016).

DGATI gene encodes diacylglycerol O-acyltransferase 1, enzyme that catalyzes final step in biosynthesis process of triacylglycerols (TAGs) – Ibeagha-Awemu et al. (2008). TAGs, the main component of milk fat, are composed of glycerol and fatty acid (FA) esters. *DGATI* gene is particularly associated with content of milk fat. Furthermore, according to Nafikov et al. (2014), mutations in acyltransferase genes might change their specificity for particular FA. It leads to changes in composition of milk fat, e.g. dinucleotide alleles of *DGATI*: g.10433–10434 AA>GC mutation. This mutation results in substitution of lysine to alanine (K232A) in final protein (Grisart et al. 2002). Schennink et al. (2008) showed, that A allele was associated with a higher proportion of C18:1c9 (oleic acid), which is important from technological point of view (Hillbrink and Augustin 2002).

FASN gene encodes fatty acid synthase, a multifunctional enzyme that catalyses *de novo* synthesis of FA in mammals (Lock and Garnsworthy 2003). *FASN* gene, which is considered as

a probable candidate gene for milk production traits, is located within a linkage region harbouring quantitative trait loci (QTL) for milk fat (Alim et al. 2014). The studies on the bovine *FASN* gene structure have revealed occurrence of several single nucleotide polymorphisms (SNPs) linked to the fat content and FA composition in milk (Roy et al. 2006).

Also *LEP* gene is considered as a potential QTL, influencing different production traits in cattle, including fat content (Buchanan et al. 2003). SNP in *LEP* gene is associated with content and yield of fat and protein, milk yield or some reproductive traits (Tomka et al. 2016). Madeja et al. (2004) showed that the *LEP HphI* gene polymorphism, C>T substitution of bases resulting in a change from alanine to valine (Haegeman et al. 2000) had an effect on the breeding value of milk production.

The aim of this work was to evaluate genotype and allelic frequencies of selected genes affecting milk fat synthesis in Czech Fleckvieh, Holstein and crossbreds and to investigate possible association between gene polymorphisms and milk production traits among cows in the first lactation.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

The analysis of selected genes (*DGATI*, *FASN*, *LEP*) was carried out on 754 dairy cows distributed in five farms located in the Czech Republic. The tested animals were divided into three groups: 266 of Czech Fleckvieh (CF), 329 of Holstein (H) and 159 of crossbreds with prevailing of CF crossbreds (87%).

Data for 305-day milk production from the first lactation including overall milk yield (kg), milk fat yield (kg), milk protein yield (kg) as well as contents of these components were collected from the official farm records based on monthly milking tests.

DNA extraction, amplification and sequencing

Genomic DNA from milk samples was isolated by Automated Nucleic Acid Extractor MagCore®HF16 Plus (RBC Bioscience Corp., Taiwan) with the aid of commercial blood kits. The genotyping of *A* and *L* alleles in *DGATI*, *A* and *G* alleles in *FASN* and *M* and *W* alleles in *LEP* locus was done by the PCR-RFLP methods. PCR was done on a thermocycler Biometra T-1 Thermoblock (Biometra, Germany). For RFLP analysis, the amplified DNA was digested with restriction enzymes specific for tested gene (Table 1).

Table 1 Characteristics of tested genes and parameters of PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) analysis

| Gene | Number of sampling | Product size (bp) | Primer sequences | RE ¹ |
|--------------|--------------------|-------------------|--|-----------------|
| <i>DGATI</i> | 754 | 411 | F 5' - CAA GGC CAA GGC TGG TGA G - 3' R 5' - GGG GGC GAA GAG GAA GTA GTA G - 3' | <i>CfrI</i> |
| <i>FASN</i> | 752 | 382 | F 5' - AGA GCT GAC GGA CTC CAC AC - 3' R 5' - GCC GAT GCA CTC GAT GTA G - 3' | <i>MscI</i> |
| <i>LEP</i> | 643 | 331 | F 5' - GGG AAG GGC AGA AAG ATA G - 3' R 5' - TGG CAG ACT GTT GAG GAT C - 3' | <i>HphI</i> |

Legend: ¹RE – restriction endonuclease; *DGATI* – diacylglycerol acyltransferase 1, *FASN* – fatty acid synthase, *LEP* – leptin;

The individual fragments were separated by electrophoresis on an agarose gel with ethidium bromide and genotyped on a UV transilluminator in 302 nm wavelength.

Statistical analysis

The allele frequencies were calculated by simple allele counting. The differences between observed and expected frequencies of genotypes were tested using a χ^2 test in order to verify Hardy-Weinberg equilibrium.

Statistical analysis was done using the Statistica CZ 12 (Statsoft CR). Chi-squared test was used to compare the differences in genotype frequencies among the breeds. ANOVA and Student *t*-test were used to evaluate differences in milk production traits among the different genotypes.

RESULTS AND DISCUSSION

Gene frequency

Genetic variability is useful tool for breeding programmes. The degree of genetic variability is expressed by genotype and allelic frequencies. These frequencies were determined in the groups of purebred (CF and H) and in the group of their crossbreds. For the *DGATI* gene and *FASN* gene, statistically significant differences in genotype frequencies among breeds were found. The differences in *LEP* gene were not significant for these breeds (Table 2). The dominant genotypes for all observed groups were: *AA* genotype for *DGATI* gene (0.962, 0.973 and 0.912; $p < 0.01$), *GG* genotype for *FASN* gene (0.770, 0.662 and 0.774; $p < 0.01$), and *MM* genotype for *LEP* gene (0.714, 0.783 and 0.826; $p > 0.05$).

Between the Holstein and Czech Fleckvieh purebred animals, the highest difference in relative frequencies of the dominant alleles was found in *FASN* gene (0.883 and 0.831). No differences were found in *DGATI* gene (0.981 and 0.986). The crossbreds differed particularly in *LEP* gene. The relative frequency of dominant allele *M* was in this group 0.902, whereas 0.835 and 0.870 for CF and H. The breeds were in Hardy-Weinberg equilibrium for all the polymorphisms studied.

The genotype and allelic frequencies of *DGATI*, *FASN* and *LEP* gene among various breeds (Holstein, Brown Swiss, Simmental, Swedish Red) were studied by several authors (Dokso et al. 2015, Tomka et al. 2016, Näslund et al. 2008 etc.). These authors also found out, that the relative frequencies among breeds differed. Milanese et al. (2008) suggested, that observed and expected allelic frequencies could be associated with different selective purpose of breeds.

Polymorphism and milk production traits

Economically, fat and protein yield are important traits for production of dairy products. These traits were influenced mainly by milk yield, which values widely varied among genotypes of genes analysed in our group (Table 3). For the *DGATI* gene, statistically significant differences were found out. The differences in *FASN* and *LEP* genes were not significant. The highest values of milk yield were found for *DGATI* gene in genotype *AA* (7955 kg; $p < 0.05$), for *FASN* gene in genotype *AG* (8030 kg) and for *LEP* gene in genotype *MM* (7989 kg). The values of fat and protein yield were also statistically significant for *DGATI* gene in genotype *AA* (326.8 kg and 272.7 kg, respectively; $p < 0.05$).

Association between genotypes and milk production traits was confirmed by several authors (Buchanan et al. 2003, Roy et al. 2006, Selvaggi et al. 2017). Dokso et al. (2015) found out, that dairy cows with *LA* genotype in *DGATI* gene produced more milk compared to *AA* genotype. However, the observed differences were not significant. On the other hand, many authors (e.g. Thaller et al. 2003, Oikonomou et al. 2008) observed a positive effect of allele *A* in *DGATI* gene on milk yield. Ciecierska et al. (2013) showed, that milk obtained from cows with the *FASN* gene with genotype *AA* was characterized by higher fat content. This was confirmed also by Schennink et al. (2009). Authors described, that milk collected from dairy cows with genotype *AA* was characterized by higher fat content than milk from dairy cows with *GG* genotype. Our results do not correlated with these authors. In our group statistically significant differences were not found for *FASN* gene. For *LEP* gene, the differences were also not statistically significant.

CONCLUSION

The genotype and allelic frequencies statistically differ among the groups of Czech Fleckvieh, Holstein and their crossbreds. For milk production traits (milk, fat and protein yield), statistically significant differences were found in *DGATI* gene. The results showed, that there happened the selection in favour of *AA* genotype and *A* allele respectively, as they are linked with higher milk and protein yield in the dairy cattle.

Table 2 Frequencies of genes *DGATI* (diacylglycerol acyltransferase 1), *FASN* (fatty acid synthase) and *LEP* (leptin) according to group of dairy cows

| | Breed | | | | | | | | | | | | P | | | |
|------------------------|---------------------|-------|--------|-------|---------------------|-------|--------|-------|--------------------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | Czech Fleckvieh | | | | Holstein | | | | Crossbreeds ¹ | | | | | | | |
| | Genotype | | Allele | | Genotype | | Allele | | Genotype | | Allele | | | | | |
| <i>DGATI</i> (n = 754) | AA | LA | LL | A | L | AA | LA | LL | A | L | AA | LA | LL | A | L | |
| Observed | 256 | 10 | 0 | 522 | 10 | 320 | 9 | 0 | 649 | 9 | 145 | 14 | 0 | 304 | 14 | |
| Relative | 0.962 | 0.038 | - | 0.981 | 0.019 | 0.973 | 0.027 | - | 0.986 | 0.014 | 0.912 | 0.088 | - | 0.956 | 0.044 | 0.0074** |
| Expected | 0.962 | 0.037 | 0 | - | - | 0.972 | 0.028 | 0 | - | - | 0.914 | 0.084 | 0.002 | - | - | |
| χ^2 | 0.003 ^{ns} | | | | 0.004 ^{ns} | | | | 0.219 ^{ns} | | | | | | | |
| <i>FASN</i> (n = 752) | GG | AG | AA | G | A | GG | AG | AA | G | A | GG | AG | AA | G | A | |
| Observed | 204 | 60 | 1 | 468 | 62 | 217 | 111 | 0 | 545 | 111 | 123 | 35 | 1 | 281 | 37 | |
| Relative | 0.770 | 0.226 | 0.004 | 0.883 | 0.117 | 0.662 | 0.338 | 0 | 0.831 | 0.169 | 0.774 | 0.220 | 0.006 | 0.884 | 0.116 | 0.0083** |
| Expected | 0.780 | 0.207 | 0.014 | - | - | 0.691 | 0.281 | 0.029 | - | - | 0.781 | 0.205 | 0.013 | - | - | |
| χ^2 | 0.889 ^{ns} | | | | 4.057 ^{ns} | | | | 0.487 ^{ns} | | | | | | | |
| <i>LEP</i> (n = 643) | MM | MW | WW | M | W | MM | MW | WW | M | W | MM | MW | WW | M | W | |
| Observed | 160 | 54 | 10 | 374 | 74 | 220 | 49 | 12 | 489 | 73 | 114 | 21 | 3 | 249 | 27 | |
| Relative | 0.714 | 0.241 | 0.045 | 0.835 | 0.165 | 0.783 | 0.174 | 0.043 | 0.870 | 0.130 | 0.826 | 0.152 | 0.022 | 0.902 | 0.098 | 0.1232 |
| Expected | 0.697 | 0.276 | 0.027 | - | - | 0.757 | 0.226 | 0.017 | - | - | 0.814 | 0.177 | 0.010 | - | - | |
| χ^2 | 1.644 ^{ns} | | | | 5.174 ^{ns} | | | | 1.793 ^{ns} | | | | | | | |

Legend: ¹crossbreeds with prevailing of CF crossbreeds (87%); P significance of differences among breeds; **P<0.01; χ^2 – chi-square test among relative and expected genotype frequencies; ^{ns}non-significant;

Table 3 Milk production traits ($\bar{x} \pm s_x$) of different genotypes of *DGAT1* (diacylglycerol acyltransferase 1), *FASN* (fatty acid synthase) and *LEP* (leptin) genes in dairy cows¹

| | <i>DGAT1</i> | | | <i>FASN</i> | | | <i>LEP</i> | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|----|-------------|--------|--------|-------------------|-------------------|---------|
| | | | | | | | | | |
| n | 704 | 33 | - | 537 | 196 | 2 | 482 | 119 | 25 |
| Genotype | AA | LA | LL | GG | AG | AA | MM | MW | WW |
| DIM ² | 294 | 291 | | 293 | 294 | 291 | 295 | 292 | 284 |
| | ± 30 | ± 28 | | ± 30 | ± 30 | ± 20 | ± 29 | ± 24 | ± 59 |
| Milk yield (kg) | 7955 ^a | 7153 ^b | - | 7886 | 8030 | 5632 | 7989 | 7725 | 7482 |
| | ± 2163 | ± 2075 | | ± 2155 | ± 2195 | ± 1641 | ± 2153 | ± 2011 | ± 2654 |
| Fat yield (kg) | 326.8 ^a | 288.2 ^b | - | 323.6 | 329.6 | 252.5 | 327.9 | 317.7 | 311.2 |
| | ± 87.1 | ± 84.6 | | ± 87.4 | ± 87.4 | ± 58.7 | ± 85.5 | ± 85.0 | ± 113.0 |
| Fat (%) | 4.12 | 4.02 | - | 4.11 | 4.12 | 4.53 | 4.12 | 4.12 | 4.11 |
| | ± 0.33 | ± 0.30 | | ± 0.33 | ± 0.33 | ± 0.28 | ± 0.33 | ± 0.34 | ± 0.40 |
| Protein yield (kg) | 272.7 ^a | 244.6 ^b | - | 270.9 | 273.3 | 202.5 | 272.7 | 267.6 | 257.2 |
| | ± 65.2 | ± 60.0 | | ± 65.2 | ± 65.6 | ± 50.2 | ± 64.9 | ± 61.3 | ± 84.4 |
| Protein (%) | 3.46 | 3.47 | - | 3.47 | 3.44 | 3.62 | 3.45 ^b | 3.50 ^a | 3.48 |
| | ± 0.23 | ± 0.26 | | ± 0.23 | ± 0.22 | ± 0.17 | ± 0.23 | ± 0.21 | ± 0.24 |

Legend: ¹Czech Fleckvieh, Holstein and crossbreeds; ²DIM – days in milk; ^{a,b}means with different superscripts in row differ within genotypes of each gene at $p < 0.05$;

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (No. QJ1510336) and the Grant Agency of University of South Bohemia (GAJU-002/2016/Z).

