

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie, potravinových
a přírodních zdrojů**

Katedra chemie



Stanovení různých forem kaseinu v mléce

Diplomová práce

Autor práce: Veronika Kaňková

Vedoucí práce: Ing. Alena Hejtmánková, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Stanovení různých forem kaseinu v mléce“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 3. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní doc. Ing. Alena Hejtmánkové, CSc., za odborné vedení práce a trpělivost při konzultacích. Děkuji i mé rodině a dalším blízkým za podporu.

Stanovení různých forem kaseinu v mléce

Souhrn

Kaseinové bílkoviny mléka mají velký význam především pro výrobu sýrů. Na výtěžnosti při výrobě sýrů má kromě technologie a dalších faktorů velký podíl celkový obsah kaseinů v mléce a také poměrné zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí. Majoritními frakcemi jsou α -kasein, β -kasein a κ -kasein. Ke stanovení proteinů v mléce může být kromě spektrometrie v blízké infračervené oblasti a elektroforetických technik využívána také vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). HPLC je hojně užívaná analytická metoda, která je založena na rozdílné afinitě látek k mobilní a ke stacionární fázi.

V rámci diplomové práce byla zavedena metoda stanovení kaseinových frakcí metodou HPLC. Metoda byla částečně optimalizována za použití kravského mléka a kalibrována na roztoky zakoupených standardů kaseinových frakcí pocházejících z bovinního mléka. Byly analyzovány reálné vzorky kravského, ovčího a kozího mléka. Kozí mléko bylo dostupné v několika variantách: kozy sánské a mléko kozy bílé krátkosrsté z domácího nebo farmového chovu. Ve všech vzorcích mléka byly stanoveny koncentrace kaseinů a vzájemné poměry kaseinových frakcí. Ze získaných chromatogramů je patrné, že kaseinové složení je pro kravské, ovčí a kozí mléko odlišné. Odlišné koncentrace kaseinových frakcí v mléce různých druhů zvířat byly statisticky prokázány téměř ve všech případech. Výjimkou byla koncentrace β -kaseinu v mléce kozy bílé krátkosrsté z domácího i farmového chovu a kravském mléce, v těchto druhích mléka nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v koncentraci β -kaseinu. Analýzami individuálních vzorků mléka kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu bylo prokázáno, že obsahy kaseinů v mléce různých zvířat chovaných za stejných podmínek mohou být odlišné. Byly vyhodnoceny poměry β -kaseinu vůči α -kaseinu, poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu a poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu v jednotlivých druhích mléka. Poměry byly ve všech případech při mezidruhovém srovnání mlék statisticky významně odlišné. Analýzou bazénových vzorků mléka kozy sánské bylo zjištěno, poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu je v průběhu laktace stabilní. Pro všechna kozí mléka byly typické vyšší hodnota poměru β -kaseinu vůči κ -kaseinu. Poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu byl nejvyšší v ovčím mléce. Metodu HPLC lze i přes uvedené nedostatky využít právě k těmto účelům, je však třeba dále pokračovat v její optimalizaci.

Klíčová slova: mléko, α -kasein, β -kasein, κ -kasein, HPLC, polymorfismus bílkovin

Determination of different forms of casein in milk

Summary

Casein proteins are important especially for cheese making. In addition to technology and other factors, casein concentration in milk and relative representation of individual casein fractions influence cheese yield. Majority fractions are α -casein, β -casein and κ -casein. For the determination of proteins in the milk can be used electrophoretic techniques or near infra-red spektrometry. High performance liquid chromatography (HPLC) is going to be used. HPLC is widely used analytical method, which is based on differential affinity of the substances to the mobile and the stationary phase.

The thesis has introduced the method of determining the casein fractions by HPLC. The method was partially optimized using cow milk and calibrated to the standard solutions, which were purchased casein fractions derived from the bovine milk. Real samples of cow, sheep and goat milk were analyzed. The goat milk was available in several variants: Sanski goat milk and white shorthair goat from domestic or farm breeding. All milk samples were analyzed for casein and casein fractions proportions. Chromatograms show that the casein formula is different in cow, sheep and goat milk. Different concentrations of the casein fraction in the milk of various animal species have been statistically detected in almost all cases. The exception was the concentration of β -casein in the milk of white shorthair goat from the domestic and the farm breeding and cow milk. In these types of milk there was no statistically significant difference in the concentration of β -casein. Analysis of individual samples of white shorthair goat milk from the farm breeding shown that casein content in the milk of different animals reared under the same conditions may be different. Ratios of β -casein to α -casein, β -casein to κ -casein and α -casein to κ -casein were evaluated in all samples. Interspecific comparisons proved that ratios were statistically significantly different in all milks. In the milk of Sanski goat, there was found the stable ratio of β -casein to α -casein during lactation. For all goat milk there were typical higher values of the ratio of β -casein to κ -casein. The ratio of α -casein to κ -casein was highest in the sheep milk. Despite some shortcomings, it is possible to use the HPLC method possible for these purposes, but it is necessary to continue with its optimization.

Keywords: milk, α -casein, β -casein, κ -casein, HPLC, protein polymorphism

Obsah

1	Úvod	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	10
2.1	Cíle práce	10
2.2	Vědecké hypotézy	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Složení mléka	11
3.1.1	Lipidy	11
3.1.2	Sacharidy	11
3.1.3	Bílkoviny	12
3.2	Bovinní mléko	14
3.2.1	Bovinní kaseiny	14
3.2.2	Bovinní syrovátkové bílkoviny	17
3.3	Ovčí mléko	18
3.3.1	Ovčí kaseiny	19
3.3.2	Ovčí syrovátkové bílkoviny	19
3.4	Kozí mléko	19
3.4.1	Kozí kaseiny	20
3.4.2	Kozí syrovátkové bílkoviny	22
3.5	Výtěžnost při výrobě sýrů	22
3.5.1	Druh mléka	23
3.5.2	Obsah vápníku	24
3.5.3	Obsah genetické varianty kaseinů	24
3.6	Metoda HPLC ve stanovení proteinů	26
3.6.1	Typy stacionárních fází	27
3.6.2	Typy mobilních fází	28
3.6.3	Detektor diodového pole	28
3.7	Stanovení kaseinů podle různých autorů	29
3.7.1	Izolace kaseinu z mléka	29
3.7.2	Příprava vzorku	29
3.7.3	HPLC separace	30
4	Materiál a metodika	33
4.1	Chemikálie	33
4.2	Přístroje	33
4.3	Pomůcky	33
4.4	Příprava roztoků	34

4.5	Příprava vzorku mléka	34
4.6	Příprava standardních roztoků.....	35
4.7	Výběr chromatografické kolony	35
4.8	Chromatografické podmínky	36
4.9	Vzorky mléka	38
5	Výsledky	40
5.1	Kalibrace	40
5.2	Meze detekce a kvantifikace	42
5.3	Opakovatelnost metody.....	42
5.4	Chromatogramy mlék.....	43
5.5	Obsah kaseinu v kravském mléce	46
5.6	Obsah kaseinů v mléce kozy sánské	47
5.7	Obsah kaseinů v mléce kozy bílé krátkosrsté	52
5.8	Obsah kaseinů ovčím mléce.....	57
5.9	Porovnání obsahů a poměrů kaseinů.....	58
6	Diskuze.....	60
7	Závěr	67
8	Seznam použité literatury	68
9	Přílohy	72
10	Seznamy	76
10.1	Seznam zkratk.....	76
10.2	Seznam obrázků.....	76
10.3	Seznam tabulek.....	76
10.4	Seznam příloh.....	77

1 Úvod

Bílkoviny jsou výživově hodnotnou složkou mléka. Podle vlastností při srážení mléka jsou mléčné bílkoviny rozděleny na syrovátkové a kaseinové. Kasein je definován jako fosfoprotein mléka, který je vysrážen z odtučněného mléka při pH 4,6 a teplotě 20 °C. Kasein však nepředstavuje homogenní bílkovinu a je složen z více frakcí o různých vlastnostech.

Kaseinové bílkoviny mají velký význam především pro výrobu tvarohů a sýrů. Sýry lze vyrábět z různých druhů mléka. Vlastnosti sýrů a výtěžnost výroby přímo závisí na vlastnostech mléka. Na výtěžnosti při výrobě sýrů má kromě technologie a dalších faktorů velký podíl celkový obsah kaseinů v mléce a také poměrné zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí. Majoritními frakcemi jsou α -kasein, β -kasein a κ -kasein. Na základě znalosti kvalitativního i kvantitativního složení mléka je možno odhadnout, zda je mléko vhodné pro výrobu sýrů či nikoliv. Případně je možné na základě analýz mléka selektovat jedince, kteří mají mléko o určitém složení a dále zvířata šlechtit na vyšší užitkovost pro výrobu sýrů a podobných produktů získávaných srážením kaseinů.

Kasein jako celek lze stanovit spektrometricky při vlnových délkách blízkých infračervené oblasti (NIR). Touto metodou ale nelze stanovit jednotlivé kaseinové frakce. Za tímto účelem je často využívána elektroforéza. Pro stanovení proteinů v mléce se kromě elektroforetických technik začíná využívat vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). HPLC je metoda, která je založena na rozdílné afinitě látek k mobilní a ke stacionární fázi. Na základě toho jsou látky separovány a každá separovaná složka je charakterizována specifickým retenčním časem pro daný systém. Práci zbývajících se touto problematikou není mnoho. Vývoj optimální metody pro stanovení jednotlivých bílkovinných frakcí v bovinním, kozím a ovčím mléce je poměrně komplikovaný v důsledku celé řady faktorů. Jde především o polydisperzitu kaseinových frakcí, nedostupnost čistých standardů jednotlivých kaseinových frakcí z bovinního mléka a nedostupnost těchto standardů pocházejících z kozího a ovčího mléka.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Cíle práce

Cílem diplomové práce je optimalizace HPLC metody pro stanovení kaseinových frakcí v mléce v jedné analýze. Dále je cílem porovnání zastoupení kaseinových frakcí v mléce různých druhů hospodářských zvířat a porovnání a statistické zhodnocení zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí v individuálních vzorcích mléka zvířat chovaných za stejných podmínek.