REFERENCES

- Alim, M.A., Fan, Y.P., Wu, X.P., Xie, Y., Zhang, Y., Zhang, S.L., Sun, D.X., Zhang, Y., Zhang, Q., Liu, L., Guo, G. 2012. Genetic effects of stearoyl-coenzyme A desaturase (SCD) polymorphism on milk production traits in the Chinese dairy population. *Molecular Biology Reports*, 39(9): 8733–8740.
- Buchanan, F.C., van Kessel, A.G., Waldner, C., Christensen, D.A., Laarveld, B., Schmutz, S.M. 2003. An association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *Journal of Dairy Science*, 86(10): 3164–3166.
- Buitenhuis, B., Janss, L.L., Poulsen, N.A., Larsen, L.B., Larsen, M.K., Sørensen, P. 2014. Genome-wide association and biological pathway analysis for milk-fat composition in Danish Holstein and Danish Jersey cattle. *BMC Genomics*, 15(1): 1112.
- Ciecierska, D., Frost, A., Grzesiak, W., Proskura, W.S., Dybus, A., Olszewski, A. 2013. The influence of fatty acid synthase polymorphism on milk production traits in polish holstein-friesian cattle. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23(2): 376–379.
- Dekkers, J.C.M. 2012. Application of Genomics Tools to Animal Breeding. *Current Genomics*, 13(3): 207–212.
- Dokso, A., Ivankovic, A., Zecevic, E., Brka, M. 2015. Effect of *DGAT1* gene variants on milk quantity and quality in Holstein, Simmental and Brown Swiss cattle breeds in Croatia. *Mljekarstvo*, 65(4): 238–242.
- Fontanesi, L., Calò, D.G., Galimberti, G., Negrini, R., Marino, R., Nardone, A., Ajmone-Marsan, P., Russo, V. 2014. A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle. *Animal Genetics*, 45(4): 576–580.
- Goddard, M. 2001. Genetics to improve milk quality. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56(2): 166–170.
- Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M., Snell, R. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in

dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research*, 12(2): 222–231.

Haegeman, A., van Zeveren, A., Peelman, L.J. 2000. New mutation in exon 2 of bovine leptin gene. *Animal Genetics*, 31(1): 79.

Hillbrick, G., Augustin, M.A. 2002. Milk fat characteristics and functionality: Opportunities for improvement. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(1): 45–51.

Ibeagha-Awemu, E.M., Kgwatalala, P., Zhao, X. 2008. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mammalian Genome*, 19(9): 591–617.

Kalac, P., Samkova, E. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55(12): 521–537.

Lock, A.L., Garnsworthy P.C. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and [Delta] 9-desaturase activity in dairy cows. *Livestock Production Science*, 79(1): 47–59.

Madeja, Z., Adamowicz, T., Chmurzynska, A., Jankowski, T., Melonek, J., Switonski, M., Strabel, T. 2004. Short Communication: Effect of Leptin Gene Polymorphisms on Breeding Value for Milk Production Traits. *Journal of Dairy Science*, 87(11): 3925–3927.

Milanesi, E., Nicoloso, L., Crepaldi, P. 2008. Stearoyl CoA desaturase (SCD) gene polymorphisms in Italian cattle breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125(1): 63–67.

Nafikov, R.A., Schoonmaker, J.P., Korn, K.T., Noack, K., Garrick, D.J., Koehler, K.J., Minick-Bormann, J., Reecy, J.M., Spurlock, D.E., Beitz, D.C. 2014. Polymorphisms in lipogenic genes and milk fatty acid composition in Holstein dairy cattle. *Genomics*, 104(6): 572–581.

Näslund, J., Fikse, W.F., Pielberg, G.R., Lundén, A. 2008. Frequency and effect of the bovine acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGAT1*) K232A polymorphism in Swedish dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 91(5): 2127–2134.

Oikonomou, G., Angelopoulou, K., Arsenos, G., Zygoiannis, D., Banos, G. 2008. The effect of polymorphisms in the *DGAT1*, leptin and growth hormone receptor gene loci on body energy, blood metabolic and reproductive traits of Holstein cows. *Animal Genetics*, 40(1): 10–17.

Roy, R., Ordovas, L., Zaragoza, P., Romero, A., Moreno, C., Altarriba, J., Rodellar, C. 2006. Association of polymorphisms in the bovine *FASN* gene with milk-fat content. *Animal Genetics*, 37(3): 215–218.

Samkova, E., Spicka, J., Pesek, M., Pelikanova, T., Hanus, O., 2012. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science*, 42(2): 83–100.

Schennink, A., Bovenhuis, H., Leon-Kloosterziel, K.M., van Arendonk, J.A.M., Visker, M.H.P.W. 2009. Effect of polymorphisms in the *FASN*, *OLR1*, *PPARGC1A*, *PRL* and *STAT5A* genes on bovine milk-fat composition. *Animal Genetics*, 40(6): 909–916.

Schennink, A., Heck, J.M.L., Bovenhuis, H., Visker, M.H.P.W., van Valenberg, H.J.F., van Arendonk, J.A.M. 2008. Milk fatty acid unsaturation: Genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) and acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGAT1*). *Journal of Dairy Science*, 91(5): 2135–2143.

Selvaggi, M., Albarella, S., Dario, C., Peretti, V., Ciotola, F. 2017. Association of *STAT5A* Gene Variants with Milk Production Traits in Agerolese Cattle. *Biochemical Genetics*, 55(2): 158–167.

Soyeurt, H., Dardenne, P., Gillon, A., Croquet, C., Vanderick, S., Mayeres, P., Bertozzi, C., Gengler, N., 2006. Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science*, 89(12): 4858–4865.

Thaller, G., Kramar, W., Winter, A., Kaupe, B., Erhardt, G., Fries, R. 2003. Effect of *DGAT1* variants on milk production traits in German cattle breeds. *Journal of Animal Science*, 81(8): 1911–1918.

Tomka, J., Vasickova, K., Oravcova, M., Bauer, M., Huba, J., Vasicek, D., Peskovicova, D. 2016. Effects of polymorphisms in *DGAT1* and *LEP* genes on milk traits in Holstein primiparous cows. *Mljekarstvo*, 66(2): 122–128.

Příloha 8:

Kala, R., Samkova, E., Hasonova, L., Spicka, J., Pelikanova, T., Krizova, Z., Hladky, J. 2016. Proportion of important fatty acids in cow and goat milk fat. In: *23th International PhD Students Conference MendelNet 2016*. Brno, 9-10 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 582-587. ISBN 978-80-7509-443-8 (**D**)

PROPORTION OF IMPORTANT FATTY ACIDS IN COW AND GOAT MILK FAT

ROBERT KALA¹, EVA SAMKOVA¹, LUCIE HASONOVA¹, JIRI SPICKA²,
TAMARA PELIKANNOVA², ZUZANA KRIZOVA³, JAN HLADKY³

¹Department of Agricultural Products Quality

²Department of Applied Chemistry

³Department of Animal Husbandry Sciences

University of South Bohemia in Ceske Budejovice

Studentska 1668, 370 05 Ceske Budejovice

CZECH REPUBLIC

kalarobert@seznam.cz

Abstract: Selected fatty acid (FA) contents and their groups were determined in milk fat of two cattle (Czech Fleckvieh, Holstein) and two goats' (Brown Shorthair, Anglo-Nubian) breeds. Goat fat in comparison with cow fat showed higher proportion of volatile FA (14.9–15.6% and 8.4% from total FA, respectively), and lower proportion of C16:0 (25.6–26.8% and 30.7–31.5%, respectively). The differences in milk FA between imported breeds and breeds of Czech origin have been also tested. The statistically significant differences were confirmed only in goat fats for C18:3n-3, *cis*-9, *trans*-11 C18:2 ($p < 0.01$, 0.001), and in groups of saturated and unsaturated FA ($p < 0.05$, 0.01).

Key Words: cow, goat, milk, fatty acids, breed

INTRODUCTION

Milk belongs among well balanced basic food group in human diet. Its annual production reached 802 million tons, of which cow milk represented 83.3% and goat milk 2.2% (FAO Statistical Databases 2010). An important part of milk solids is milk fat. Its content is the highest in ovine milk (6.09%–6.80%), the fat content in cow and goat milk is similar (3.16%–4.96%) – Mahmood and Usman (2010). Milk fat consists predominantly of esters of glycerol and fatty acids (FA), which affect the property of milk and dairy products (Hillbrick and Augustin 2002). FA are divided into various groups most often by the presence of double bonds and the number of those (Velíšek and Hajšlová 2009), eventually by the number of carbons in FA chain. Proportion of FA groups or indices between the groups is important for its nutritional value (Bařłowska et al. 2011) as well as from technological view (Michalski et al. 2004), or even for its sensory properties (Chilliard and Ferlay 2004). For example, ratio between palmitic acid (C16:0) and oleic acid (*cis*-9 C18:1) is an important criteria of textural properties of butter. This “spreadability index” relates to melting point of milk fat and thus determines the hardness of butter (Couvreur et al. 2006).

Ruminant milk fats are characterized by proportion of volatile FA (VFA; C4–C10), which is higher in goat milk (15 to 18%, Raynal-Ljutovac et al. 2008) than in cow milk (7.9 to 9.2%, Hanuš et al. 2010). Typical for milk fat is also high proportion of saturated FA (SFA), low proportion of polyunsaturated FA, and occurrence of *trans* isomers of unsaturated FA. The latter group contains unique isomer *cis*-9, *trans*-11 C18:2 (RA, ruminic acid), one of the isomers of conjugated linoleic acid (CLA). RA is known for its biological effects – anticarcinogenic, antiatherogenic, or immunomodulatory (Parodi 2004).

Milk FA composition depends on many factors, such as: genetic predisposition, stage of lactation, nutrition etc. (Stoop et al. 2008). Several studies have discussed the effects of breed on FA composition. This effect is relatively high in SFA (Dewhurst et al. 2007), while nutrition is the main factor in proportion of unsaturated FA (UFA) – AlZahal et al. (2009). Samková et al. (2012) reported that milk fat produced by indigenous breeds, dual-purpose breeds and crossbreeds appears to have a more desirable profile of FA than milk fat produced by imported dairy breeds (mostly Holstein).

The aim of this work was to evaluate FA proportion in milk fat of dairy cows and goats depending on breed (indigenous vs. imported). And further, the differences between cows' and goats' milk fat were assessed.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

The study was carried out in the Czech Republic. The Czech Fleckvieh (CF) and Holstein (H) cattle, Brown Shorthair (BSH) and Anglo-Nubian (AN) goats were assessed – Table 1. The cows were housed together in one tie-stall barn. The goats were from two goat farms.

Individual milk samples were collected during lactation within the regular testing of milk efficiency. The samples were immediately cooled (to 6 °C) and transported to the laboratory in a cool box.

Table 1 General characteristic of sampling and cattle and goat breeds

| Breeds ¹ | Sea level (m) | Management | Origin of breed | Number of | | Number of (%) | |
|---------------------|---------------|--------------|-----------------|-----------------------|---------|---------------|-------------|
| | | | | sampling ² | animals | primiparous | multiparous |
| CF | 420 | conventional | Czech | 4 | 32 | 27 | 73 |
| H | 420 | conventional | imported | 4 | 37 | 33 | 67 |
| BSH | 445 | organic | Czech | 4 | 10 | 40 | 60 |
| AN | 516 | organic | imported | 3 | 12 | 39 | 61 |

Legend: ¹CF – Czech Fleckvieh, H – Holstein, BSH – Brown Shorthair, AN – Anglo-Nubian; ²March, June, September and December (for CF and H), May, June, July, October (for BSH), May, September, October (for AN);

All cows were fed under the same conditions. Total mixed rations consisted of maize and grass silages, mashed oats, meadow hay (60.6, and 4% of dry matter, respectively). Production feed mixture (30% of dry matter) composed of barley, wheat, extracted soybean meal, and salt, minerals, vitamins in proportion 32, 32, 32, and 4%, respectively.

Both breeds of goat were grazed on natural pasture. And further, BSH goats were fed mixture (1.4 kg/day) of mashed oats and barley (1:1), AN goats were fed mixture (1.6 kg/day) of oats, barley, and sugar beet (1:1:0.5).

Chemical and statistical analysis

Fat, protein and lactose contents were determined spectrophotometrically using a MilkoScan 4000 apparatus (Foss Electric, Hillerød, Denmark) – Table 2.