2.2 Vědecké hypotézy

- Různé formy kaseinu v mléce lze s dostatečnou spolehlivostí stanovit vhodnou metodou HPLC.
- Zastoupení kaseinových frakcí v mléce různých druhů zvířat je odlišné.
- Zastoupení kaseinových frakcí v mléce jednotlivých zvířat stejného druhu může být odlišné.

3 Literární rešerše

3.1 Složení mléka

Z fyzikálně-chemického hlediska je mléko biologický fluid se složkami ve třech fázích. Přibližně 40 % sušiny tvoří pravý roztok, jde o disacharid laktózu, organické a anorganické sole, vitaminy a další ve vodě rozpustné malé molekuly. V tomto vodném roztoku jsou dispergovány proteiny, syrovátkové bílkoviny na molekulární úrovni a kaseinové bílkoviny jakožto velké koloidní struktury – micely. Micely mají poloměr 50–600 nm. Lipidy tvoří tukové kuličky o průměru 0,1–20 μm , které jsou stabilizované lipoproteinovou membránou a emulzifikované v mléčné plasmě (Roginski et al., 2003).

Mléka různých druhů se složením liší. V Tabulce 1 je znázorněno průměrné procentuální složení mléka bovinního, kozího a ovčího.

Tabulka 1 Procentuální složení mléka přežvýkavců

Druh mléka	Sušina [%]	Lipidy [%]	Proteiny [%]	Laktóza [%]	Popeloviny [%]
Bovinní	12,7	3,7	3,4	4,8	0,7
Kozí	12,3	4,5	2,9	4,1	0,8
Ovčí	19,3	7,4	4,5	4,8	1,0

(Roginski et al., 2003).

3.1.1 Lipidy

Podle Drbohlava et Vodičkové (2002) kravské mléko obsahuje průměrně 4 % lipidů, z toho je 98–99 % přítomno ve formě tukových kuliček.

3.1.2 Sacharidy

Hlavním sacharidem kravského mléka je disacharid laktóza složený z glukózy a galaktózy. Mléko obsahuje průměrně 4,8 % laktózy (Drbohlav et Vodičková, 2002).

3.1.3 Bílkoviny

Průměrný obsah bílkovin v kravském mléce je 3,3 % (Drbohlav et Vodičková, 2002). Tato hodnota je poměrně stabilní (McSweeney et al., 2007). Složení a poměr jednotlivých mléčných bílkovin se odvíjí od různých faktorů, například od laktačního stadia, ročního období, plemene dojnic a dalších (Drbohlav et Vodičková, 2002).

Bílkoviny se dělí na dvě základní skupiny definované vysrážením odtučněného mléka. Vysrážený kasein je majoritní bílkovina kravského mléka. Podíl kaseinu na celkových bílkovinách mléka činí 80 %. Zbývajících 20 % připadá na syrovátkové bílkoviny, které po vysrážení zůstávají v roztoku (Bordin et al., 2001). Podle Formana et al. (1996) z celkového obsahu bílkovin v mléce 3,3 % připadá 1,6–2,5 % na kasein a 0,7–0,8 % na bílkoviny syrovátky. Suková (2006) uvádí 2,6 % kaseinu a 0,67 % syrovátkových bílkovin.

Kasein je definován jako fosfoprotein bovinního mléka, který je vysrážen z odtučněného mléka při pH 4,6 a teplotě 20 °C. Nejde o homogenní bílkovinu, ale o agregát kaseinových frakcí o různých vlastnostech. Kaseiny lze rozdělit do několika skupin (Velíšek et Hajšlová, 2009). Kaseiny vykazují náznaky α -helikální struktury. Nejde o jasně předvídatelné uspořádání, sekundární struktura kaseinů se mění podle podmínek v matrici. Vzhledem k jejich konformaci jsou kaseiny přístupné působení proteolytických enzymů mléka a postupem času v mléce degradují.

Při teplotě nad 5 °C dochází k agregaci molekul do submicel po 25–30 molekulách kaseinů a tyto jsou uspořádány do micel. V jedné micelle je celkem asi 20 000 molekul kaseinů. Velikost micely je determinována procentuálním zastoupením jednotlivých kaseinových frakcí (Velíšek et Hajšlová, 2009).

Dovnitř struktury micely jsou směřovány nepolární části bílkovin a zde se uplatňují hydrofobní interakce. Polární struktury směřují k povrchu, jde o fosfoserinové zbytky α_s a β -kaseinů a threoninový zbytek κ -kaseinu s oligosacharidy. Tyto polární části interagují s vápenatými ionty a vodou (Velíšek et Hajšlová, 2009). Nesou solvátový hydratační vodný obal s celkově záporným nábojem, který brání spojení micel při nativní rovnováze mléka. K tomu dochází až se změnou vnějších podmínek (Forman et al., 1996).

Submicely jsou spojeny do micel prostřednictvím fosfoserinových skupin α_s a β -kaseinů a vápenatých iontů, eventuálně se zapojením fosfátů a citrátů. κ -kasein nemá v molekule vazebnou oblast (Velíšek et Hajšlová, 2009). Kasein lze pomocí analytických metod určit jako celek, proto se o kaseinu hovoří jako o stálé bílkovinné složce (Pijanowski, 1977).

Průměrná molekulová hmotnost kaseinové micely je přibližně 10^8 Da (Fox et al., 2004). Roginski et al. (2003) uvádějí průměrnou velikost micel asi 100 nm. Kaseinové micely vykazují vysokou hydrataci, na 1 g bílkoviny připadá 2–2,5 g vody (Forman et al., 1996). Fox et al. (2004) uvádějí hydrataci až 4 g na 1 g bílkoviny. V mléce zdravé dojnice se kasein vyskytuje z 96 % v koloidní formě (Forman et al., 1996).

V čerstvém mléce o pH kolem 6,5 se kasein vyskytuje ve formě aniontu, který tvoří s ionty vápníku koloidní roztok kaseinátu vápenatého (Pijanowski, 1977). Ten je stálý i při teplotě 100 °C, nenedaturuje (Roginski et al., 2003). Schopnost kaseinu tvořit koloidní roztok souvisí se záporným elektrickým nábojem kaseinové micely, což příznivě ovlivňuje tvorbu hydratačních vrstev z částic vody (Pijanowski, 1977).

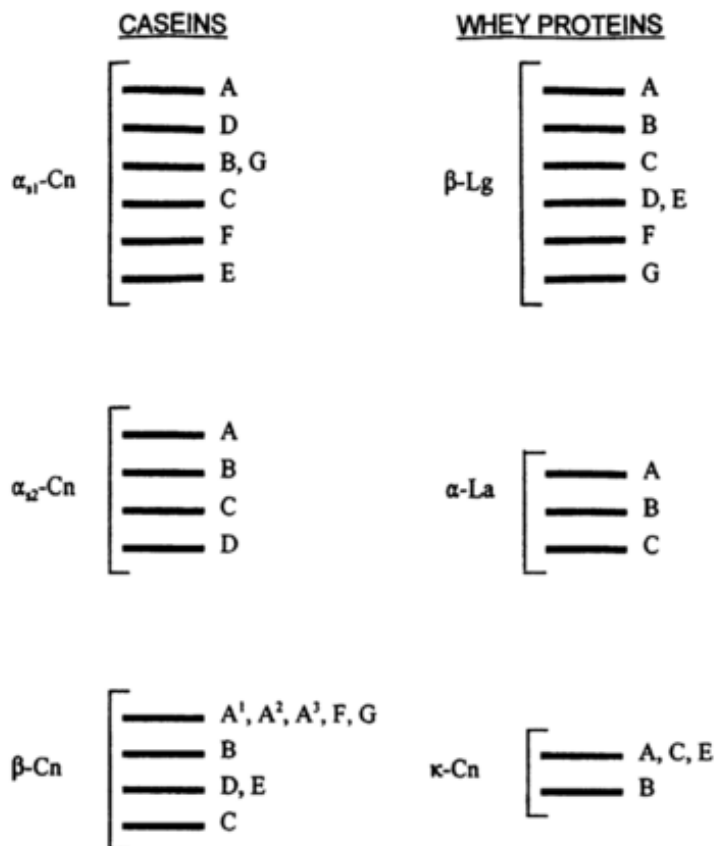
Izoelektricky je kasein srážen z mléka při pH 4,6, zatímco bílkoviny syrovátky zůstávají v roztoku. Ty je možné vysrážet vysrážet při pH 4,6 až při současném zvýšení teploty nad 95 °C (Forman et al., 1996). Teplota ovlivňuje také vzájemné interakce mezi jednotlivými kaseinovými frakcemi a rozpustnost jednotlivých kaseinových frakcí (Roginski et al., 2003).

Zastoupení jednotlivých kaseinových bílkovin v micelách je ovlivňováno vnějšími faktory, např. teplotou, která ovlivňuje míru disociace některých frakcí (Suková, 2005).

Každá bílkovinná frakce mléka vykazuje genetický polymorfismus. Genetický polymorfismus označuje jev, kdy se přirozeně vyskytují dvě a více forem jedné bílkoviny. Diploidní organismy mají jeden gen vždy ve dvou alelách v lokusu, na každém homologním chromozomu se nachází jedna alela. Pokud se alela odlišuje alespoň v jednom nukleotidu, pak při syntéze bílkoviny dochází k záměně aminokyseliny na této pozici. Pokud je četnost výskytu nejčastější alely v určitém lokusu nižší než 0,99, pak lokus vykazuje genetický polymorfismus a pro danou bílkovinu existují různé genetické varianty (FitzGerald, 1997).

Genetické varianty lze odlišit nejlépe metodou sekvenace DNA nebo podle rozdílné elektroforetické mobility. Genetickou variantou se rozumí změna v primární sekvenci aminokyselin. Další odlišnosti variant mohou být způsobeny post-translačními modifikacemi (např. fosforylace na určité aminokyselině) (Fox et McSweeney, 2003). Základní přehled genetických variant bovinních kaseinů je shrnut v Obrázku 1.

GENETIC POLYMORPHISM IN BOVINE SPECIES



Obrázek 1 Genetické varianty mléčných bílkovin

(Fox et McSweeney, 2003)

3.2 Bovinní mléko

3.2.1 Bovinní kaseiny

Bovinní kasein je skupina fosfoproteinů tvořená zejména α_s -kaseinem, β -kaseinem a κ -kaseinem a v menším množství frakcemi vzniklými štěpením těchto hlavních frakcí. Obsahuje vázané minerální složky, hlavně vápník, hořčík, fosfáty a citrany, souhrnně nazývané koloidní kalcium fosfát (Drbohlav et Vodičková, 2002).

Jednotlivé kaseinové frakce se liší primární strukturou, stupněm fosforylace, molekulovou hmotností, rozpustností a izoelektrickým bodem. Pro podrobnější názvosloví je rozhodující počet aminokyselin, molekulová hmotnost a případně i genetická varianta a stupeň

fosforylace (Forman et al., 1996). Bovinní kaseiny jsou většinou fosforylované na nejvyšší možnou míru (Roginski et al., 2003).

Přehled molekulových hmotností a izoelektrických bodů pro majoritní kaseinové frakce je znázorněn v Tabulce 2.

Tabulka 2 Molekulová hmotnost a izoelektrický bod kaseinů

Frakce	Molekulová hmotnost [kDa]	pI – izoelektrický bod
β -kasein	24	5,2-5,85
α_s -kasein	23,6 (α_{s1}) 25,2 (α_{s2})	4,92-5,35
κ -kasein	18	5,37

(Velíšek et Hajšlová, 2009)

Velíšek et Hajšlová (2009) uvádí podíl jednotlivých frakcí kaseinu vzhledem k sumě bílkovin v kravském mléce následovně: $\alpha_s \approx 42 \%$, $\beta \approx 25 \%$, $\kappa \approx 9 \%$, $\gamma \approx 4 \%$. Bordin et al. (2001) uvádějí poměr kaseinů $\alpha_{s1} : \alpha_{s2} : \beta + \gamma : \kappa$ roven 4:1:4:1.

Kaseinové frakce jsou fosforylované na serinu nebo na threoninu. K fosforylaci dochází na těch částech řetězce, kde se vyskytuje sekvence -Ser-X-A. X značí libovolnou aminokyselinu, A značí kyselinu glutamovou, fosforylovaný serin, případně asparagovou kyselinu. Stupeň fosforylace narůstá v pořadí: κ , β , α_{s1} , α_{s2} . Různým stupněm fosforylace je vysvětlována různá citlivost frakcí ke srážení vyvolanému vápenatými kationty. Nejvíce fosforylovaná frakce α_{s2} se sráží při nejnižších koncentracích vápníku. Naopak κ frakce zůstává rozpustná a vůči ostatním frakcím plní úlohu ochranného koloidu (Fox et al., 2004).

3.2.1.1 α -kasein

Kaseinové frakce α_{s1} , α_{s2} jsou hlavními frakcemi α -kaseinu. Vzájemně se liší mírou fosforylace (Farrel et al., 2004). Obě frakce se vyskytují v několika genetických variantách mírně se lišících primární strukturou (Velíšek et Hajšlová, 2009).

α_{s1} -kasein tvoří až 40 % z celkového kaseinu bovinního mléka (Farrel et al., 2004). Obsahuje polypeptidové řetězce složené ze 199 aminokyselin. V polohách 43–80 je navázáno osm fosfoserinových zbytků, tato část molekuly je polární. V přítomnosti vápenatých iontů vniká nerozpustná sůl (Velíšek et Hajšlová, 2009). Reaguje také s Zn^{II} a Fe^{III} , ale dopad těchto kationtů na stabilitu kaseinové micely není zatím známý (Farrel et al., 2004). Mimo majoritní

variantu α_{s1} -kaseinu byla objevena minoritní složka označená jako α_{s0} -kasein, která vykazuje vyšší rychlost při elektroforéze a na serinu v pozici 41 obsahuje jednu fosforylovou skupinu. Protože primární sekvence aminokyselin je u obou proteinů stejná, zřejmě jde o důsledek posttranslačních modifikací (Fox et McSweeney, 2003).

α_{s2} -kasein tvoří až 10 % z celkového kaseinu bovinního mléka (Farrel et al., 2004). Strukturou se podobá α_{s1} -kaseinu, ale má vyšší molekulovou hmotnost a podle Veliška et Hajšlové (2009) není tolik citlivý na přítomnost vápenatých iontů. Také Farrel et al. (2004) uvádějí, že α_{s2} -kasein je srážen při nižších koncentracích Ca^{II} než α_{s1} -kasein. Jde o nejhydrofilnější kaseinovou frakci (Farrell et al. 2004). α_{s2} -kasein vykazuje ze všech kaseinů nejvyšší variabilitu ve fosforylaci, je fosforylován ve třech oblastech molekuly. Obsahuje dvě oblasti, které jsou hydrofobní. α_{s2} -kasein je hydrolyzován účinkem nativního plazminu. Část této frakce se vyskytuje ve formě dimeru vázaného disulfidovými můstky. Tyto dimery mají podobné vlastnosti podobné α_{s1} -kaseinu (Roginski et al., 2003).

3.2.1.2 β -kasein

β -kasein tvoří až 45 % z celkového kaseinu bovinního mléka (Farrel et al., 2004). Obsahuje 209 aminokyselin a pět fosfoserinových zbytků v polohách 1–40. Nepolární řetězce se vyskytují v polohách 136–209. S vápenatými ionty vzniká sůl rozpustná pouze při teplotě nižší než 1 °C (Velišek et Hajšlová, 2009). Míra disociace β -kaseinu se odvíjí od teploty skladování, při chladírenských teplotách (5 °C) se zvyšuje koncentrace β -kaseinu po odstředění v mléčném séru (Suková, 2005). Tento proces je reverzibilní, při zvýšení teploty je podíl β -kaseinu rozpuštěného v séru nižší. Vyšší než chladírenské teploty zpomalují štěpení β -kaseinu, nejspíše v důsledku omezení působení enzymů (Roginski et al., 2003).

β -kasein je nejhydrofobnější kaseinovou frakcí. Stabilita β -kaseinu je ovlivněna plazminem (nativním enzymem mléka). Plazmin způsobuje štěpení disociovaného β -kaseinu na frakce γ_1 , γ_2 a γ_3 (Farrell et al., 2004). Optimální teplota působení plazminu je 37 °C. Při této teplotě je disociovaný β -kasein hydrolyzován až na 40 % původního množství β -kaseinu (Suková, 2005).

3.2.1.3 κ -kasein

κ -kasein se vyskytuje ve dvou genetických variantách a má zásadní význam pro stabilitu kaseinových micel. Jde o glykoprotein složený ze 169 aminokyselin (Velišek

et Hajšlová, 2009). Molekula κ -kaseinu sestává ze dvou rozdílných částí, které mohou být rozděleny působením kyselé proteázy za neutrálního pH (Roginski et al., 2003).

κ -kasein mimo sacharidů D-galaktopyranosy a *N*-acetyl-D-galaktosaminu obsahuje *N*-acetylneuraminovou kyselinu. Sacharidy jsou vázány glykosidovou vazbou prostřednictvím *N*-acetyl- β -D-galaktosaminu na threonin v pozici 133 (Velíšek et Hajšlová, 2009). Většina κ -kaseinových řetězců obsahuje jeden fosfoserinový zbytek podél svého řetězce (Fox et al., 2004) na pozici 149 (Roginski et al., 2003). Glycidová komponenta dává κ -kaseinu hydrofilní charakter a je podstatou jeho stabilizační úlohy ve vztahu ke kaseinům α_{s1} , α_{s2} a β . Ty jsou κ -kaseinem chráněny před vápenatými ionty přirozeně přítomnými v mléčném séru (Forman et al., 1996). Podobně jako u β -kaseinu je i rozpustnost κ -kaseinu závislá na teplotě (Roginski et al., 2003). κ -kasein s vápenatými ionty tvoří rozpustnou sůl (Velíšek et Hajšlová, 2009).

Štěpení κ -kaseinu je podstatou výroby sýrů kyselým nebo sladkým srážením. Příčinou sladkého srážení je citlivost κ -kaseinu na proteázu chymosin nebo jinou obdobnou hydrolázu např. mikrobiálního původu. Dochází ke štěpení molekuly κ -kaseinu na dvě části: hydrofobní para- κ -kasein (aminokyseliny 1–105) a menší hydrofilní kaseinmakropeptid (aminokyseliny 106–169) nazývaný také jako glykomakropeptid (Roginski et al., 2003). Při kyselém srážení dochází k obdobné proteolýze, avšak zapříčiněné snížením pH pod 4,6. Kyselé srážení je využíváno především při výrobě tvarohů (Forman et al., 1996).

3.2.1.4 γ -kasein, λ -kasein

γ -kaseinová frakce označuje proteolytické štěpy β -kaseinu a neexistuje jako samostatná frakce, obdobně λ -kasein vzniká jako štěp α_{s1} -kaseinu (Forman et al., 1996). γ -kasein je isoelektricky srážen při pH 5,8-6,0. Štěpením β -kaseinu působením plazminu (Farrel et al., 2004) vznikají tři frakce (γ_1 , γ_2 , γ_3) se specifickou molekulovou hmotností (Velíšek et Hajšlová, 2009).

3.2.2 Bovinní syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové bílkoviny jsou bílkoviny, které zůstávají v syrovátce po izoelektrickém vysrážení kaseinu při 20 °C. V syrovátce se také vyskytují proteolytické štěpy kaseinu a proteiny z membrány tukových kuliček (Farrel et al., 2004).

Syrovátkové bílkoviny jsou rozpustné globulární bílkoviny, zejména β -laktoglobulin (β -LG) a α -laktalbumin (α -LG) v poměru asi 3:1 v bovinním mléce. Dále jsou zastoupeny

minoritní sérové bílkoviny a imunoglobuliny. Podobně jako kasein i syrovátkové bílkoviny vykazují genetický polymorfismus (Bordin et al, 2001).

3.3 Ovčí mléko

Ovčí mléko obsahuje z mlék kopytníků nejvyšší podíl sušiny, zejména tuku a kaseinu. V sušině ovčího mléka tvoří proteiny a lipidy 69 % sušiny, v sušině kravského mléka tvoří 56 % sušiny. Ovčí mléko má vyšší viskozitu než kravské a déle odolává působení mikrobu po nadojení. Vyšší kyselost mléka je přisuzována většímu podílu bílkovin (Roginski et al., 2003). Ovčí mléko je využíváno především pro výrobu sýrů. Poměr lipidů vůči proteinům je také vyšší a i sýry z ovčího mléka obsahují více tuku (Roginski et al., 2003).