Table 2 Milk composition for the breeds of cattle and goats

| | Fat (%) | | | Protein (%) | | | Lactose (%) | | |
|-----------------|---------|------|----------|-------------|------|----------|-------------|------|----------|
| | Mean | SD | <i>P</i> | Mean | SD | <i>P</i> | Mean | SD | <i>P</i> |
| Czech Fleckvieh | 4.21 | 0.89 | | 3.62 | 0.41 | | 4.78 | 0.38 | |
| Holstein | 4.04 | 0.83 | 0.2448 | 3.49 | 0.38 | 0.0506 | 4.77 | 0.27 | 0.7597 |
| Total | 4.12 | 0.86 | | 3.55 | 0.40 | | 4.77 | 0.33 | |
| Brown Shorthair | 4.46 | 2.51 | | 3.25 | 0.35 | | 4.56 | 0.27 | |
| Anglo-Nubian | 5.21 | 1.84 | 0.2032 | 4.28 | 0.78 | 0.0000 | 4.06 | 0.30 | 0.0000 |
| Total | 4.94 | 2.11 | | 3.91 | 0.83 | | 4.24 | 0.38 | |

Legend: SD – standard deviation; *P* – probability;

Milk fat was extracted with petroleum ether from freeze-dried milk samples. FA in isolated fat were re-esterified to their methyl esters with a methanolic solution of potassium hydroxide. Methyl esters of FA were determined by a gas chromatographic method (GLC) using a Varian 3300 apparatus (Varian Techtron, USA) under conditions described by Frelich et al. (2012). The identification of FA was carried out using analytical standards (Supelco, USA). In total, 64 FA were observed, 50 of which

were identified. The proportions of individual FA were calculated from the ratio of their peak area to the total area of all the observed acids.

Data were statistically analyzed by the program Statistica CZ 12 (Statsoft CR). Student's *t*-test for comparison between groups was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Fatty acid composition of cow milk fat

The difference in composition of milk fat of two breeds was assessed in this study, the CF (dual-purpose breed of Czech origin) and H (imported dairy breed).

The proportions of SFA (67.94% for CF and 67.98% for H) and UFA (29.34% and 29.37%, respectively) were in both breeds almost identical (Table 3). Also the group of VFA, essential FA (C18:2*n*-6, C18:3*n*-3) and RA were similar. Higher differences were found in the proportions of C16:0 and *cis*-9 C18:1. The proportion of C16:0 in milk fat of CF was lower in comparison to H (30.66% and 31.50%, respectively), whereas the proportion of *cis*-9 C18:1 was higher (19.16% and 18.53%, respectively). However, there were no statistically significant differences. Similar results were found by Pešek et al. (2008) or Adamska et al. (2014).

The spreadability index (depending on C16:0/*cis*-9 C18:1) seemed to be more desirable in milk fat of CF dairy cows. The oxidative stability of milk fat set by the SFA/UFA index is almost identical in both breeds.

Table 3 Proportion of fatty acids (FA) and groups of FA (% of total FA) in cow and goat milk fat depending on breed

| Item | Cow | | | <i>P</i> | Goat | | <i>P</i> |
|---------------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|------------------|--------|----------|
| | Czech Fleckvieh | Holstein | Brown Shorthair | | Anglo- Nubian | | |
| | Mean ± SD | Mean ± SD | Mean ± SD | | Mean ± SD | | |
| C16:0 | 30.66 ± 3.64 | 31.50 ± 3.85 | 0.1819 | 25.59 ± 3.93 | 26.79 ± 2.28 | 0.1131 | |
| <i>cis</i> -9 C18:1 | 19.16 ± 3.40 | 18.53 ± 3.94 | 0.3188 | 17.79 ± 2.41 | 18.47 ± 3.29 | 0.3046 | |
| C18:2 <i>n</i> -6 | 1.69 ± 0.35 | 1.67 ± 0.34 | 0.6737 | 1.99 ± 0.39 | 1.96 ± 0.27 | 0.7272 | |
| C18:3 <i>n</i> -3 | 0.44 ± 0.13 | 0.44 ± 0.14 | 0.8955 | 0.76 ± 0.21 | 0.62 ± 0.16 | 0.0020 | |
| RA | 0.42 ± 0.14 | 0.38 ± 0.13 | 0.1455 | 1.21 ± 0.54 | 0.53 ± 0.19 | 0.0000 | |
| VFA | 8.41 ± 1.44 | 8.44 ± 1.61 | 0.9099 | 14.91 ± 1.91 | 15.64 ± 2.14 | 0.1197 | |
| SFA | 67.94 ± 4.41 | 67.98 ± 4.83 | 0.9585 | 67.98 ± 4.37 | 70.11 ± 4.13 | 0.0324 | |
| UFA | 29.34 ± 4.34 | 29.37 ± 4.90 | 0.9704 | 30.29 ± 4.18 | 27.83 ± 3.89 | 0.0099 | |
| C16/C18 | 1.67 ± 0.42 | 1.79 ± 0.50 | 0.1015 | 1.49 ± 0.42 | 1.51 ± 0.36 | 0.8048 | |
| SFA/UFA | 2.38 ± 0.45 | 2.40 ± 0.51 | 0.8314 | 2.31 ± 0.48 | 2.59 ± 0.51 | 0.0162 | |

Legend: SD – standard deviation; *P* – probability; RA – rumenic acid (*cis*-9, *trans*-11 C18:2); VFA – volatile fatty acids (C4–C10); SFA – saturated fatty acids (including branched-chain fatty acids); UFA – unsaturated fatty acids (including CLA); C16/C18 – C16:0/*cis*-9 C18:1;

Fatty acid composition of goat milk fat

Also in goat milk, the differences between the breeds of Czech origin (BSH) and imported breed (AN) were assessed. The proportion of SFA in milk fat of BSH breed was lower than in AN breed (67.98% and 70.11% for AN, respectively; *p*<0.05), whereas the proportion of UFA was higher (30.29% and 27.83%, respectively; *p*<0.01) – Table 3. High statistical significant differences were found in the proportion of C18:3*n*-3 (0.76% and 0.62%, respectively; *p*<0.01) and RA (1.21% and 0.53%, respectively; *p*<0.001). It leads to conclusion that nutritionally desirable profile of milk fat is from the milk of indigenous breed rather than from imported breed. On the bases of gathered information, it seems that the significant differences in the proportion of listed FA were mainly caused by the variety of keeping standards and conditions for particular breeds and also by the difference in food composition, which was not identical. According to several authors (stated by Kalač and Samková 2010), the botanical

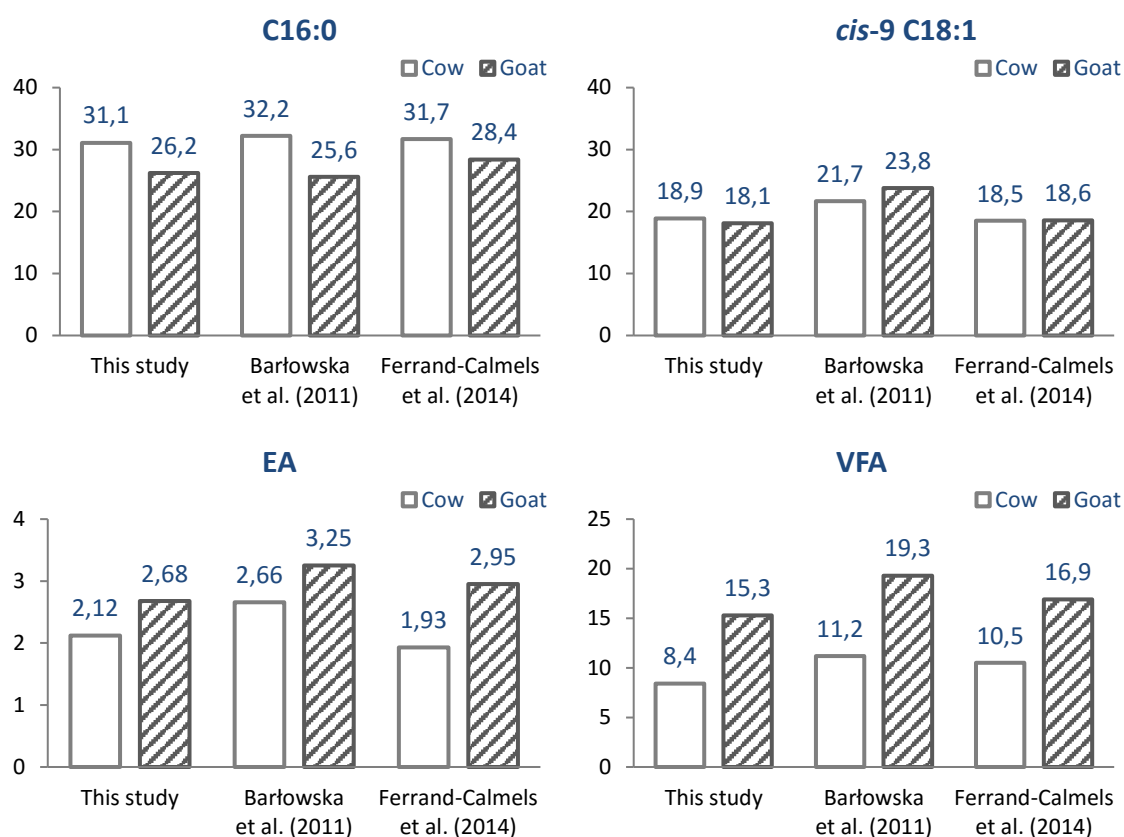
composition of pasture could have a significant effect on the composition of milk fat. However, even animals kept under same conditions and fed same feed ration can show significant differences among breeds as reported in sheep breeds by Tsiplakou et al. (2006).

Spreadability index was almost identical in both breeds. The SFA/UFA index in BSH breed was statistically significantly lower than in AN breed (2.31 and 2.59, respectively; $p < 0.05$). Thus, the oxidative stability was more suitable in imported breed.

Comparison of cow and goat milk fat

Whilst comparing the composition of milk fat, it became apparent that goats had higher proportion of VFA (14.91–15.64% and 8.41–8.44%, respectively) and lower proportion of C16:0 (25.59–26.79% and 30.66–31.50%, respectively) than cows. Furthermore, goat milk fat contained higher levels of essential FA – C18:2n-6 a C18:3n-3. Our results correspond to similar studies, see Figure 1. High proportion of VFA in goats' milk fat can highly affect sensory properties of goat milk and its products as reported by Soryal et al. (2005).

Figure 1 Proportion of selected fatty acids (FA) and groups of FA (% of total FA) in cows' and goats' milk fat

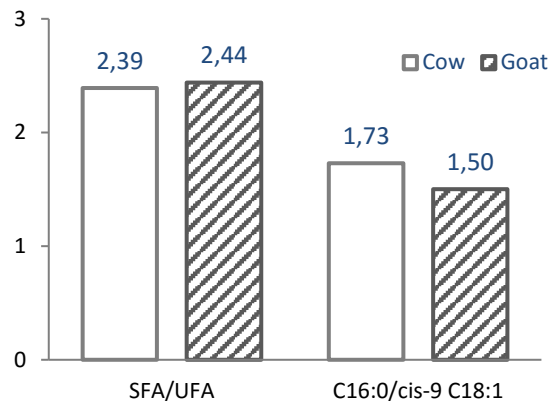


Legend: EA – essential fatty acids (C18:2n-6+C18:3n-3), VFA – volatile fatty acids (C4–C10)

Even though, the proportion of SFA in cow milk fat and goat milk fat were similar; the SFA/UFA index slightly varied (2.39 and 2.44, respectively; Figure 2).

The spreadability index was in cows (1.73) higher than in goats (1.50). This composition of milk fat results in better spreadability of butter made of goat milk. This ratio was also confirmed by Hurtaud et al. (2001) as the most accurate indicator of the hardness of butter.

Figure 2 Proportion of index SFA/UFA and spreadability index (C16:0/cis-9 C18:1) in cows' and goats' milk fat



Legend: SFA/UFA – saturated fatty acids/unsaturated fatty acids

CONCLUSION

Milk fat is predominantly assessed for its nutritional values, while the lower proportion of saturated fatty acids is preferred. However, required higher proportion of unsaturated fatty acids leads to decrease in the oxidative stability of milk fat.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was financially supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (No. QJ1510336) and by the University of South Bohemia in České Budějovice (No. GAJU-002/2016/Z).

REFERENCES

- Adamska, A., Rutkowska, J., Tabaszewska, M., Bialek, M. 2014. Milk of Polish Red and White cows as a source of nutritionally valuable fatty acids. *Archiv Tierzucht*, 57(10): 1–10.
- AlZahal, O., Or-Rashid, M.M., Greenwood, S.L., Douglas, M.S., McBride, B.W. 2009. The effect of dietary fiber level on milk fat concentration and fatty acid profile of cows fed diets containing low levels of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 92(3): 1108–1116.
- Barłowska, J., Szwajkowska, M., Litwińczuk, Z., Król, J. 2011. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(6): 291–302.
- Chilliard, Y., Ferlay, A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44(5): 467–492.
- Couvreur, S., Hurtaud, C., Lopez, C., Delaby, L., Peyraud, J.L. 2006. The Linear Relationship Between the Proportion of Fresh Grass in the Cow Diet, Milk Fatty Acid Composition, and Butter Properties. *Journal of Dairy Science*, 89(6): 1956–1969.
- Dewhurst, R.J., Moorby, J.M., Vlaeminck, B., Fievez, V. 2007. Apparent recovery of duodenal odd- and branched-chain fatty acids in milk of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(4): 1775–1780.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2010. *FAOSTAT: Statistics Division* [Online]. Available from: <http://faostat.fao.org/>. [2011-04-24].
- Frelich, J., Šlachta, M., Hanuš, O., Špička, J., Samková, E., Weglarz, A., Zapletal, P. 2012. Seasonal variation in fatty acid composition of cow milk in relation to the feeding system. *Animal Science Papers & Reports*, 30(3): 219–229.
- Hanuš, O., Samková, E., Špička, J., Sojková, K., Hanušová, K., Kopec, T., Vyletěllová, M., Jedelská R. 2010. Vztah koncentrace zdravotně významných skupin mastných kyselin ke složení a technologickým vlastnostem kravského mléka. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 58(5): 137–154.
- Hillbrick, G., Augustin, M.A. 2002. Milk fat characteristics and functionality: opportunities for improvement. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(1): 45–51.