Tietze et Majewski (1997) stanovili obsah tuku a bílkovin v mléce 1464 jedinců různých plemen ovcí, které nejsou primárně chovány na produkci mléka. Vzorky byly odebírány 15., 45. a 75. den laktace a průměrný obsah tuku činil 4,31 %. Obsah tuku v mléce jednotlivých plemen se ale statisticky významně lišil. Nejvyšší zjištěná hodnota byla 7,19 % v mléce plemene Berichonne ve 45. dni laktace. Nejvyšší obsah bílkovin byl zjištěn v mléce plemene Suffolk, bylo stanoveno až 8,55 % bílkovin (Tietze et Majewski, 1997). Procentuální složení ovčího mléka je znázorněno v tabulce.

Tabulka 3 Procentuální složení ovčího mléka

Komponenta	Průměr [%]	Rozsah [%]	Podíl v sušině [%]
Voda	81,60	79,27–83,80	
Laktóza	4,61	4,10–4,95	25,0
Tuk	7,09	5,10–8,70	38,5
Hrubá bílkovina*	5,72	4,75–6,60	31,1
Kasein	4,44		
Syrovátkové bílkoviny	0,98		
Nebílkovinný dusík	0,047		
Popeloviny	0,91	0,70–1,10	4,9
Celková sušina	18,40	16,20–20,73	
Tukuprostá sušina	11,31		

*Celkový dusík x 6,38

(Roginski et al., 2003)

3.3.1 Ovčí kaseiny

Kasinové micely ovčího mléka mají průměr přibližně 160 nm. Pro ovčí kaseiny je typický různý stupeň fosforylace jednotlivých kaseinových frakcí a z toho vyplývající heterogenita kaseinů (Roginski et al., 2003).

κ -kasein se vyskytuje v několika variantách, které se liší mírou fosforylace. Stejně jako u kravského, bývolího a kozího mléka, se v ovčím mléce vyskytuje κ -kasein v několika frakcích o stejném peptidovém řetězci, ale s jiným uhlovodíkovým zbytkem, který se liší mírou glykosylace (Trujillo et al., 2000).

α_{S2} -kasein je v ovčím mléce kaseinovou frakcí o největší heterogenitě, vyskytuje se v mnoha různě fosforylovaných variantách. Byly popsány dvě formy proteinu s delecí 9 aminokyselin, v jednom případě na pozicích 34–42 a ve druhém případě na pozicích 35–43. Delece způsobuje nepřítomnost některých dalších uhlovodíkových zbytků (Trujillo et al., 2000).

α_{S1} -kasein je v ovčím mléce přítomen až v 5 formách (Roginski et al., 2003), ale z více než 50 % je přítomen v jedné formě o délce 199 aminokyselin. Ostatní varianty mají peptidový řetězec kratší a liší se i mírou fosforylace na dvou molekulách serinu, celkem byly popsány 3 stupně fosforylace (Trujillo et al., 2000).

β -kasein je významnou frakcí ovčího mléka, neboť obsahuje 55 % přítomného dusíku, kdežto v kravském mléce obsahuje 36 % přítomného dusíku (Molik et al., 2012). β -kasein má v ovčím mléce dvě různé varianty, které se opět liší v míře fosforylace (Trujillo et al., 2000).

3.3.2 Ovčí syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové bílkovin tvoří 17–22 % bílkovin ovčího mléka (Roginski et al., 2003). Podle Hejtmánkové et al. (2012) je majoritní syrovátkovou bílkovinou ovčího mléka β -laktoglobulin. V ovčím mléce se vyskytuje ve 3 variantách. α -laktalbumin se velmi podobá jeho analogu v kravském mléce a existuje ve dvou variantách, přičemž jedna z nich je velmi vzácná (Roginski et al., 2003).

3.4 Kozí mléko

Kozí mléko je po kravském, bývolím a ovčím mléce čtvrté s nejvyšší produkcí. Chov koz má velký ekonomický význam v zemích, kde není z klimatických důvodů vhodný chov skotu. Složení kozího mléka je ovlivněno plemenem, výživou, klimatem, stádiem laktace

a dalším. Mléka jednotlivců dané skupiny jsou odlišná v důsledku polymorfismu bílkovin, především kaseinů (Roginski et al., 2003). Průměrné hodnoty složení kozího mléka jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4 Procentuální složení kozího mléka

Komponenta	Rozsah [%]	Průměr [%]
Sušina	9,95–21,5	13,02
Tuk	2,46–7,76	4,20
Hrubá bílkovina *	2,49–5,06	3,52
Kasein	2,33–4,63	2,90
Laktóza	3,62–6,30	4,52
Popeloviny	0,69–0,89	0,80

*Hrubá bílkovina získaná přepočtem celkového dusíku faktorem 6,38. Za předpokladu obsahu nebílkovinného dusíku je údaj hrubé bílkoviny cca o 0,25 % vyšší než ve skutečnosti (Roginski et al., 2003).

Složení bílkovin kozího mléka je v základu stejné jako u mléka bovinního. Podle analýzy DNA se aminokyselinové složení bílkovin kozího mléka z 80–90 % shoduje s mlékem kravským (Roginski et al., 2003).

3.4.1 Kozí kaseiny

Oproti kravskému mléku se v kozím mléce vyskytuje poměrně více β -kaseinu a méně α -kaseinu. Podle Roginskiho et al. (2003) se poměry kaseinů v průběhu laktace příliš nemění, na rozdíl od syrovátkových bílkovin (Roginski et al., 2003). Průměrné složení kaseinu kozího mléka je uvedeno v Tabulce 5.

Tabulka 5 Složení kaseinu kozího mléka

Kaseinová frakce	Podíl na celkovém kaseinu [%]
β -kasein	0*-64
κ -kasein	15-29
α_{S1} -kasein	0*-28
α_{S2} -kasein	10-25

*Nulový obsah v případě „nulové“ alely.

(Roginski et al., 2003).

α_{S1} -kasein je v kozím mléce známý v 18 genetických variantách, ke každé se vztahuje určitá koncentrace tohoto proteinu v mléce. Podle toho jsou varianty seřazeny do 4 skupin a mléka se dělí na „silná, střední, slabá a nulová“ (Devold et al., 2010).

Syntéza α_{S1} -kaseinu nemusí v kozím mléce probíhat. Jde o specifikum původních norských koz. Nepřítomnost α_{S1} -kaseinu se projevuje u recesivních homozygotů, kteří se v populacích norských koz vyskytují z více než 70 %. „Nulová“ alela se vyskytuje i u heterozygotů. Koz, které jsou v obou alelách „nenulové“ je v těchto populacích jen malé procento. „Nulové“ alely se kromě norských koz objevují u španělského plemene Canaria a italských Frisa a Garganica. Nepřítomnost α_{S1} -kaseinu ovlivňuje bílkovinný profil mléka a také pH. To se projeví na syřitelnosti a výtěžnosti při výrobě sýrů z tohoto mléka. Kaseinová micela má v tomto případě větší velikost a po 30 minutách enzymového srážení poskytuje méně pevnou sýřeninu (Devold et al., 2010).

Naopak vyšší obsah α_{S1} -kaseinů a jeho příslušných variant (A, všechna B, C, H, L, M) u tzv. „silných mlék“ vykazuje pozitivní korelaci s celkovým obsahem bílkovin, mléčného tuku, vápníku, nižším pH a od toho se odvíjející aktivitou Ca^{II} iontů, menší velikostí kaseinových micel. Tato mléka také mají nejlepší vlastnosti pro syrařství, dobře se sýří a poskytují kvalitní sýry s nejlepší výtěžností oproti mlékům s jinými variantami α_{S1} -kaseinu. Sýry jsou méně náchylné k lipolýze a vzniku nežádoucí chuti (Devold et al., 2010). K těmto závěrům došli také Grosclaude et Martin (1997), kteří vyhodnotili výhodnost alel v pořadí A>E>F. Nepřítomnost α_{S1} -kaseinu může být kompenzována vyšší tvorbou ostatních kaseinů, podle Devolda et al. (2012) ne však tvorbou syrovátkových bílkovin nebo jiných dusíkatých sloučenin. Nižší obsah α_{S1} -kaseinu relativně zvyšuje obsah ostatních kaseinových frakcí a micela má větší průměr (Mátlová et Sztankóová, 2010).

α_{S2} -kasein vykazuje v kozím mléce 3 varianty. Ze základní varianty A jsou odvozeny varianty B a C, které se liší v substituci jedné aminokyseliny a popřípadě i fosforylaci (Roginski et al., 2003).

β -kasein byl původně považován za bílkovinu nevykazující polymorfismus. V průběhu času byly objeveny dvě jeho formy o různé fosforylaci a, obdobně jako v případě α_{S1} -kaseinu, také možná přítomnost „nulové“ alely. „Nulová“ alela se vyskytuje u plemen Garganica, Creole a Corsica s pravděpodobností výskytu asi 20 %. V mlékách, která β -kasein neobsahují, je extrémně nízký obsah celkových bílkovin a mléka se velmi špatně sýří (Roginski et al., 2003). Podle Mátlové a Sztankóové (2010) je β -kasein majoritním kaseinem kozího mléka, tvoří až 50 % kaseinů, což představuje koncentraci 10 g.l⁻¹. Nízký obsah koreluje s nízkým obsahem celkového kaseinu, zmenšováním velikosti micel, prodlužováním doby sýření a nestabilní pevností sýřeniny (Mátlová et Sztankóová, 2010).

κ -kasein má v kozím mléce dvě formy, A a B. Obě jsou analogické k bovinním formám κ -kaseinu. A a B se liší v substituci jedné aminokyseliny na N-konci molekuly a mírou glykosylace. V kozím mléce má κ -kasein oproti analogu v bovinním mléce více záporných nábojů (Roginski et al., 2003).