- Hurtaud, C., Buchin, S., Martin, B., Verdier-Metz, I., Peyraud, J.L., Noel, Y. 2001. Milk quality and consequences on quality of dairy products: several some measuring techniques of measure in dairy cows trials. In *8th Conference on Ruminant Research*. Paris, France, 5–6 December. I.N.R.A. – Institut National Recherche Agronomique, pp. 35–42.
- Kalač, P., Samková, E. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55(12): 521–537.
- Mahmood, A., Usman, S. 2010. A Comparative Study on the Physicochemical Parameters of Milk Samples Collected from Buffalo, Cow, Goat and Sheep of Gujrat, Pakistan. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(12): 1192–1197.
- Michalski, M.C., Camier, B., Briard, V., Leconte, N., Gassi, J.Y., Gouedranche, H., Michel, F., Fauquant, J. 2004. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and functional properties of Emmental cheese. *Lait*, 84(4): 343–358.
- Parodi, P.W. 2004. Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology*, 59(1): 3–59.
- Pešek, M., Samková, E., Špička, J. 2008. Evaluation of changes in the content of adverse saturated fatty acids in cow milk with a view to optimising the composition of milk fat. *Milchwissenschaft*, 63(1): 33–36.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79(1): 57–72.
- Samková, E., Špička, J., Pešek, M., Pelikánová, T., Hanuš, O. 2012. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science*, 42(2): 83–100.
- Soryal, K., Beyene, F.A., Zeng, S., Bah, B., Tesfai, K. 2005. Effect of goat breed and milk composition on yield, sensory quality, fatty acid concentration of soft cheese during lactation. *Small Ruminant Research*, 58(3): 275–281.
- Stoop, W.M., van Arendonk, J.A.M., Heck, J.M.L., van Valenberg, H.J.F., Bovenhuis, H. 2008. Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*, 91(1): 385–394.
- Tsiplakou, E., Mountzouris, K.C., Zervas, G. 2006. The effect of breed, stage of lactation and parity on sheep milk fat CLA content under the same feeding practices. *Livestock Science*, 105(1–3): 162–167.
- Velišek, J., Hajšlová, J. 2009. *Chemie potravin 1*. 1. vyd., Tábor: Osis.

Příloha 9:

Kala, R., Samkova, E., Citek, J. 2016. Selected candidate genes affecting milk fatty acids. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 19 (Special Issue): 31-33. (**JREC**)

Selected candidate genes affecting milk fatty acids

Robert Kala*, Eva Samková, Jindřich Čítek

University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic

Article Details: Received: 2016-04-29 | Accepted: 2016-05-11 | Available online: 2016-09-01

<http://dx.doi.org/10.15414/afz.2016.19.si.31-33>

Cow's milk consisted of relatively high quantity of saturated fatty acids (about 70 %), which are considered less beneficial health. The content of more desirable fatty acids is about 25 % (monounsaturated) and 5 % (polyunsaturated). The aim of this research was to find ways how to increase the content of mono- and polyunsaturated fatty acids in milk fat. One of the ways how to alter the content of fatty acids is the monitoring of candidate genes and their polymorphism. Therefore, the manuscript deals with selected candidate genes, particularly *DGAT1*, *SCD1* and *FASN*, which are associated with fatty acid biosynthesis. The results suggest that observing of this issue could be helpful for improving the quality of milk fat.

Keywords: cow, milk fat, heritability, *DGAT1*, *SCD1*, *FASN*

1 Introduction

The majority of economically important traits in livestock are complex, have continuously distributed phenotypes, and are influenced by multiple genes or quantitative trait loci (QTL) dispersed across the genome, and by an array of different environmental factors. Quantitative traits like milk yield production including the milk fat composition is influenced by DNA segments called QTL (Ibeagha-Awemu et al., 2008).

Biosynthesis of cow's milk fat is a complex process regulated by multiple genes, which is one of the several metabolic pathways in milk production metabolism (Bionaz and Looor, 2008). Milk fatty acids can be produced by two ways – uptake from blood or *de novo* synthesis in the epithelial cells of the mammary gland (Neville and Picciano, 1997). Short-chain fatty acids and most of the medium-chain fatty acids that are predominantly synthesized *de novo*, have a medium to high heritability. Long-chain fatty acids are derived from blood lipids, which originate principally from the diet and endogenous lipids, and are characterized by low to medium heritability (Soyeurt et al., 2007; Stoop et al., 2008; Mele et al., 2009). Table 1 shows the descriptive statistics and heritability of selected fatty acids according to Krag et al. (2013). Each fatty acid is presented by its mean (\bar{x}), standard deviation (s_x) and genomic heritability estimate (h_g^2), respectively. The estimates of the h_g^2 are based on a univariate model.

Table 1 Content (g 100 g⁻¹ fat) and heritability of selected fatty acids

| Fatty acids | \bar{x} | s_x | h_g^2 |
|---|-----------|-------|---------|
| Lauric acid (C12:0) | 3.57 | 0.65 | 0.27 |
| Myristic acid (C14:0) | 11.29 | 1.30 | 0.25 |
| Palmitic acid (C16:0) | 28.95 | 3.25 | 0.14 |
| Linoleic acid (C18:2 c9,c12) | 1.69 | 0.30 | 0.17 |
| α -linolenic acid – ALA (C18:3 c9,c12,c15) | 0.49 | 0.10 | 0.30 |
| Conjugated linoleic acids – CLA (C18:2 c9,t11) | 0.63 | 0.16 | 0.19 |

* **Corresponding Author:** Robert Kala, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Products Quality, Studentská 809, 370 05 České Budějovice, Czech Republic. E-mail: kalarobert@seznam.cz

Identification of genomic regions, and preferably individual genes, responsible for genetic variation in milk fat composition will enhance the understanding of biological pathways involved in fatty acid synthesis and may point towards opportunities for changing milk fat composition via selective breeding (Bouwman et al., 2011). Candidate gene studies have shown that polymorphisms in diacylglycerol O-acyltransferase 1 (*DGAT1* K232A) (Grisart et al., 2002) and stearoyl-CoA desaturase 1 (*SCD1* A293V) (Taniguchi et al., 2004) have effects on milk fat composition (Mele et al., 2007; Moioli et al., 2007a; Schennink et al., 2007; Schennink et al., 2008; Kgwatalala et al., 2009; Conte et al., 2010).

1.1 *DGAT1*

DGAT1 catalyzes the terminal part in the synthesis of triacylglycerols, thereby contributing to control the rate of triacylglycerols synthesis in adipose cells – adipocytes (Ibeagha-Awemu et al., 2008). According to Grisart et al. (2002), among several polymorphisms in *DGAT1* substitution occurs at AA dinucleotide GC to exon 8 (coding sequence), resulting in a substitution of lysine to alanine (K232A). Remarkable attribute of mutation K232A is that variant lysine increases the fat yield (kg) and the percentage of fat and protein, while reducing the quantity of milk protein and variant alanine increases the quantity of milk protein content (Grisart et al., 2002; Spelman et al., 2002; Thaller et al., 2003). Schennink et al. (2007) reported a correlation among polymorphism of *DGAT1* K232A and the composition of milk fat. In this case, lysine allele associated with upper proportion of saturated fatty acids and C16:0 and minor proportion of C14:0, unsaturated oleic acid (C18:1 c9) and CLA.

1.2 *SCD1*

SCD1 is an enzyme of the endoplasmic reticulum, which contains iron in its structure. This enzyme is responsible for cellular biosynthesis of saturated to monounsaturated fatty acids (Ntambi and Miyazaki, 2004). *SCD1* gene is located on 26 BTA. Single nucleotide polymorphism (SNPs) in exon 5 causes the substitution (A293V) of valine to alanine (Taniguchi et al., 2004). Allele alanine is associated with a higher proportion of monounsaturated fatty acids and is hypothetically considered as candidate gene for milk fat quality (Moioli et al., 2007b). Studies suggest (Mele et al., 2007; Schennink et al., Conte et al., 2010) that allele alanine has a key role also in the synthesis of CLA.

1.3 *FASN*

Fatty acid synthase (*FASN*) is a candidate gene for adipocytes in fat and in milk fat. Morris et al. (2007) demonstrated that SNPs in the gene *FASN* is associated with differences in the composition of fatty acids in adipose tissue and in milk fat on pasture-fed cattle. *FASN* is a multi-enzyme system involved in the *de novo* synthesis. *De novo* fatty acid synthesis requires the *FASN* for the elongation of fatty acids and other compounds. One of them is the acetate, which is activated by acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (*ACSS2*). For *de novo* synthesis was *ACSS2* identified as a candidate gene associated with caproic, caprylic and capric acids (C6:0, C8:0 and C10:0). Morris et al. (2007) performed linkage analysis of fatty acids of cow's milk at 19 BTA, and detecting a QTL for C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C18:1 c9 and C18:2 c9, c12.

2 Conclusions

Fatty acids composition is affected by many factors, which enable to alter milk fat. Studies have revealed that the genetic effect is more effective in saturated fatty acids, while unsaturated fatty acids are more influenced by non-genetic effects like nutrition. *DGAT1* gene affects rather quantity of milk fat, whereas *SCD1* quality of milk fat. *FASN* influences the synthesis of saturated and unsaturated fatty acids.

Acknowledgments

This paper was produced with support from the projects of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic QJ1510336 and GAJU-002/2016/Z.

References

- BIONAZ, M. and LOOR, J.J. (2008) Gene network driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics*, vol. 9, pp. 366–387. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-366>
- BOUWMAN, A.C. et al. (2011) Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle. *BMC Genetics*, vol. 43, pp. 1–12.

- CONTE, G. et al. (2010) Diacylglycerol acyltransferase 1, stearoyl-CoA desaturase 1., and sterol regulatory element binding protein 1 gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Italian Brown cattle. *J Dairy Sci*, vol. 93, pp. 753–763.
- GRISART, B. et al. (2002) Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res*, vol. 12, pp. 222–231.
- IBEAGHA-AWEMU, E.M., KGWATALALA, P. and ZHAO, X. (2008) A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mamm Genome*, vol. 19, pp. 591–617.
- KGWATALALA, P.M. et al. (2009) Stearoyl-CoA desaturase 13'UTR SNPs and their influence on milk fatty acid composition of Canadian Holstein cows. *J Anim Breed Genet*, vol. 126, pp. 394–403.
- KRAG, K. et al. (2013) Genetic parameters for milk fatty acids in Danish Holstein cattle based on SNP markers using a Bayesian approach. *BMC Genetics*, vol. 14, pp. 1–10.
- MELE M. et al. (2007) Stearoyl-coenzyme A desaturase gene polymorphism and milk fatty acid composition in Italian Holsteins. *J Dairy Sci*, vol. 90, pp. 4458–4465.
- MELE, M. et al. (2009) Genetic parameters for conjugated linoleic acid, selected milk fatty acids, and milk fatty acid unsaturation of Italian Holstein-Friesian cows. *J Dairy Sci*, vol. 92, pp. 392–400.
- MOIOLI, B. et al. (2007b) Short communication: Effect of stearoyl-coenzyme A desaturase polymorphism on fatty acid composition of milk. *J Dairy Sci*, vol. 90, pp. 3553–3558.
- MOIOLI, B., D'ANDREA, M. and PILLA, F. (2007a) Candidate genes affecting sheep and goat milk quality. *Small Rum Res*, vol. 68, pp. 179–192.
- MORRIS, C.A. et al. (2007) Fatty acid Synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. *Mamm Genome*, vol. 18, pp. 64–74.
- NEVILLE, M.C. and PICCIANO, M.F. (1997) Regulation of milk lipid secretion and composition. *Ann Rev Nutr*, vol. 17, pp. 159–184.
- NTAMBI, J.M. and MIYAZAKI, M. (2004) Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lip Res*, vol. 43, pp. 91-104.
- SCHENNINK, A. et al. (2007) *DGAT1* underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Anim Genet*, vol. 38, pp. 467–473.
- SCHENNINK, A. et al. (2008): Milk fatty acid unsaturation: genetic parameters and effects of *SCD1* and *DGAT1*. *J Dairy Sci*, vol. 91, pp. 2135–2143.
- SOYEURT, H. et al. (2007) Estimation of heritability and genetic correlations for the major fatty acids in bovine milk. *J Dairy Sci*, vol. 90, pp. 4435-4442.
- SPELMAN, R.J. (2002) Characterization of the *DGAT1* gene in New Zealand dairy population. *J Dairy Sci*, vol. 85, pp. 3514–3517.
- STOOP, W.M. et al. (2008) Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians. *J Dairy Sci*, vol. 91, pp. 385–394.
- TANIGUCHI, M. et al. (2004) Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mamm Genome*, vol. 15, pp. 142–148.
- THALLER, G. et al. (2003) Effects of *DGAT1* variants on milk production traits in German cattle breeds. *J Anim Sci*, vol. 81, pp. 1911–1918.

Příloha 10:

Hanuš, O., Samková, E., Špička, J., Hasoňová, L., **Kala, R.**, Klímová, Z., Kopunecz, P., Kopecký, J. 2015. Porovnání metod používaných při stanovení zastoupení zdravotně významných mastných kyselin mléčného tuku v bazénových vzorcích mléka dojnic (Comparison of methods used for the determination of the healthy important fatty acids of milk fat in bulk milk samples of dairy cows). *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 151, 26: 12-15. (**JREC**)

MC SWEENEY P.L.H. (2007). Pathogens and food poisoning bacteria. V knize Cheese problems solved (Mc Sweeney P.L.H. ed.), s.133-139, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.

PIETRACHA D., MISIEWICZ A.: The use of products containing phage in the food industry as a new method for *Listeria monocytogenes* elimination from food. *Czech Journal of Food Sciences* v tisku.

SCHMID-HEMPEL P., FRANK S. A. (2007): Pathogenesis, virulence, and infective dose. *PLoS Pathog.*, 3(10): e147, s. 1372-1373.

ZINK R., LOESSNER M.J. (1992): Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, s. 296-302.

Přijato do tisku: 14. 7. 2015

Lektorováno: 2. 8. 2015

POROVNÁNÍ METOD POUŽÍVANÝCH PŘI STANOVENÍ ZASTOUPENÍ ZDRAVOTNĚ VÝZNAMNÝCH MASTNÝCH KYSELIN MLÉČNÉHO TUKU V BAZÉNOVÝCH VZORCÍCH MLÉKA DOJNIC

Oto Hanuš¹, Eva Samková², Jiří Špička²,
Lucie Hasoňová², Robert Kala², Zdeňka Klímová³,
Pavel Kopunec³, Jaroslav Kopecký¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský Praha

² Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Zemědělská fakulta

³ Českomoravská společnost chovatelů a.s., Hradištko

**Comparison of methods used
for the determination of the healthy important
fatty acids of milk fat in bulk milk samples
of dairy cows**

Abstrakt

Ve 13 chovech holštýnského skotu v Olomouckém kraji bylo odebráno 33 bazénových vzorků mléka za účelem porovnání dvou metod stanovení mastných kyselin (MK) - rutinní/nepřímá (pomocí infračervené spektroskopie - MIR-FT) a referenční/přímá (pomocí plynové chromatografie - GC). Těsnost vztahů mezi oběma metodami je silnější v případě skupiny nasycených (SFA) a nenasycených (UFA) MK ($r = 0,7094; 0,9389; p < 0,001$), zatímco u skupiny TFA (*trans* isomery nenasycených MK) a PUFA (polyenasycené MK) jsou korelační koeficienty nižší ($0,5897; 0,5931; p < 0,001$). 50,3 a 88,2 % variability v hodnotách SFA a UFA podle nepřímé rutinní metody MIR-FT je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční

metody GC. Výsledky naznačují, že řadu informací MIR-FT o výskytu MK lze využít pro rutinní stanovení těchto skupin MK a případnou praktickou selekci mléčné suroviny pro specifickou potravinářskou výrobu.

Klíčová slova: stádo krav; bazénový vzorek mléka; plynová chromatografie; infračervená spektroskopie; věrohodnost analytických výsledků; korelace; kalibrace; validace

Abstract

33 bulk milk samples were taken in 13 Holstein dairy cow herds in the Olomouc region to compare two methods for the determination of fatty acids (FAs) - routine / indirect (by infrared (IR) spectroscopy - MIR-FT) and reference / direct (gas chromatography - GC). Tightness of relations between these two methods is stronger in the case of the group of saturated (SFA) and unsaturated (UFA) FAs ($r = 0.7094; 0.9389; p < 0.001$), while for the group of TFA (*trans* isomers of FAs) and PUFA (polyunsaturated FAs) are lower correlation coefficients ($0.5897; 0.5931; p < 0.001$). 50.3 and 88.2% of the variability in the routine values of SFA and UFA according to the indirect method MIR-FT is explainable by variations in the analyses of direct reference method GC. The results indicate that a row of MIR-FT information on the occurrence of FAs can be used for routine determination of such groups of FAs and possible practical selection of raw milk for the specific food production.

Keywords: cow herd; bulk milk sample; gas chromatography; infrared spectroscopy; analytical result reliability; correlation; calibration; validation

Úvod

Mléčný tuk je jednou z nejdůležitějších složek ovlivňujících technologické zpracování mléka. Složení mléčného tuku z hlediska mastných kyselin (MK) přitom zajímá nejen technology v mlékárnách, např. pro stabilitu mléčného tuku nebo pro možnost ovlivnění roztrávitelnosti másla, ale také odborníky pro humánní výživu. I když celkově vyšší množství (55 - 75 %) nasycených MK (SFA) zajišťuje lepší stabilitu mléčného tuku a následně mléčných výrobků (*Kaylegian a Lindsay, 1995*), z hlediska výživy je méně akceptovatelné (*Dostálová et al., 2009*). Příjem SFA z celkového energetického příjmu by měl být pod 10 % (20 g), polyenových MK (PUFA) 7 - 10 %. Příjem *trans*-nenasycených MK (TFA) by měl být co nejnižší a neměl by překročit 1 % (cca 2,5 g/den).

V současnosti se profil MK mléčného tuku nesleduje, přestože jsou známy faktory příznivě působící na zvýšené zastoupení nenasycených MK (UFA) - *Kalač a Samková (2010)*. Důvodem je mimo jiné pravděpodobně také náročnost analytického stanovení ekonomicky i časově nevýhodnou plynovou chromatografií (GC). GC je příliš nákladná při poskytnutí prakticky zbytečně detailního výsledku v daném ohledu. Tento je vhodný zejména pro vědecko-výzkumné účely. Z literatury jsou však známy

některé rychlejší a levnější způsoby stanovení MK, při nichž se uplatňuje potenciál infračervené (IR) spektroskopie ve středové oblasti vlnových délek IR záření nebo v oblasti IR blízké (Souyert *et al.*, 2006; Coppa *et al.*, 2010). Pro mléko (mléčný tuk) je v dané souvislosti výhodné určení profilu celého IR spektra prostřednictvím Michelsonova interferometru a s následným matematicko-statistickým vyhodnocením signálu Fourierovými transformacemi (MIR-FT). Tyto zvyšují analytickou efektivitu výtěžnosti signálu.

Metoda IR spektroskopie (MIR-FT) je v současnosti využívána v analytice mlékařství pro kontrolu kvality syrového mléka nebo pro stanovení některých minoritních složek mléka (volné MK, močovina, kyselina citrónová, ketony) - Bijgaart van den, 2006; Hering *et al.*, 2008; Hanuš *et al.*, 2009; Drift van der *et al.*, 2012 aj. Je třeba zdůraznit, že věrohodnost výsledků z této rutinní analýzy bude záviset především na kvalitě kalibrací provedených podle výsledků referenční metody.

Cílem práce bylo porovnání zastoupení vybraných MK a jejich skupin v mléčném tuku bazénových vzorků mléka stanovených referenční (přímou) a rutinní (nepřímou) metodou.

Materiál a metodika

Do pokusu bylo zahrnuto 13 chovů dojníc holštýnského plemene v Olomouckém kraji. Stáda zahrnovala 35 až 530 kusů dojníc a nacházela se v nadmořské výšce od 250 do 350 m. Dojvost stád se pohybovala od 7 650 do 11 190 kg mléka za normovanou laktaci. Jednalo se o chovy s volným ustájením zvířat a dojením v dojrně (n = 12), kterým byla zkrmována směsná krmná dávka (TMR, total mixed ration) na bázi konzervované objemné píce a koncentrátů podle dojivosti. Jeden chov (35 krav) byl s vazným ustájením a potrubním dojícím zařízením.

Odběry bazénových vzorků mléka (n = 33) proběhly v období leden až březen 2015 v rámci oficiální kontroly kvality mléka. Získané vzorky byly rozděleny na dvě části a při teplotě 5 °C dopraveny z místa odběru do laboratoře. První část byla použita pro stanovení základního chemického složení mléka a pro rutinní stanovení mastných kyselin.

Analýzy byly provedeny na pravidelně kalibrovaném a kontrolovaném zařízení CombiFoss FT+ (MilkoScan FT+ 76150, Fossomatic FC 79910), 500 vzorků/hod. (Foss Analytical A/S, Denmark) nepřímou (rutinní) metodou MIR-FT (dále jen *MIR*). Druhá část byla využita pro stanovení MK přímou (referenční) metodou plynové chromatografie (dále jen *GC*) po předchozí lyofilizaci vzorků, extrakci tuku petroletherem a převedení na methylestery MK (alkalickou katalýzou) dle předepsaných parametrů (Tabulka 1).

Tab. 1 Parametry chromatografické analýzy

| Parametr | Hodnota |
|-------------------|---|
| Kolona | SelectFAME (Varian), 50 m/0,25 mm |
| Detektor | FID (plamenově ionizační) |
| Teplota: - kolona | 55 °C - 5 min, 40 °C/min -170 °C, 2 °C/min - 196 °C, 10 °C/min - 210 °C - 8 min |
| - injektor | 250 °C |
| - detektor | 250 °C |
| Nosný plyn | helium |
| Průtok helia | 1,8 ml/min |
| Nástřík | 1 l, split 10 |

Tab. 2 Základní statistické charakteristiky chemického složení bazénových vzorků mléka

| | \bar{x} | s_x | min. | max. | v% |
|---------------|-----------|-------|------|------|------|
| Tuk (%) | 3,98 | 0,52 | 2,57 | 5,15 | 13,2 |
| Bílkoviny (%) | 3,40 | 0,16 | 3,12 | 3,62 | 4,6 |
| Laktóza (%) | 4,95 | 0,06 | 4,81 | 5,02 | 1,3 |

\bar{x} = aritmetický průměr; s_x = směrodatná odchylka; v% = variační koeficient = $(s_x/\bar{x}) \cdot 100$;

V programu Microsoft Excel byly hodnoty o obsazích MK získané rutinní metodou přepočítány na hodnoty odpovídající vyjádření referenční metody, tedy plynové chromatografie (g/100 g všech MK) podle vzorce: $(An \cdot 100)/(Bn \cdot 0,95)$, kde *An* je hodnota MK vyjádřená v g/100 g mléka, *Bn* je hodnota obsahu tuku v g/100 g mléka a 0,95 je koeficient přepočtu obsahu tuku na MK.

Pro statistické výpočty (popisné statistiky, korelační a regresní analýza) byla zvolena nabídka programu Statistica 12.0 (StatSoft 2013).

Výsledky a diskuse

Vyváženost souboru dokládají variační koeficienty ukazující variabilitu daného souboru bazénových vzorků mléka. Nejvyšší variabilita byla zjištěna u tučnosti (13,2 %), nejnižší u obsahu laktózy (1,3 %) - Tabulka 2.

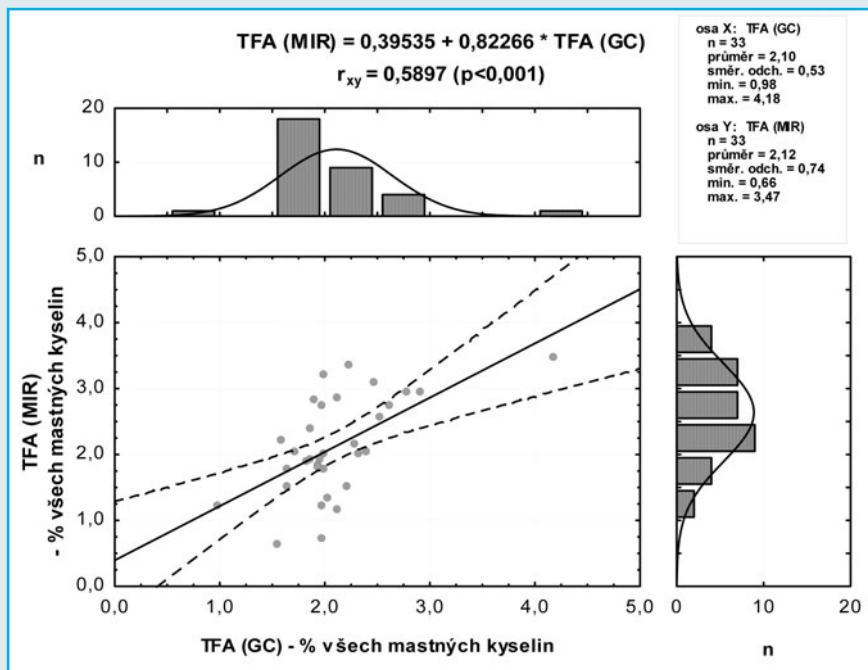
Velmi široké rozpětí minimálních a maximálních hodnot jednotlivých ukazatelů pak bylo nepřímým předpokladem pro zajištění široké variability i ve spektru jednotlivých skupin MK. Vyšší hodnoty variačních koeficientů byly dle souladu s literaturou (Pešek *et al.*, 2006) zjištěny u nenasycených MK (PUFA, TFA, UFA), nižší u nasycených MK (SFA), a to u obou metod stanovení -