3.4.2 Kozí syrovátkové bílkoviny

Kozí mléko obsahuje průměrně 0,37–0,7 % syrovátkových bílkovin. Z toho činí 39,2–72,1 % β -laktoglobulin a 17,8–33,3 % α -laktalbuminu (Roginski et al., 2003). Podle Hejtmánkové et al. (2012) závisí podíl těchto dvou bílkovin na stádiu laktace a ke konci laktace se poměry mění. Vyšší proměnlivost v obsahu vykazuje podle Roginskiho et al. (2003) β -laktoglobulin. Kozí β -laktoglobulin vykazuje oproti bovinnímu nižší náboj. Obě kozí syrovátkové bílkoviny se vyskytují ve dvou formách. Kozí α -laktalbumin postrádá metionin a více než bovinnímu je podobný ovčímu analogu (Roginski et al., 2003).

3.5 Výtěžnost při výrobě sýrů

Pro výtěžnost sýrů je stěžejní obsah a kvalita mléčných bílkovin, především kaseinů. Byly provedeny studie týkající se výtěžnosti při výrobě sýrů z bovinního mléka. Autoři se zabývali vlivem jednotlivých kaseinových frakcí na výtěžnost. Byly porovnávány různé genetické varianty těchto frakcí ve vztahu k následné výtěžnosti sýra. Van Boekel (1993) definuje výtěžnost sýra jako sumu bílkovin, tuku, dalších komponent sušiny a vody, které

se podaří převést do sýra. Prvotním určujícím faktorem výtěžnosti sýrů je složení mléka a technologie, která určuje podíl komponent zachycených do sýra (Van Boekel, 1993).

Výtěžnost výroby sýrů je definována jako počet kg sýra získaných ze 100 kg mléka nebo naopak počet kg mléka potřebných na výrobu 100 kg sýra. Jelikož výtěžnost se značně odvíjí od množství kaseinu v mléce, vhodné je vyjádření počtu kg sýra vyrobených z určitého počtu kg kaseinu (Van den Berg, 1993b). Ke stanovení teoretické výtěžnosti mléka je možné užít vzorce dle Van Slyka:

$$Y = \frac{(0,93 F + C - 0,1) \times 1,09}{1 - M}$$

C – obsah kaseinu

F – obsah tuku

M – vlhkost sýra

Y – počet kg sýra získaných ze 100 kg mléka, což odpovídá % výtěžnosti

(Mullan, 2008)

Ze vzorce je patrné, které parametry ovlivňují výtěžnost nejvíce. Pro stanovení výtěžnosti při výrobě sýrů je zásadní obsah parakaseinu, který vzniká jako štěp během srážení. Parakasein je definován jako komponenta, která vznikne po vysrážení mléka trvajícím 30 minut při teplotě 30 °C a po odstranění syrovátky centrifugací nebo filtrací. Stanovení množství zachyceného parakaseinu a určení výtěžnosti je vzhledem ke ztrátám kaseinu během procesu složité. Podle studií ztráty kaseinu činí asi 5–6 %. S parakaseinem je zachycena i část β -kaseinu a proteoso-peptonové frakce (Van Boekel, 1993). Podle Foxe et al. (2004) je maximální výtěžnost v praxi pohybuje okolo 75 % z celkového obsahu bílkovin v mléce (Fox et al., 2004). Výtěžnost je značně ovlivněna i druhem mléka a složením kaseinů.

3.5.1 Druh mléka

Kozí mléko se sráží rychleji než kravské, ale tvoří méně pevnou sýřeninu (Mátlová et Sztankóová, 2010). Ovčí mléko se velmi dobře sráží a je vhodné pro výrobu kvalitních sýrů. Oproti kravskému probíhá sýření rychleji, na koagulaci v daném čase je při výrobě z ovčího mléka nižší spotřeba syřidla. Synereze však trvá déle. Syřitelnost ovčího mléka není tolik ovlivněna teplotou, jako tomu je u mléka kravského. Odlišné chování mléka po záhřevu je přisuzováno změně velikosti kaseinových micel. Výtěžnost ovčího mléka činí asi 18–20 kg sýra ze 100 kg mléka, výtěžnost kravského mléka je průměrně 10 kg sýra. Vyšší výtěžnost ovčího

mléka lze přičíst vysokému podílu sušiny. Ovčí sýry z nestandardizovaného mléka obsahují více tuku v sušině (Roginski et al., 2003).

3.5.2 Obsah vápníku

Kromě obsahu a kvality kaseinu je pro výtěžnost podstatný i obsah vápenatých kationtů v mléce. Snížením hladiny koloidního vápníku a zároveň zvýšením obsahu kaseinu disociovaného do mléčného séra, případně i hydrolýzou kaseinu působením plazminu nebo proteáz somatických buněk dochází ke zhoršení syřitelnosti mléka. Toto zhoršení může být částečně kompenzováno přidávkem CaCl_2 (McSweeney et al., 2007). Standardně je v sýrařství přidáván do koncentrace 20 g.l^{-1} , nejvíce pak 30 g.l^{-1} . Vyšší dávky mohou zapříčinit hořknutí sýrů (Forman et al., 1996). Přítomnost vápenatých kationtů v mléce je pro výrobu sýrů nezbytná. Od určité koncentrace se vápník váže na kyselou část kaseinu (fosfoserin, glutamovou nebo asparagovou kyselinu) a ze sférických důvodů dochází ke změně proporcí v kaseinové micelle a vytváření větších agregátů. Postupně je formován gel – sýřenina (Roginski et al., 2003).

3.5.3 Obsah genetické varianty kaseinů

Při změně poměrů kaseinových frakcí dochází ke změnám vlastností mléka, především ke změnám v ochotě mléka ke srážení. Obohacením mléka o β -kasein dochází ke zhoršení syřitelnosti mléka a pro iniciaci srážení kaseinu je třeba přidat vápník. Vzniká tvrdší sýřenina, která oproti běžnému mléku obsahuje méně vody a vápníku (St-Gelais et Haché, 2005). Zvýšení poměru α_{S1} -kaseinu ku β -kaseinu také způsobuje zhoršenou syřitelnost (Forman et al., 1996).

V případě kozího mléka s nízkým obsahem α_{S1} -kaseinu je výtěžnost oproti jiným variantám výrazně nižší. Jde především o mléka obsahující α_{S1} -kasein v genetické variantě F0. Jako ekonomicky nejvýhodnější vychází varianta AA (Mátlová et Sztankóová, 2010). Nízký nebo nulový obsah α_{S1} -kaseinu negativně ovlivňuje syřitelnost, kaseinové micely většího průměru agregují v méně pevnou sýřeninu (Devold et al., 2010).

Cílem šlechtění koz je eliminovat „nulovou“ alelu α_{S1} -kaseinu a u bovinních mlék zvýšit frekvenci alely B u κ -kaseinu. Při různých genetických variantách a různém obsahu κ -kaseinu lze pozorovat změny ve stabilitě kaseinových micel a v průběhu sýření. Sledování závislosti výtěžnosti sýrů na obsahu genetických variant κ -kaseinu výhledově může přinést pokroky ve

výrobě sýrů (Roginski et al., 2003). Certifikovanou metodiku šlechtění s konkrétními úkony v praxi a údaji o výhodnosti jednotlivých alel uvedly Mátlová et Sztankóová (2010).

Bovinní mléka s nejlepší syřitelností obsahují převážně genetické varianty B. Z dosud provedených studií vyplývá, že BB genetická varianta κ -kaseinu je pro výrobu sýrů nejvhodnější (Forman et al., 1996). Mléko s převahou B κ -kaseinu produkuje asi jen 4 % krav (Van den Berg, 1993a).

Puhan a Jakob (1993) porovnávali výsledky 23 studií, které se zabývaly dobou srážení a pevností sýřeniny u různých genetických variant κ -kaseinu. Ze studií vyplynulo, že doba srážení vychází u varianty AB o 10 % a u varianty BB o 20 % kratší oproti variantě AA, pevnost sýřeniny je u varianty AB o 30 % a u varianty BB o 55 % vyšší oproti variantě AA. Také Hill (1995) upozorňuje na výhody B variant u κ -kaseinu a i β -laktoglobulinu. Ng-Kwai-Hanga (1993) zjistil nejvyšší výtěžnost pro kombinace těchto genetických variant: AA β -kasein, BB κ -kasein a BB β -laktoglobulin. Tong et al. (1993) uvádějí vyšší výtěžnost pro AB κ -kasein oproti AA κ -kaseinu.

Zvýšenou výtěžnost varianty B u κ -kaseinu lze odůvodnit příznivou korelací této genetické varianty s vyšším obsahem bílkovin v mléce a vyšším obsahem ionizovaného vápníku. Při výskytu BB κ -kaseinu je zároveň i jeho podíl na celkovém kaseinu vyšší a vyskytuje se větší množství menších micel. Dochází k rychlejšímu sýření a vzniku pevnější sýřeniny. Zároveň v případě varianty A nebylo možné tento rozdíl kompenzovat přidávkou CaCl_2 , ten ovlivnil pouze dobu sýření (Van den Berg, 1993a).

Puhan et Jakob (1993) porovnali obdobné studie genetických variant α_S -kaseinu a β -kaseinu. Po srovnání 7 studií došli k závěru, že se u BC α_S -kaseinu mírně zkracuje doba srážení a také se asi o 15 % zvyšuje pevnost sýřeniny oproti variantě BB. Pro β -kasein vykazuje nejvýraznější pozitivní rozdíl varianta BB ve srovnání s variantou AA, což vyplynulo z 11 studií.

Meza-Nieto et al. (2013) zkoumali vliv variant A a B u β -laktoglobulinu na výtěžnost sýrů. Odstředěné mléko bylo obohaceno práškovou směsí α -laktalbuminu a β -laktoglobulinu (varianty A, B nebo AB) v poměru 1:2. Všechny vzorky mléka byly pasterovány po dobu 30 minut při teplotě 65 °C. Varianta B vykazovala výrazně vyšší výtěžnost při výrobě sýru, pravděpodobně díky lepší agregaci s kaseinovými micelami během srážení. Vyšší výtěžnost se objevila pouze při přidávku syrovátkových bílkovin v rozmezí 0,225–0,675 %. Naopak při vyšších hodnotách byl zaznamenán výrazný pokles výtěžnosti. Při přidávku 0,675 % syrovátek dochází k vyčerpání vazebných kapacit kaseinu vzhledem k syrovátkovým bílkovinám a další navyšování podílu syrovátek způsobuje změny v uspořádání bílkovinné

matrice a výraznější synerezi. Van den Berg (1993a) objasňuje vyšší výtěžnost v důsledku přítomnosti β -laktoglobulinu ve variantě B jako důsledek jeho částečné korelace s vyšším obsahem kaseinu v mléce a tedy i vyšší výtěžností celkové bílkoviny.