Tab. 3 Základní statistické charakteristiky zastoupení vybraných skupin mastných kyselin (MK) při stanovení plynovou chromatografií (GC) a infračervenou spektroskopií přepočtené na shodné jednotky s GC (MIR)

| | GC g/100 g všech MK | | | MIR g/100 g všech MK | | | r_{xy} ($p < 0,001$) | R^2 (%) |
|------|------------------------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|-----------------------------|--------------|
| | \bar{x} | s_x | v% | \bar{x} | s_x | v% | | |
| SFA | 67,65 | 2,76 | 4,08 | 72,77 | 3,77 | 5,18 | 0,7094 | 50,3 |
| UFA | 28,80 | 2,90 | 10,08 | 27,53 | 2,52 | 9,16 | 0,9389 | 88,2 |
| TFA | 2,10 | 0,53 | 25,29 | 2,12 | 0,74 | 34,90 | 0,5897 | 34,8 |
| PUFA | 3,22 | 0,63 | 19,67 | 4,76 | 2,95 | 62,03 | 0,5931 | 35,2 |

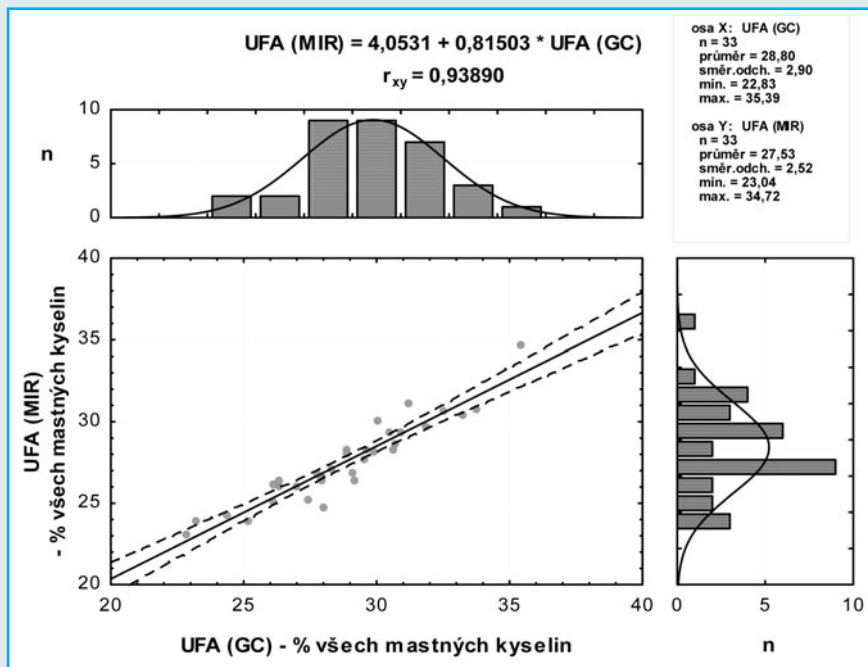
\bar{x} = aritmetický průměr; s_x = směrodatná odchylka; v% = variační koeficient = $(s_x/\bar{x}) \cdot 100$;
 r_{xy} = validační koeficient korelace; R^2 = koeficient determinace = (r_{xy}^2) ;
SFA = nasycené MK se sudým a lichým počtem uhlíků; UFA = nenasycené MK; TFA = trans isomery nenasycených MK; PUFA = polynenasycené MK včetně konjugované kyseliny linolové

Graf 1 Vztah mezi zastoupením trans izomerů nenasycených mastných kyselin (TFA) v mléčném tuku stanovených plynovou chromatografií (GC) a infračervenou spektroskopií (MIR) včetně grafů histogramu četností



Tabulka 3. Průměrná zastoupení výše uvedených skupin zjištěná oběma metodami se liší zejména v případě PUFA. Zastoupení této skupiny bylo v případě stanovení pomocí GC o 48 % nižší (3,22 %) než v případě stanovení pomocí MIR (4,76 %). S tím koresponduje i nižší validační korelační koeficient ($r = 0,5931$; $p < 0,001$), jakkoliv tento není mírou průměrné shody výsledků. Obdobnou hodnotu má i validační korelační koeficient zjištěný v případě skupiny TFA (0,5897; $p < 0,001$). Zde však jsou průměrná zastou-

Graf 2 Vztah mezi zastoupením nenasycených mastných kyselin (UFA) v mléčném tuku stanovených plynovou chromatografií (GC) a infračervenou spektroskopií (MIR) včetně grafů histogramu četností



pení zjištěná oběma metodami prakticky totožná (2,10 %, resp. 2,12 %), což dokládá předchozí konstatování - Graf 1.

Velmi shodné údaje a vyšší těsnost vzájemného vztahu výsledků byly naopak zjištěny u skupin SFA (0,7094; $p < 0,001$) a UFA (0,9389; $p < 0,001$; Graf 2), i když, jak je patrné z průměrných hodnot, rutinní metodou MIR byla stanovena hodnota SFA poněkud vyšší (72,77 %) a hodnota UFA mírně nižší (27,53 %) než tomu bylo při stanovení referenční metodou GC (67,65 %, resp. 28,80 %). Z hodnot koeficientu determinace (R^2) vyplývá, že tedy 50,3 a 88,2 % variability v hodnotách SFA a UFA podle nepřímé rutinní metody (MIR) je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční metody (GC). Uvedené lze označit za přijatelnou a dobrou schopnost analytické výpovědi nepřímé metody, resp. její zcela akceptovatelnou věrohodnost výsledků k praktické interpretaci.

Většina uvedených validačních korelací mezi výsledky sledovaných metod byla v podobných hodnotách (s ohledem na těsnost vztahu a sledované skupiny MK) v porovnání k dosud publikovaným výsledkům (Soyeurt *et al.*, 2006). Nižší hodnotu R^2 v bazénovém vzorku mléka pro skupinu SFA si lze vysvětlit tím, že zastoupení této skupiny je více ovlivněné individualitou dojnice, a lze předpokládat, že v individuálních vzorcích by tato hodnota mohla být vyšší.

Obecně shrnutu, uvedené posuny mezi (MIR a GC) průměrnými hodnotami skupin MK nejsou, při přijatelné těsnosti vztahu výsledků mezi metodami, vážnou překážkou praktického použití výsledků, neboť jsou snadno různými statistickými postupy kompenzovatelné. I výsledky vztahů s nižší determinací (PUFA a TFA), kde jen 35,2 a 34,8 % variací výsledků MIR je vysvětlitelných variabilitou výsledků GC, jsou zajímavé a mohly by být prakticky zohledněny v případné metodice (algoritmu) selekce mléčné suroviny pro specifickou mlékařskou produkci, např. funkčních potravin nebo lépe rozztíratelného másla, a to v pozici orientačních nebo doplňkových ukazatelů. Skupiny MK nebo MK s vyšší metodickou determinací výsledků by pak byly zohledněny v takovém postupu v pozici ukazatelů hlavních.

Ve většině případů jsou korelace výsledků mezi metodami vyšší pro individuální vzorky mléka (Samková et al., 2015) než pro zde popsané vzorky bazénové. To je pravděpodobně dáno vyšší původní variabilitou a větším variačním rozpětím původních hodnot jednotlivých MK v individuálních vzorcích mléka, oproti bazénovým, což je logické. Uvedený jev se projevuje obecně ve všech kalibračních souborech pro nepřímé metody (i jiné než je IR spektroskopie) u všech složek a vlastností mléka (Sojková et al., 2009; Hanuš et al., 2014). Tuto roli sehrává v podstatě nahodilost výběru mléka. V uvedených souvislostech Coppa et al. (2013) uvedli, že v případě predikce profilu MK tuku u bazénových vzorků mléka na základě informací o faremní praxi (zejména složení výživy krav a nadmořská výška) byly dobré ($R^2 > 0,5$) predikční modely např. pro SFA nebo PUFA a velmi dobré ($R^2 > 0,6$) např. pro TFA. Také Soyeurt et al. (2006) konstatovali, že pro odhad profilu MK metodou MIR jsou využitelné predikční modely pro SFA nebo MUFA.

Tyto modely by mohly poskytnout farmářům hodnotný prostředek ke zlepšení nutriční kvality jimi produkovaného mléka. Uvedené by mohlo být použito k monitoringu kvality mléčného tuku a následně ke zlepšování kvality mléka např. specifickou výživou krav, příp. k odhadu genetické hodnoty pro jednotlivá zvířata za účelem cílené plemenitby ve stejném smyslu.

Závěr

Validované vztahy mezi výsledky ekonomicky efektivní nepřímé metody infračervené spektroskopie (MIR) a nákladnější referenční plynové chromatografie (GC) při určení profilu MK mléčného tuku, které vykazují různou, avšak zpravidla akceptovatelnou těsnost závislosti pro vybrané strukturální a funkční skupiny MK ukazují, že informace získané prostřednictvím MIR mohou být využity jako hlavní nebo doplňkové ukazatele při cílené selekci syrového mléka. Metodika selekce suroviny, podle koncentrací MK a jejich skupin s předpokládaným zdravotním nebo technologickým benefitem, by tak byla opatřena vahami pro význam informace s ohledem na selekci, právě podle těsnosti vztahu nepřímých výsledků k referenčním. Tím výsledky naznačují, že řadu informací MIR o výskytu MK v mléčném tuku lze využít pro rutinní stanovení těchto skupin MK a případnou praktickou selekci mléčné suroviny pro specifickou potravinářskou výrobu.

Poděkování

Tato práce byla uskutečněna s podporou projektu MZE NAZV KUS QJ1510336 a výzkumných záměrů MŠMT ČR MSM 6007665806 a MZe RO1415. Autoři rovněž děkují majitelům farem za spolupráci při realizaci této studie.

Seznam literatury

- Bijgaart van den H. (2006): New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 2. Free fatty acids. *IDF Bulletin*, 406, 22-28.
- Coppa M., Ferlay A., Leroux Ch., Jestin M., Chilliard Y., Martin B., Andueza D. (2010): Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy. *International Dairy Journal*, 20 (3): 182-189.
- Coppa M., Ferlay A., Chassaing C., Agabriel C., Glasser F., Chilliard Y., Borreani G., Barcarolo R., Baars T., Kusche D., Harstad O. M., Verbič J., Goleký J., Martin B. (2013): Prediction of bulk milk fatty acid composition based on farming practices collected through on-farm surveys. *Journal of Dairy Science*, 96 (7): 4179-4211.
- Dostálová J., Hrubý S., Turek B. (2009): Společnost pro výživu. Konečné znění Výživových doporučení pro obyvatelstvo ČR. [online]. 2009. Dostupné na [www: http://www.vyzivaspol.cz/rubrika-dokumenty/konecne-zneni-vyzivovych-doporuceni.html](http://www.vyzivaspol.cz/rubrika-dokumenty/konecne-zneni-vyzivovych-doporuceni.html), staženo 14.12.2009.
- Drift van der S.G.K., Jorritsma R., Schonewille J.T., Knijn H.M., Stegeman J.A. (2012): Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using Fourier transform infrared spectroscopy analysis of β -hydroxybutyrate and acetone in milk in combination with test-day information. *Journal of Dairy Science*, 95 (9): 4886-4898.
- Hanuš O., Hulová I., Genčurová V., Štolc L., Kučera J., Kopecký J., Jedelská R., Motyčka Z. (2009): Result interpretation of experimental calibration for milk citric acid determination via infra-red spectroscopy (MIR-FT). (In Czech) *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 57 (5): 87-101.
- Hanuš O., Roubal P., Říha J., Vyletětlová Klimešová M., Samková E., Jedelská R., Kopecký J. (2014): Development in indirect infra-red determination of milk acetone. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 62 (5): 919-927.
- Hering P., Hanuš O., Frelich J., Pytloun J., Macek A., Janů L., Kopecký J. (2008): Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech Journal of Animal Science*, 53 (2): 64-76.
- Kalač P., Samková E. (2010): The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55 (12): 521-537.
- Kaylegian K.E., Lindsay R.C.: *Handbook of Milkfat Fractionation Technology and Applications*. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1995. 657 s. ISBN 0-935315-57-8.
- Pešek M., Samková E., Špička J. (2006): Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 51 (5): 181-188.
- Samková E., Hanuš O., Špička J., Kala R., Koubová J., Smetana P., Hasoňová L., Křížová Z., Kopunec P., Kopecký J. (2015): Porovnání referenční a rutinní metody stanovení mastných kyselin mléčného tuku v individuálních vzorcích mléka dojníc - dílčí výsledky. *Náš chov, v tisku*.
- Sojková K., Hanuš O., Kučera J., Genčurová V., Jedelská R., Kopecký J. (2009): Určení limitu přijatelnosti pro validační korelační koeficient jako parametr kvality kalibrace infračervené spektroskopie (MIR) při měření základního složení kravského mléka. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, 51 (4): 50-55.
- Soyeurt H., Dardenne P., Dehareng F., Lognay G., Veselko D., Marlier M., Bertozzi C., Mayeres P., Gengler N. (2006): Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 89 (9): 3690-3695.

Kontaktní adresa:

doc. Ing. Eva Samková, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Česká republika, e-mail: samkova@zf.jcu.cz

Přijato do tisku: 13. 7. 2015
Lektorováno: 1. 8. 2015

Příloha 11:

Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., **Kala, R.**, Koubová, J., Smetana, P., Hasoňová, L., Křížová, Z., Klímová, Z., Kopunecz, P., Kopecký, J. 2015. Porovnání metod stanovení mastných kyselin v mléce (Comparison of methods for the determination of the fatty acids of milk fat). *Náš chov*, 75(9): 74-76. (**J_{REC}**)

Porovnání metod stanovení mastných kyselin v mléce

E. Samková¹, O. Hanuš², J. Špička¹, R. Kala¹, J. Koubová¹, P. Smetana¹, L. Hasoňová¹, Z. Křížová¹, P. Kopunec³, J. Kopecký²
¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, ²Výzkumný ústav mlékárenský Praha, ³Českomoravská společnost chovatelů a. s., Hradištko

Souhrn

V chovech českého strakatého a holštýnského skotu bylo odebráno celkem 78 individuálních vzorků mléka pro porovnání dvou metod analýzy mastných kyselin – rutinní (pomocí infračervené spektroskopie – MIR-FT) a referenční (pomocí plynové chromatografie – GC). Z výsledků vyplývá, že mastné kyseliny C16:0 a C18:1 a skupiny nasycených a nenasycených mastných kyselin lze stanovovat pomocí MIR-FT s poměrně vysokou mírou věrohodnosti (korelace 0,7543, 0,7607, 0,8424 a 0,9492; $p < 0,001$). V případě skupiny polynenasycených mastných kyselin je validační koeficient korelace nižší (0,2891; $p < 0,05$).

Klíčová slova: kráva; individuální vzorek mléka; plynová chromatografie; infračervená spektroskopie; věrohodnost analytických výsledků; korelace; kalibrace; validace

Summary

78 individual milk samples were taken in the Czech Fleckvieh and Holstein dairy cow herds to compare two methods for analyses of fatty acids – routine (using infrared spectroscopy – MIR-FT) and reference (by gas chromatography – GC). The results show that the fatty acids C16:0 and C18:1 and the group of saturated and unsaturated fatty acids can be determined using MIR-FT with a relatively high reliability (correlations 0.7543, 0.7607, 0.8424 and 0.9492; $p < 0.001$). In case of polyunsaturated fatty acids is the validation correlation coefficient lower (0.2891; $p < 0.05$).

Keywords: cow; individual milk sample; gas chromatography; infrared spectroscopy; analytical result reliability; correlation; calibration; validation



Tab. 1 – Parametry chromatografické analýzy

| Parametr | Hodnota |
|--------------|---|
| Kolona | SelectFAME (Varian), 50 m/0,25mm |
| Detektor | FID (plamenové ionizační) |
| Teplota: | – kolona 55 °C – 5 min, 40 °C/min – 170 °C, 2 °C/min – 196 °C, 10 °C/min – 210 °C – 8 min |
| – injektor | 250 °C |
| – detektor | 250 °C |
| Nosný plyn | helium |
| Průtok helia | 1,8 ml/min |
| Nástřik | 1 µl, split 10 |

Tab. 2 – Základní statistické charakteristiky vybraných mléčných ukazatelů

| Ukazatel | Český strakatý skot (n = 39) | | | Holštýnský skot (n = 39) | | | Celkem | | |
|---------------|------------------------------|----------------|------|--------------------------|----------------|------|--------|----------------|------|
| | x | s _x | v% | x | s _x | v% | x | s _x | v% |
| Dojivost (kg) | 24,6 | 6,8 | 27,7 | 29,9 | 8,9 | 29,8 | 27,2 | 8,3 | 30,5 |
| Tuk (%) | 4,27 | 0,54 | 12,8 | 3,61 | 0,89 | 24,7 | 3,94 | 0,81 | 20,5 |
| Bílkoviny (%) | 3,51 | 0,36 | 10,2 | 3,25 | 0,34 | 10,5 | 3,38 | 0,37 | 11,0 |
| Laktóza (%) | 5,00 | 0,23 | 4,6 | 4,87 | 0,24 | 4,9 | 4,94 | 0,24 | 4,9 |

x = aritmetický průměr; s_x = směrodatná odchylka; v% = variační koeficient = (s_x/x)*100;

Tab. 3 – Základní statistické charakteristiky zastoupení vybraných mastných kyselin (MK) a jejich skupin při stanovení plynovou chromatografií (GC) a infračervenou spektroskopií (MIR) přepočtené na shodné jednotky s GC

| | GC: g/100 g všech MK | | | MIR: g/100 g všech MK | | | r _{xy} | p | R ² % |
|-------|----------------------|----------------|------|-----------------------|----------------|------|-----------------|-------|------------------|
| | x | s _x | v% | x | s _x | v% | | | |
| C16:0 | 33,56 | 3,63 | 10,8 | 38,73 | 2,90 | 7,5 | 0,7543 | 0,001 | 56,9 |
| C18:1 | 17,99 | 2,97 | 16,5 | 27,37 | 3,50 | 12,8 | 0,7607 | 0,001 | 57,9 |
| PUFA | 3,26 | 0,62 | 18,9 | 8,44 | 1,38 | 16,4 | 0,2891 | 0,05 | 8,4 |
| SFA | 69,54 | 3,82 | 5,5 | 70,85 | 3,16 | 4,5 | 0,8424 | 0,001 | 71,0 |
| UFA | 27,22 | 3,93 | 14,4 | 27,32 | 4,15 | 15,2 | 0,9492 | 0,001 | 90,1 |

x = aritmetický průměr; s_x = směrodatná odchylka; v% = variační koeficient = (s_x/x)*100; r_{xy} = validační koeficient korelace; R² = koeficient determinace = (r_{xy})²; PUFA = polynenasycené MK včetně konjugované kyseliny linolové; SFA = nasycené MK se sudým a lichým počtem uhlíků; UFA = nenasycené MK

Úvod

Způsobů, jak cíleně modifikovat profil mastných kyselin mléčného tuku pro podporu zdraví spotřebitelů, případně vhodnější technologické vlastnosti mléka (Barlowska et al., 2011), může být více. Mezi nejrychlejší způsoby patří především změna krmné dávky nebo výběr mléčné suroviny od určitých dojnic.

Pravidelnému sledování zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku dnes brání poměrně náročná (časově i finančně) referenční metoda analýzy mastných kyselin pomocí plynové chromatografie (Kaylegian et al., 2009). Určitou nadějí do budoucna by se mohlo stát rutinní stanovení některých mastných kyselin nebo jejich specifických skupin pomocí infračervené spektroskopie s následným vyhodnocením signálu Fourierovými transformacemi (MIR-FT). Metoda je v současnosti využívána v analytice mlékařství pro kontrolu kvality syrového mléka nebo pro stanovení některých minoritních složek mléka (močovina,

kyselina citrónová, volné mastné kyseliny, ketony) – např. Hering et al., 2008. Cílem práce bylo validační porovnání zastoupení vybraných mastných kyselin a jejich skupin v individuálních vzorcích mléčného tuku dojnic stanovených referenční a rutinní metodou.

Materiál a metodika

Odběry individuálních vzorků mléka byly realizovány v lednu a únoru 2015 v chovech plemen české strakaté (n = 39) a holštýnské (n = 39). Získané vzorky byly rozděleny na dvě části, z nichž první byla použita pro stanovení základního chemického složení mléka a rutinní stanovení mastných kyselin pomocí pravidelně kalibrovaného zařízení CombiFoss FT+ (MilkoScan FT+ 76150, Fossomatic FC 79910), 500 vzorků/hod. (Foss Analytical A/S, Denmark) metodou MIR-FT (dále jen **MIR**). Druhá část byla využita pro stanovení mastných kyselin metodou plynové chromatografie (dále jen **GC**) po předchozí lyofilizaci vzorků, extrakci

tuku petroletherem a převedení na metylestery mastných kyselin (alkalicou katalýzou) podle předepsaných parametrů (tab. 1).

V programu Microsoft Excel byly hodnoty o obsazích mastných kyselin získané rutinní metodou přepočítány na hodnoty odpovídající vyjádření referenční metody, tedy plynové chromatografie (g/100 g všech mastných kyselin) podle vzorce: **(An * 100)/(Bn * 0,95)**, kde **An** je hodnota mastných kyselin vyjádřená v g/100 g mléka, **Bn** je hodnota obsahu tuku v g/100 g mléka a 0,95 je koeficient přepočtu obsahu tuku na mastné kyseliny.

Pro statistické výpočty (popisné statistiky, korelační a regresní analýza) byla zvolena nabídka programu Statistica 12.0 (StatSoft 2013).

Výsledky a diskuse

Základní statistické charakteristiky pro dojivost a základní složení mléka dojnic (tab. 2) vypovídají o velmi dobře vyváženém souboru. Nejvyšší variabilita daná hodnotou variačního koeficientu byla pochopitelně zjištěna u dojivosti (30,5 %) a tučnosti (20,5 %), tradičně nejnižší variabilita pak u obsahu laktózy (4,9 %). Variabilita v jednotlivých ukazatelích byla předpokladem pro zajištění

velkého rozpětí i v zastoupení mastných kyselin a jejich skupin. Vyšší hodnoty variačních koeficientů byly v souladu s literaturou (Pešek et al., 2006) zjištěny u nenasycených mastných kyselin (C18:1, PUFA, UFA), nižší u nasycených mastných kyselin (C16:0, SFA), a to u obou metod stanovení (tab. 3).

Průměrná zastoupení výše uvedených mastných kyselin a jejich skupin zjištěná oběma metodami (GC a MIR) se liší zejména v případě PUFA, kdy byl stanoven i nízký korelační koeficient ($r_{xy} = 0,2891$; $p < 0,05$). Mnohem spíše totiž odpovídá skutečnosti hodnota mastných kyselin stanovených GC (3,26 %), neboť při nevyužití pastvy bývá zastoupení PUFA nižší (Samková et al., 2011). Velmi shodné údaje byly naopak zjištěny u skupin SFA ($r_{xy} = 0,8424$; $p < 0,001$; obr. 1) a UFA ($r_{xy} = 0,9492$; $p < 0,001$). Obě tyto skupiny by bylo možné stanovovat pomocí MIR s vyšší mírou věrohodnosti. To znamená, že 71,0 a 90,1 % variability v hodnotách SFA a UFA podle nepřímé rutinní metody (MIR) je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční metody (GC). Uvedené lze označit za dobrou schopnost analytické výpovědi nepřímé metody, resp. její zcela akceptovatelnou věrohodnost výsledků k praktické

Chybí vám pohotová energie ve formě jednoduchých cukrů do TMR pro dojnice?

SUGAR 45

DOPLŇKOVÉ KRMIVO PRO DOJNICE

- Je vhodný doplněk krmných dávek notoricky chudých na cukry
- zlepšuje stravitelnost vlákniny
- doplňuje energii jiným způsobem a nezvyšuje nebezpečí bacherových acidóz
- je ideální také v případě rizika druhotné fermentace TMR
- zvlhčuje TMR a udržuje její homogenitu

Bližší informace u zástupců firmy TREWIT s.r.o.

www.trewit.cz

TREWIT s.r.o.
Za dvorem 305, Zlín 12 – Štípa
tel./fax: +420 577 915 448
e-mail: trewit@trewit.cz



interpretaci. Většina uvedených validačních korelací mezi výsledky sledovaných metod (tab. 3) byla v podobných hodnotách (s ohledem na těsnost vztahu a sledovanou mastnou kyselinu nebo skupinu mastných kyselin) v porovnání k dosud publikovaným výsledkům (Soyeurt et al., 2006).

Odlišné výsledky vykazovalo zastoupení obou obsahově bohatých mastných kyselin. Hodnoty zjištěné pomocí MIR pro C16:0 byly mírné, pro C18:1 pak výrazně nadhodnocené, což si lze u C18:1 vysvětlit množstvím *cis*, resp. *trans* izomerů. Zatímco hodnota C18:1 stanovená GC je pouze hodnotou kyseliny olejové (C18:1 *cis*9), v případě MIR mohlo jít o izomerů více. V obou případech však byly validační korelační koeficienty statisticky vysoce významné ($r_{xy} = 0,7543$; resp. 0,7607; $p < 0,001$). V daných případech C16:0 a C18:1 podle MIR je vysvětlitelných variabilitou v hodnotách GC. To je stále možné označit metodicky za akceptovatelnou věrohodnost výsledků pro praktické použití. Navíc, průměrný posun výsledných hodnot, obecně při

nepřímých analýzách a jejich kalibracích, není závažným metodickým problémem (rozhodující je těsnost vztahů výsledků mezi metodami), neboť ho lze kompenzovat statisticky, tj. kalibrací MIR na výsledky GC podle lokálních podmínek, resp. kalibračním přestavním přístroje, nebo korekcí adjustovaným specifickým korekčním faktorem (podle konkrétních výsledků GC).

Závěr

Podle získaných výsledků validace analytické kalibrace se ukázalo, že metoda MIR-FT pro určení profilu mastných kyselin mléčného tuku u krav je dostatečně efektivní, při porovnání k výsledkům metody referenční chromatografické, pro případný screening a selekci mléčné suroviny ke garanci produkce specifických mléčných výrobků se zvýšeným obsahem zdraví prospěšných mastných kyselin.

Seznam literatury

Barlowska J., Sz wajkowska M., Litwińczuk Z., Król J. (2011): Nutritional value and techno-

logical suitability of milk from various animal species used for dairy production. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10 (6): 291-302.

Hering P., Hanuš O., Frelich J., Pytloun J., Macek A., Janů L., Kopecký J. (2008): Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. Czech Journal of Animal Science, 53 (2): 64-76.

Kaylegian K. E., Dwyer D.A., Lynch J. M., Bauman D. E., Fleming J. R., Barbano D.M. (2009): Impact of fatty acid composition on the accuracy of mid-infrared fat analysis of farm milks. Journal of Dairy Science, 92 (6): 2502-2513.

Pešek M., Samková E., Špička J. (2006): Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. Czech Journal of Animal Science, 51 (5): 181-188.