3.6 Metoda HPLC ve stanovení proteinů

Pro identifikaci jednotlivých forem kaseinu je zapotřebí frakce oddělit dostatečně účinnou metodou. K separaci proteinů a peptidů je kromě elektroforetických technik využívána vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). HPLC je metoda, která je založena na rozdílné afinitě látek k mobilní a ke stacionární fázi. Na základě toho se látky separují a každá separovaná složka je charakterizována specifickým retenčním časem pro daný systém.

Instrumentace pro využití HPLC v proteomice se výrazně neliší od konvenční HPLC. Hlavní specifika pro využití v proteomice spočívají v regulaci průtoku mobilní fáze kolonou a přizpůsobení celé instrumentace na co nejnižší průtoky. Nejběžnějšími parametry této separace jsou rychlost mobilní fáze 200–300 nl.min⁻¹ za současného použití kolony o průměru 75–100 μ m (Mitulovic et Mechtler, 2006).

Výběr stacionární a mobilní fáze má majoritní vliv na separaci. Pro separaci kaseinů je často používána HPLC na reverzních fázích (RP-HPLC) a hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) (Pomastowski et al., 2014). Nováková et al. (2013b) uvádějí ještě molekulovou vylučovací a iontově-výměnnou chromatografii.

Podle Mitulovice et Mechtlera (2006) je vzhledem k různorodosti proteinů ve vzorcích vhodné použít multidimenzionální separaci, nejčastěji iontově-výměnnou separaci (kationtovou či aniontovou) s následnou RP-HPLC. Pro preciznější odlišení jednotlivých proteinů lze zařadit i krok zajišťující fosforylaci proteinů. Vyhodnocení kvantifikace fosforylace následně probíhá za využití hmotnostního spektrometru.

RP-HPLC byla zavedena v roce 1976 pro stanovení peptidů a dodnes je nejčastěji používaným typem HPLC separace, podle Novákové et al. (2013) má na celkovém využití HPLC podíl 85 %. Stacionární fáze v RP-HPLC má hydrofobní charakter a mobilní fáze je hydrofilní. Klasická RP s C8–18 se pro separaci proteinů nehodí, využívány jsou C4–6, které vyžadují nižší podíl organické složky v mobilní fázi. Při separaci na RP-HPLC není výtěžnost vysoká a objevují se nečekané píky. Vhodné je využití endcapovaných stacionárních fází při velikosti pórů větší než 30 nm (Nováková et al., 2013b). Pro zkvalitnění analýzy lze RP-HPLC kombinovat např. s afinitní nebo iontově výměnnou chromatografií a následným použitím hmotnostního spektrometru (Mitulovic et Mechtler, 2006).

3.6.1 Typy stacionárních fází

Stacionární fáze je uložena v koloně, kterou charakterizuje průměr a délka. Stacionární fáze musí být chemicky a tepelně stabilní, nesmí reagovat s mobilní fází a rozpouštět se v ní. Případné vymývání stacionární fáze zhoršuje nebo úplně znemožňuje separaci a je způsobeno použitím příliš vysoké teploty nebo nevhodné mobilní fáze. K vymývání jsou nejnáchylnější stacionární fáze chemicky vázané a s krátkými ligandy (Nováková et al., 2013a).

Pro HPLC je vhodné použití monolitické kolony. To znamená, že se využije jednodílná stacionární fáze z porézního materiálu. Oproti membránovým kolonám jsou monolitické kolony snadnější na přípravu, mají vyšší účinnost a jsou odolnější. Hlavní nevýhodou je omezená kapacita, což je problémem při multidimenzionální separaci, pak je nutné přizpůsobit objemy vzorku pro první separaci tak, aby nedošlo k přetížení kolony (Mitulovic et Mechtler, 2006).

Často vyžívanou nepolární stacionární fází je C18, oktadecylový zbytek chemicky vázaný na silikagel, který se značí ODS (oktadecylsilikagel). Nejčastější polární stacionární fází je čistý silikagel nebo chemicky vázané polární látky na silikagelu. Mezi hlavní výhody fází chemicky vázaných na silikagelu patří nerozpustnost v mobilní fázi, mechanická výdrž při vysokém průtoku mobilní fáze, robustnost ke změnám teploty a složení mobilní fáze a nevymývání fáze při dodržení doporučených podmínek (Nováková et al., 2013a).

Za účelem zvýšení citlivosti metody a rozlišení co největšího počtu proteinových frakcí je snižován průměr kolony a rychlost průtoku mobilní fáze. To vede k prodlužování doby analýzy. Separaci lze urychlit regulací velikosti částic stacionární fáze. Při regulaci velikosti částic je zvýšeno rozlišení a získány výhodnější tvary píků. Při snižování velikosti částic je zvýšen tlak v chromatografickém systému. Velikost změny zpětného tlaku je nepřímě úměrná druhé mocnině změny velikosti částic (při snížení velikosti částice 3 μm dvakrát, tedy na 1,5 μm , se zpětný tlak zvýší čtyřikrát). Používané systémy jsou konstruovány na tlak v rozmezí 250–450 barů. To limituje vývoj nových kolon, vzhledem k velikosti tlaku se pro stacionární fáze nehodí částice o průměru menším než 2 μm . Rychlou a účinnou separaci lze provést i při použití stacionární fáze o velikosti částic 2 μm , zároveň je ale nutné využít chromatografický systém vyvinutý pro práci při vysokém tlaku (UPLC) (Mitulovic et Mechtler, 2006).

Stacionární fáze na bázi oxidu křemičitého s alkylovými skupinami (C4, C5, C8, C18) používané pro separaci kaseinů jsou využívány v RP-HPLC. Kolony s touto fází mají značná omezení, zvláště špatnou reprodukovatelnost, selektivitu a rozlišení. To lze částečně zlepšit

využitím polymerních sorbentů obsahujících aminoskupinu, diolovou skupinu nebo karboxylovou skupinu (Pomastowski et al., 2014).

3.6.2 Typy mobilních fází

Polární fázi definuje její složení a z toho vyplývající polarita. Mobilní fáze je zvolena s přihlédnutím k povaze stanovovaných látek (nutné je uvážit všechny možné interakce mobilní fáze s analytem) a stacionární fáze. V případě separace bílkovin je využívána polární mobilní fáze a nepolární stacionární fáze. Jde o separaci na reverzních fázích. Mobilní fází je směs vodné složky (vodné roztoky kyselin nebo bází či pouze voda) a polárních organických rozpouštědel, která jsou mísitelná s vodou (alkoholy, acetonitril) (Nováková et al., 2013a).

Průtok mobilní fáze je vždy nutno přizpůsobit možnostem kolony a doporučením výrobce. Složení mobilní fáze může být buď neměnné, pak se jedná o isokratickou eluci, nebo se mění v čase, pak jde o gradientovou eluci. Při gradientové eluci je postupně zvyšován podíl rozpouštědla s vyšší eluční silou a mezi analýzami musí být dostatečný prostor pro návrat mobilní fáze do počátečních podmínek analýzy (Nováková et al., 2013a).

3.6.3 Detektor diodového pole

Detektor diodového pole patří do skupiny detektorů založených na principu absorpce záření o vlnových délkách 190–800 nm. Kvantifikace je získána aplikací Lambert-Beerova zákona. Zaznamenávanou odezvou je absorbance (Nováková et al., 2013a).

Klasický UV-VIS detektor neumožňuje úplný popis všech proteinů a peptidů po separaci na HPLC (Pomastowski et al., 2014). Pokud jsou dva a více peptidů eluovány ve stejném čase, nelze přesně rozlišit, které spektrum náleží kterému peptidu ze směsi a vhodnější je využití hmotnostní detekce, což je ale i finančně mnohem náročnější (Mítulovic et Mechtler, 2006).

Detektory diodového pole (DAD, PAD) umožňují přeměřit celé spektrum v reálném čase a bez přerušení chromatografické separace. Zdroj vydává záření, které je holografickou mřížkou spektrálně rozkládáno a na každou z fotodiod dopadá zářivý tok o určité délce, ale zeslabený o absorpenci separovaných látek. Rozlišení detektoru je dáno počtem diod na poli, který se pohybuje v rozmezí 512–1024 diod. Hlavní výhoda diodového pole spočívá v možnosti dodatečně zvolit vhodnou vlnovou délku pro detekci analytu, porovnávat spektra s knihovnamí a slouží i k výpočtu čistoty píku (Nováková et al., 2013a).

3.7 Stanovení kaseinů podle různých autorů

3.7.1 Izolace kaseinu z mléka

Různí autoři využívají různé postupy k izolaci kaseinu z mléka. Dále je uveden přehled několika postupů.

V metodice Pomastowskiho et al. (2014) byl kasein izolován prostřednictvím kyselého srážení odstředěného bovinního mléka. Mléko bylo nejprve zahřáto na teplotu 31 °C a poté bylo prostřednictvím 0,1M roztoku HCl upraveno pH na hodnotu 4,3. Po úplném vysrážení kaseinu bylo vše dále zahříváno za stálého míchání rychlostí 1 °C za minutu až do teploty 53 °C. Kaseinový precipitát byl promyt vodou o teplotě 25 °C. Během 12 h je z precipitátu uvolněna syrovátka. Následně je kasein promyt vodou o teplotě 30 °C a poté 10 °C a usušen a rozmělněn. Kasein je přítomen ve formě bílých matných i lesklých zrn. Pro ujištění o kvalitě mohou být 2 mg kaseinu rozpuštěny v 0,5 ml 10% (v/v) amoniaku. Po 4 minutách v amoniaku by měla být kaseinová zrna rozpuštěna.

V postupu Léonila et al. (1991) bylo mléko odstředováno v centrifuze po dobu 10 minut při přetížení 1000 g a teplotě 35 °C. Poté bylo využito enzymového srážení mléka za použití chymosinu nebo mikrobiální proteázy druhu *Endothia parasitica*. Po 20 minutách koagulace bylo pomocí 1M HCl sníženo pH na 4,6. Dále byl vzorek centrifugován při 4600 g po dobu 10 minut. Získaná sraženina byla promyta destilovanou vodou. pH bylo zvýšeno na 7,5 přidáním 1M NaOH. Sraženina byla rozpuštěna a opětovně vysrážena, tento cyklus byl zopakován dvakrát. Vzniklý parakaseinát sodný byl dialyzován proti destilované vodě přes membránu průchodnou pro částice o velikosti 6–8 kDa. Poté byl parakaseinát sušen mrazem. Obdobný postup přípravy lze využít i pro syrovátkové bílkoviny (Léonil et al., 1991).