Samková E., Pešek M., Hanuš O., Šlachta M., Špička J., Frelich J., Kopecký J., Jedelská R. (2011): Zastoupení významných mastných kyselin v mléčném tuku dojníc v období pastvy. *Náš chov*, 71 (11): 68-70.

Soyeurt H., Dardenne P., Dehareng F., Lognay G., Veselko D., Marlier M., Bertozzi C., Mayeres P., Gengler N. (2006): Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. Journal of Dairy Science, 89 (9): 3690-3695.

Další literatura je k dispozici u autorů.

Článek byl odborně recenzován.

Tato práce byla uskutečněna s podporou projektu MZe NAZV KUS QJ1510336 a výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 6007665806. Autoři rovněž děkují majitelům farem za spolupráci při realizaci této studie.

Doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.,¹⁾

doc. Ing. Jiří Špička, CSc.,¹⁾

Ing. Robert Kala,¹⁾

Ing. Jana Koubová,¹⁾

Ing. Pavel Smetana, Ph.D.,¹⁾

MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.,¹⁾

Ing. Zuzana Křížová¹⁾

prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.,²⁾

Jaroslav Kopecký²⁾

Ing. Pavel Kopunec²⁾

¹⁾ Jihočeská univerzita

v Českých Budějovicích

²⁾ Výzkumný ústav

mlékárenský, s. r. o., Praha

³⁾ Českomoravská společnost

chovatelů, a. s.,

Kontakt: samkova@zf.jcu.cz

Příloha 12:

Čítek, J., Hanuš, O., Večerek, L., Samková, E., Hanusová, L., Křížová, Z., Jelínková, I., **Kala, R.** 2018. Certifikovaná metodika QJ1510339 CM 181 – Izolace bovinní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a Svazem výrobců mléka a.s. z 24. 9. 2018. Datum certifikace: 8. 10. 2018. (N_{MET})*



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Certifikovaná metodika QJ1510339 č. 181 - název: Izolace bovinní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků

Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) ke stanovení genotypů pro geny ovlivňující kvalitu kravského mléka.

Cíl certifikované uplatněné metodiky:

Cílem certifikované metodiky QJ1510339 č. 181 je předat praktické zkušenosti pro nejširší zavedení molekulárně biologických metod použitelných při odběru a zpracování biologických vzorků, izolaci DNA a navazující genotypizaci genů, které mají potenciál ovlivňovat kvalitu mléka. Cílem autorů je poskytnout zejména přehled neinvazivního získání DNA pro následné analýzy, který bude zpřístupněn laboratorům, zabývajícím se molekulárně genetickými analýzami u skotu.

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Náplní certifikované metodiky QJ1510339 č. 181 je popis metod získání a zpracování biologických vzorků a izolace DNA. Důraz je přitom kladen na neinvazivnost, nízkou cenu a jednoduchost. Metodika obsahuje přehledně uspořádané popisy několika laboratorních metod, vhodných k zavedení i do laboratorů se základním vybavením.

Zdroj certifikované uplatněné metodiky:

Projekt MZe NAZV KUS QJ1510339.

Zpracovali dne: 10. 9. 2018; Jindřich Čítek¹, Oto Hanuš², Libor Večerek¹, Eva Samková³, Lenka Hanusová⁴, Zuzana Křížová¹, Irena Jelínková¹, Robert Kala³; ¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra genetiky a speciální produkce rostlinné; ²Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha; ³Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů; ⁴Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra zootechnických věd

Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 20. 12. 2018.

Abstrakt

Molekulární genetiky je běžnou součástí šlechtitelské praxe. Prvním krokem v každé genetické analýze prováděné na genové úrovni je izolace genomové DNA. Těchto izolací je prováděno poměrně velké množství, jejich cena je proto velmi důležitá. Certifikovaná metodika přináší popis několika neinvazivních metod získání genomové DNA z kravského mléka a býčího spermatu.

Klíčová slova: DNA, izolace, neinvazivní, mléko, sperma

Abstract

Molecular genetics is commonly used in the breeding. The 1st step is, of course, the isolation of genomic DNA. This is an operation made frequently, so the costs are important. The methodics describes few non-invasive methods for isolation of DNA from cow's milk or bull's sperm.

Keywords: DNA, isolation, non-invasive, milk, sperm

Technické parametry (RIV):

Pravidelná systematická podpora kvality specificky efektivní selekce suroviny pro výrobu mléčných výrobků s vyšším nárokem na tepelné ošetření a s vyšší přidanou hodnotou a tím podpora technologické jistoty zpracovatele. Smlouva byla uzavřena se Svazem výrobců mléka, a.s. Za společnost Ing. Radek Musil, kontakt: Jílová 1550/1, 787 01 Šumperk, tel: 00420 583 214 718; 00420 603 891 289; e-mail: ekonom@dubicka.cz.

Příloha 13:

Čítek, J., Večerek, L., Hanusová, L., Samková, E., Hanuš, O., Křížová, Z., Kávová, T., **Kala, R.** 2018. Certifikovaná metodika QJ1510336 CM 1975 – Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Svazem výrobců mléka a.s. z 24. 9. 2018. Datum certifikace: 8. 10. 2018. (N_{MET})*



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Certifikovaná metodika QJ1510336 č. 1975 - název:

Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka

Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) ke stanovení genotypů pro geny ovlivňující kvalitu kravského mléka.

Cíl certifikované uplatněné metodiky:

Cílem certifikované metodiky QJ1510336 č. 1975 je předat praktické zkušenosti pro genotypizaci genů, ovlivňujících složení kravského mléka. Genotypizace je prováděna na genové úrovni metodami molekulární genetiky. Metodika bude poskytnuta laboratorům, které provádí genotypizaci polymorfních lokusů jako servis pro šlechtitele a chovatele dojených plemen v ČR.

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Náplní certifikované metodiky QJ1510336 č. 1975 je popis současného stavu poznání o některých významných genech, ovlivňujících obsah a složení tuku v kravském mléce. Dále metodika přináší přehledně uspořádané laboratorní metodiky, umožňující implementaci do laboratorní se základním vybavením pro molekulárně genetické analýzy.

Zdroj certifikované uplatněné metodiky:

Projekt MZe NAZV KUS QJ1510336.

Zpracovali dne: 3. 9. 2018; Jindřich Čítek¹, Libor Večerek¹, Lenka Hanusová², Eva Samková³, Oto Hanuš⁴, Zuzana Křížová¹, Tereza Kávová¹, Irena Jelínková¹, Robert Kala³;
¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra genetiky a speciální produkce rostlinné; ²Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra zootechnických věd; ³Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů; ⁴Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 20. 12. 2018.

Abstrakt

Kromě pozornosti, kterou musí producenti syrového kravského mléka věnovat neustálému zlepšování výživy, ustájení, správnému dojení a ošetření mléka po nadojení se nabízí využití nejnovějších molekulárně-genetických metod ve šlechtitelské práci. Genotypizace majorgenů umožňuje efektivní výběr žádoucích variant a následné ovlivnění kvality mléka. Zejména geny ovlivňující tučnost mléka zde mohou významně napomoci šlechtitelskému úsilí, které je nyní veden zejména ve směru genomové selekce. Cílem certifikované metodiky je shrnout praktické zkušenosti a ucelené laboratorní metodiky pro genotypizaci několika genů, ovlivňujících složení kravského mléka a předat je laboratořím, které provádí genotypizaci polymorfních genů jako servis pro šlechtitele a chovatele dojených plemen v ČR.

Klíčová slova: mléko, polymorfismus, *DGATI*, *SCD1*, *LEP*, *AGPAT6*

Abstract

In dairy industry, except of care for nutrition, housing, milking etc. the use of methods of molecular biology offers quality improvement of milk. Genotyping of majorgens enables effective selection of favourable variants and influencing of milk quality. Especially the genes influencing the fat content could help significantly in the breeding, even though the genomic approach is now favoured. The goal of the methodic is to summarize the practice and labour methodics for genotyping of some genes, influencing the milk composition, and offer it to the labs doing the genotyping as a service for breeders.

Key words: milk, polymorphism, *DGATI*, *SCD1*, *LEP*, *AGPAT6*

Technické parametry (RIV):upravit

Pravidelná systematická podpora kvality specificky efektivní selekce suroviny pro výrobu mléčných výrobků s vyšším nárokem na tepelné ošetření a s vyšší přidanou hodnotou a tím podpora technologické jistoty zpracovatele. Smlouva byla uzavřena se Svazem výrobců mléka, a.s. Za společnost Ing. Radek Musil, kontakt: Jílová 1550/1, 787 01 Šumperk, tel: 00420 583 214 718; 00420 603 891 289; e-mail: ekonom@dubicka.cz.

Příloha 14:

Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Klimešová, M., Hasoňová, L., Jedelská, R., Trávníček, J., Kopecký, J., **Kala, R.**, Elich, O. 2017. Certifikovaná metodika QJ1510336 RO1417 CM 35 – Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Českomoravskou společností chovatelů a.s. z 27. 9. 2017. Datum certifikace: 22. 12. 2017. (N_{MET})*



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Certifikovaná metodika QJ1510336 RO1417 CM 35 - název:

Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku

Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) k řešení referenčně-rutinních systémů analytických laboratoří testace kvality syrového mléka pro zvýšení věrohodnosti výsledků profilu mléčného tuku.

I) Cíl certifikované uplatněné metodiky:

Cílem certifikované metodiky QJ1510336 RO1417 CM 35 je rozšíření spektra vyšetřovacích metod a analytů a zajištění a zvýšení věrohodnosti výsledků a provozní jistoty managementu rutinních laboratoří při kontrole složení mléka pro účely kontroly kvality syrového kravského mléka – podpora možnosti produkce specifických mléčných potravin.

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Náplní certifikované metodiky QJ1510336 RO1417 CM 35 je implementace dosažených výsledků, získaných na základě předchozího výzkumu a vývoje v rámci řešení projektů MZe NAZV KUS QJ1510336 a MZe RO1417 a v rámci koordinační a konzultační metodické činnosti referenční laboratoře pro syrové mléko (VÚM Praha) do prostředí laboratoří kontroly kvality mléka a mléčné užitkovosti dojníc provozovaných Českomoravskou společností chovatelů, a.s.

Zdroj certifikované uplatněné metodiky:

Projekty MZe NAZV KUS QJ1510336 a MZe RO1417.

Zpracovali dne: 8. 9. 2017; Eva Samková¹, Oto Hanuš², Jiří Špička¹, Marcela Klimešová², Lucie Hasoňová¹, Radoslava Jedelská², Jan Trávníček¹, Jaroslav Kopecký², Robert Kala¹, Ondřej Elich²; ¹ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů; ² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 22. 12. 2017.

Abstrakty:

RIV

Certifikovaná metodika je zaměřena na validaci kalibrace stanovení mastných kyselin mléčného tuku metodou infračervené spektroskopie s Fourierovými transformacemi. Byly odebrány bazénové (BVM) a individuální vzorky (IVM) mléka ($n = 60$ a 345) v chovech (15 stád) dojnic plemene Holštýn a České strakaté za účelem porovnání dvou metod stanovení mastných kyselin (MK) – rutinní/nepřímá (pomocí infračervené spektroskopie – MIR-FT) a referenční/přímá (pomocí plynové chromatografie - GC). Těsnost vztahů mezi oběma metodami je významným ukazatelem kvality kalibrace. 51,4 a 85,2 % variability v hodnotách nasycených MK (SFA) a nenasycených MK (UFA) podle MIR-FT je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční metody GC (BVM). Více jak 70 % variability v hodnotách nasycených MK a 86,2 % variability v hodnotách nenasycených MK podle nepřímé rutinní metody MIR-FT je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční metody GC (IVM). Relativně shodné údaje a vyšší těsnosti vztahů byly zjištěny (BVM) u kyseliny palmitové (0,7517; $P < 0,001$), SFA (0,7169; $P < 0,001$) a UFA (0,9232; $P < 0,001$). Výsledky naznačují, že řadu informací MIR-FT o výskytu MK lze využít pro rutinní stanovení těchto skupin MK a případnou praktickou selekci mléčné suroviny pro specifickou potravinářskou výrobu.

kráva, bazénový a individuální vzorek mléka, plynová chromatografie, infračervená spektroskopie, věrohodnost analytických výsledků, kalibrace, determinace, korelace

RIV

Certified method is focused on calibration validation for milk fat fatty acid determination by infrared spectroscopy with Fourier transformation. 60 and 345 bulk (BMSs) and individual milk samples (IMSs) were taken in 15 Holstein and Czech Fleckvieh dairy cow herds to compare two methods for the determination of fatty acids (FAs) - routine / indirect (by infrared (IR) spectroscopy – MIR-FT) and reference / direct (gas chromatography - GC). Tightness of relations between these two methods is important parameter of calibration quality. 51.4 and 85.2% of variability in saturated (SFAs) and unsaturated FAs UFAs(values by indirect method MIR-FT is explainable by variations in the analyses of direct reference method GC (BMSs). Over 70% of variability in saturated FAs values and 86.2% of variability in unsaturated FAs values by indirect method MIR-FT is explainable by variations in the analyses of direct reference method GC (IMSs). Relatively consistent data and higher tightness of relationships were found (BMSs) for palmitic acid (0.7517; $P < 0.001$), SFAs (0.7169; $P < 0.001$) and UFAs (0.9232, $P < 0.001$). The results indicate that a row of MIR-FT information on the occurrence of FAs can be used for routine determination of such groups of FAs and possible practical selection of raw milk for the specific food production.

cow, bulk and individual milk sample, gas chromatography, infrared spectroscopy, analytical result reliability, calibration, determination, correlation.