Trujillo et al. (2000) postupovali tak, že ovčí mléko bylo odstředováno po dobu 30 minut při 2500 g a teplotě 30 °C. Kasein byl izoelektricky vysrážen při 20 °C za přídavku 1M HCl.

3.7.2 Příprava vzorku

Podle Pomastowskiho et al. (2014) je vhodné izolovaný kasein rozpustit v 6M močovíně při koncentraci kaseinu 1 mg.ml⁻¹. Tento roztok má být dále centrifugován při 10 000 g po dobu 10 minut. Supernatant je poté filtrován přes injekční stříkačku s 0,45 µm polytetrafluorethylenovým (PVDF) filtrem.

Bordin et al. (2001) uvádí postupy na přípravu vzorku v případě čištěného proteinu, sušeného mléka a syrového mléka. Ke zváženému čistému proteinu je přidán určitý objem pufru na pH 7 sestávajícího z 6M guanidin-HCl, 20 mM dithiothreitolu a citrátu trisodného. Protein je v pufru ponechán 1 h při pokojové teplotě. Pro rozpuštění bez vytvoření pěny je roztok vortexován. Vzorek (0,3–8 µg) je ředěn v poměru 1:3 s eluentem. Jako eluent je používán vodný roztok s 10 % acetonitrilu (v/v) a 0,1 % TFA. Podobně je postupováno v případě sušeného mléka. Sušené mléko je zváženo a je k němu přidán určitý objem pufru. Množství vzorku je přizpůsobeno parametrům kolony. V případě mléka je 10 ml mléka ultracentrifugováno v polykarbonátové tubě. Centrifugace probíhá při 14800 rpm (16000 g) a teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Ze vzorku je odstraněna tuková vrstva a alikvotní podíl zbytku je přemístěn do vialky. Dále je s vialkou postupováno stejně jako v případě sušeného mléka.

Podle metodiky Léonila et al. (1991) byl vzorek mléka naředěn 10mM dithiothreiolem a 6M roztokem močoviny. Roztok byl ponechán 1 h při 37 °C a dvakrát naředěn vodným roztokem 0,1 % TFA (v/v), což je zároveň jeden z eluentů použitých v následné separaci na koloně.

V postupu Trujilla et al. (2000) byl vzorek ovčího mléka po odstředění pětkrát naředěn puftrem (pH 7,5), který obsahoval 7M močovinu. Poté byl vzorek ponechán hodinu při pokojové teplotě a vzorek mohl být přímo analyzován pomocí HPLC.

3.7.3 HPLC separace

Různí autoři uvádějí různé parametry pro separaci kaseinů, dále jsou některé postupy uvedeny.

Pomastowski et al. (2014) využil k separaci proteinů gradientovou eluci. Stanovení bylo provedeno na laboratorně vyrobených kolonách o délce 125 mm a průměru 4,6 mm se třemi druhy stacionárních fází. Základem stacionárních fází kolon byl ve všech případech oxid křemičitý s průměrem pórů 300 Å, velikostí částic 5 µm. Byly testovány kolony s vázanou oktadecylovou skupinou, aminoskupinou nebo diolovou skupinou. Specifický povrch silikagelu činil 110 m².g⁻¹. Pro účely separace kaseinu se nejlépe osvědčil oxid křemičitý s vázanou diolovou skupinou. Jako mobilní fáze byla použita voda a acetonitril, přičemž podíl acetonitrilu byl postupně měněn podle schématu uvedeného v Tabulce 6.

Tabulka 6 Gradientová eluce – Pomastowski et al.

Čas [min]	0	2	3,8	4,5	7–35
-----------	---	---	-----	-----	------

Acetonitril [%]	20	70	50	90	20
------------------------	----	----	----	----	----

(Pomastowski et al., 2014)

Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,6 ml.min⁻¹. Byly testovány tři modifikátory mobilní fáze: kyselina trifluoroctová (TFA) 0,1% obj., kyselina mravenčí 0,1% obj. a octan amonný 6mM. Všechny modifikátory změnil pH mobilní fáze, hydrofobicitu molekul a selektivitu metody. V přítomnosti kyseliny mravenčí nebyly jednotlivé formy kaseinu dobře separovány. Octan amonný způsobil zvýšení pH mobilní fáze a došlo ke změně hydrofobicity proteinů. Separace probíhala neselektivně a píky κ -kaseinu a α -kaseinu se překrývaly. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití TFA v mobilní fázi, selektivita byla zvýšena. V chromatogramu byly patrné 4 píky, přičemž 3 byly identifikovány jako kaseinové frakce α , β , κ (Pomastowski et al., 2014).

Bordin et al. (2001) provedli separaci metodou RP-HPLC na koloně se stacionární fází C4, délka kolony byla 150 mm a průměr 2,1 mm, průměr pórů 300 Å a velikost částic 5 μ m. Jako mobilní fáze byly použity roztoky A a B. Roztok A byl vodný roztok s 10 % acetonitrilu (v/v) a 0,1 % TFA, roztok B byl acetonitrilový roztok s 10 % vody (v/v) a 0,1 % TFA. Použité schéma gradientové eluce je znázorněno v Tabulce 7.

Tabulka 7 Gradientová eluce – Bordin et al.

Čas [min]	7	10	11	21	39
Roztok B [%]	26,5–28,6	28,6–30,6	30,6–36,1	36,1	36,1–43,3

(Bordin et al., 2001)

Rychlost průtoku byla 0,25 ml.min⁻¹. Teplota automatického dávkovače byla 7 °C, injekce vzorku 20 μ l, teplota kolony 40 °C.

Léonil et al. (1991) použili ve své metodice kolonu o délce 150 mm a průměru 2,1 mm se stacionární fází C8. Jako mobilní fáze byly použity roztoky A a B. Roztok A byl vodný roztok s 0,1 % TFA (v/v), roztok B obsahoval 0,1 % TFA v acetonitrilu a vodě v poměru 80:20 (v/v). Použitá gradientová eluce je znázorněna v Tabulce 8.

Tabulka 8 Gradientová eluce – Léonil et al.

Čas [min]	0–5	5–15	15–20	20–22
------------------	-----	------	-------	-------

Koncentrace roztoku B [%]	37–45	45–55	55–80	80
--------------------------------------	-------	-------	-------	----

(Léonil et al., 1991)

Rychlost průtoku byla $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplota kolony $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Vyhodnocení probíhalo při vlnové délce 214 nm.

Trujillo et al. Prováděli separaci bílkovin ovčího mléka na koloně o délce 25 cm a průměru 4,6 mm s reverzní fází při teplotě $46 \text{ }^\circ\text{C}$. Velikost částic byla $7 \text{ }\mu\text{m}$ a pórovitost 300 Å. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril s 0,1 % TFA (v/v). Gradient acetonitrilu byl postupně zvyšován z 33 % na 49 % během 30 minut. Rychlosti průtoku mobilní fáze byla $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Byl vyhodnocen chromatogram zaznamenaný při vlnové délce 214 nm.

4 Materiál a metodika

4.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie (mimo deionizované vody) jsou značky Sigma-Aldrich.

- Močovina – krystalická látka, řada BioReagent, čistota p.a.
- Kyselina trifluoroctová (TFA) – řada ReagentPlus[®], čistota $\geq 99\%$
- Dithiotreitol (DTT) – řada BioUltra, $c = 1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, čistota p.a.
- Acetonitril – CHROMASOLV[®] Plus pro HPLC, čistota $\geq 99,9\%$
- Kasein celkový z bovinního mléka – Technical Grade
- α -kasein – lyofilizovaný prášek, čistota $\geq 70\%$
- β -kasein – lyofilizovaný prášek, řada BioUltra, čistota $\geq 98\%$
- κ -kasein – lyofilizovaný prášek, čistota $\geq 70\%$
- Deionizovaná voda (odpor = 18,2 M Ω)

4.2 Přístroje

- Kapalinový chromatogram e2695 s PDA detektorem 996 (Waters Corporation, USA)
- Centrifuga 5810R (Eppendorf, Německo)
- Filtrační přístroj na demineralizaci vody značky Millipore, s vodní vývěvou
- Spektrofotometr NIR na mléko Dairy Spec FT
- Analytické váhy (Kern&Sohn GmbH, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (Notus – Powersonic, Slovakia)
- Mrazicí box (Liebherr Mediline, Německo)
- Lednice (Candy, Itálie)

4.3 Pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatické pipety (100–1000 μl)
- Injekční stříkačky (2 ml)
- PVDF mikrofiltry s porozitou 0,45 μm , Chromservis, Česká Republika
- HPLC krimpovací vialka (2 ml)

4.4 Příprava roztoků

Všechny roztoky byly připraveny za použití deionizované vody.

Návody na přípravu jednotlivých roztoků:

- 6 M roztok močoviny s 10 mM dithiotreitolem – 18,018 g močoviny a 0,5 ml DTT (výsledná koncentrace DTT je 10 mM) doplnit do 50 ml odměrné baňky
- Mobilní fáze A – 50 ml acetonitrilu a 0,5 ml TFA (výsledná koncentrace TFA je 0,5 %) doplnit do 500 ml vodou a ponechat na 3 minuty v ultrazvukové lázni
- Mobilní fáze B – 50 ml vody a 0,5 ml TFA (výsledná koncentrace TFA je 0,5 %) doplnit do 500 ml acetonitrem a ponechat na 3 minuty v ultrazvukové lázni

4.5 Příprava vzorku mléka

Jelikož izolace samostatného kaseinu z mléka je zdlouhavá kvůli vysoušení, byl preferován postup, který by umožnil oddělit kaseinové a syrovátkové bílkoviny a případně stanovit tyto všechny bílkoviny v jedné analýze.

Na přípravu vzorku může být použito pouze syrové a nehomogenizované mléko, které je odstředěno. Lipidy musí být před chromatografickou analýzou vzorku odstraněny, protože interferují při stanovení bílkovin a zanášejí chromatografickou kolonu. Efektivní odstředování probíhá při vysokých otáčkách a nízké teplotě (Roginski et al., 2003).

Příprava vzorku spočívá v odstředění mléka na centrifuze a následném vymražení tuku v mrazicím boxu a jeho mechanickém odstranění. Supernatant (mléčné sérum) je naředěn rozpouštědlem, přefiltrován přes membránový filtr a přímo dávkován do vialek pro analýzu. K přípravě vzorku byl původně používán pouze roztok 6M močoviny bez přídavku DTT. Po stále nedostačující separaci bylo testováno využití roztoku 6M močoviny s DTT ve výsledné koncentraci 10 mM a nebo 20 mM v roztoku močoviny. Přídavek DTT pozitivně ovlivňuje vlastní separaci na chromatografické koloně, chromatografické píky jsou lépe vykreslené. Z píků je zřejmé, že jednotlivé bílkoviny nejsou monodisperzní, ale polydisperzní látky, což může být využito ve studiu polymorfismu bílkovin. Přídavek DTT zároveň mění retenční časy jednotlivých analytů. Za optimální podíl DTT byla zvolena koncentrace 10 mM DTT v 6M močovíně.

Za optimální byl zvolen následující postup přípravy vzorku mléka:

- Přibližně 10 ml syrového nehomogenizovaného mléka je odstředěno na centrifuze Eppendorf 5810R rychlostí 12000 rpm při teplotě 4 °C po dobu 10 minut

- Odstředěné mléko 5 minut je ponecháno v mrazicím boxu (-20 °C)
- Následně je slit supernatant – mléčné sérum
- Mléčné sérum je 5x naředěno roztokem 6M močoviny s podílem 10 mM DTT
- Roztok je ponechám 1 hodinu při pokojové teplotě, dochází k derivatizaci
- Roztok je filtrován přes PVDF filtr s průměrem 0,45 μm do vialky o objemu 2 ml
- Roztok ve vialce je použit se přímo k analýze na HPLC systému

4.6 Příprava standardních roztoků

Navážky standardů byly připraveny s pomocí analytických vah metodou diferenčního vážení. Postupně byla navážka každého standardu kvantitativně převedena do odměrné baňky a doplněna roztokem 6M močoviny s 10 mM DTT. Roztoky byly ponechány jednu hodinu při pokojové teplotě a filtrovány před PVDF mikrofiltr. Následně byly roztoky standardů použity k šestibodové kalibraci. Při kvantifikaci bylo přihlédnuto k čistotám standardů, které uvádí výrobce.

4.7 Výběr chromatografické kolony

Citovaní autoři používají ke stanovení jednotlivých bílkovinných frakcí C4 nebo C8 chromatografické kolony a gradientovou eluci se dvěma složkami A a B na bázi různé objemově zastoupené vody a acetonitrilu s přidavkem malého množství trifluoroctové kyseliny (TFA) při teplotě 37–40 °C. Pokud je k detekci použit detektor diodového pole, je detekce prováděna při vlnové délce v intervalu 214–280 nm.

Zavedení a optimalizace chromatografické separace vycházelo z gradientové eluce, kterou ve své práci použil Bordin et al. (2001). Bylo zjištěno, že při použití chromatografických kolon BIOshell i TSKgel není tento gradient vyhovující. Největším problémem na obou kolonách bylo nedostatečné oddělení β-kaseinu od syrovátkových bílkovin, zejména α-laktalbuminu. Zároveň ani β-laktoglobulin A a β-laktoglobulin B nebyly na chromatogramu oddělené, jejich retenční časy byly identické. Následně byl gradient, rychlost průtoku mobilní fáze i teplota stanovení postupně ve více krocích různými způsoby modifikovány, přesto se nepodařilo získat vyhovující chromatogramy.

Lze však konstatovat, že obě kolony se jeví jako velmi vhodné pro účely stanovení jednotlivých kaseinů, pokud je kasein předem oddělen od syrovátkových bílkovin. Nelze je však použít pro stanovení všech bílkovinných frakcí v jedné analýze, což bylo při vývoji metody preferováno. Z toho důvodu byla zakoupena kolona Vydac C4, kterou ve své práci

použil Bordin et al. (2001). Chromatogram uvedený v publikaci Bordina et al. (2001), získaný s použitím tohoto typu kolony, je vyhovující pro stanovení nejen kaseinových frakcí, ale i pro paralelní stanovení hlavních syrovátkových bílkovin (α -La, β -Lg B a β -LgA) v jedné analýze.

Avšak ani v případě, kdy byl použit stejný typ kolony Vydac C4, jakou ve své práci použil Bordin et al. (2001) a gradientová eluce byla identická s postupem popsáním tímto autorem, nebyl získaný chromatogram zcela vyhovující. κ -kasein nebyl na koloně zachycen a byl eluován společně s chromatografickým píkem v mrtvém čase (nástřikovým píkem). Naopak v závěru analýzy se v chromatogramu projevila lepší vzájemná separace syrovátkových bílkovin i jejich dostatečný odstup od β -kaseinu, který má ze všech kaseinových frakcí s použitím všech tří kolon nejvyšší retenční čas. Postupnou opakovanou úpravu gradientu bylo dosaženo vyhovující (ne však naprosto ideální) separace všech jednotlivých bílkovinných frakcí v jedné analýze, a to jak v mléce kravském tak kozím, ve kterém se nacházelo větší množství α -laktalbuminu než v mléce kravském, tedy bílkovinné složky, která činila při separaci na předchozích dvou kolonách největší problémy v důsledku koeluce s β -kaseinem. Ideální separace s naprostým oddělením všech bílkovinných frakcí v jedné analýze (píky všech látek se vracejí až na základní linii) však dosud žádným autorem nebyla publikována.

Výhoda použití kolony Vydac C4 spočívá také v nižším vnitřním průměru této kolony a tedy i výrazněji nižší spotřebě mobilní fáze (15 ml.hod⁻¹ oproti 72 ml.hod⁻¹ na předchozích kolonách). Naopak v důsledku větší velikosti zrn stacionární fáze jsou chromatografické píky méně prokreslené a polydisperzita bílkovinných frakcí je méně zřetelná.

Jednotlivé bílkovinné frakce byly identifikovány na základě retenčních časů jednotlivých standardů, znalosti průměrného poměrného zastoupení α_{S1} -kaseinu a α_{S2} -kaseinu v kravském mléce (k dispozici nejsou samostatně standardy α_{S1} -kaseinu a α_{S2} -kaseinu) a retenčních časů chromatografických píků v chromatogramu. Identifikace jednotlivých bílkovinných frakcí byla ověřena metodou standardních přídavek.

4.8 Chromatografické podmínky

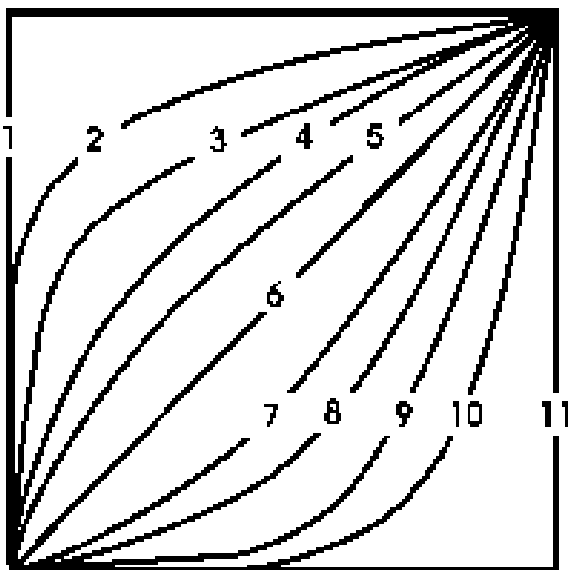
- Analytická kolona: Vydac 214TP C4 5 μ m (průměr 2,1 mm, délka 150 mm), (Grace Discovery Sciences, USA)
- Složení mobilní fáze A – H₂O: acetonitril (10:90), (v/v) s podílem 0,1 % TFA
- Složení mobilní fáze B – H₂O: acetonitril (90:10), (v/v) s podílem 0,1 % TFA
- Průtok mobilní fáze: 0,25 ml.min⁻¹

- Typ eluce: gradientová
- Teplota chromatografické kolony: 40 °C
- Objem analyzovaného vzorku: 20 µl
- Doba analýzy: 68 minut
- Podmínky detekce: detektor diodového pole (PDA), vlnová délka $\lambda = 218$ nm
- Schéma gradientové eluce je uvedeno v Tabulce 9

Tabulka 9 Podmínky gradientové eluce

Čas [min]	Průtok [ml.min ⁻¹]	Podíl A [%]	Podíl B [%]	Profil křivky*
0	0,25	78,5	21,5	6
3	0,25	73,5	26,5	6
6	0,25	71,4	28,5	6
16	0,25	69,4	30,6	6
27	0,25	63,9	36,1	6
37	0,25	63,9	36,1	2
55	0,25	56,7	43,3	6
63	0,25	56,7	43,3	6
66	0,25	78,5	21,5	6
68	0,25	78,5	21,5	6

*Profil křivky pro změnu gradientu je patrný z Obrázku 2.



Obrázek 2 Profily křivek gradientové eluce softwaru Waters Empower System (Software používaný při práci s kapalinovým chromatogramem Waters e2695)

4.9 Vzorky mléka

Byly provedeny analýzy na dvou skupinách vzorků kozího mléka. První skupina obsahovala bazénové vzorky mléka stáda kozy sánské. Jedná se o jediný chov kozy sánské v ČR. Vzorky byly odebírány pravidelně jedenkrát měsíčně v průběhu 6 měsíců. Současně bylo sledováno látkové složení mléka v průběhu laktace, včetně stanovení celkového množství všech kaseinových frakcí.

Druhá skupina vzorků obsahovala 10 individuálních vzorků kozího mléka kozy bílé krátkosrsté a jeden individuální vzorek kozy téhož plemene z domácího chovu.

Pro porovnání byl analyzován jeden individuální vzorek ovčího mléka z farmy Pěččín a jeden vzorek kravského mléka z mlékomatu farmy Hole umístěného v Praze – Suchdole.

Mléko kozy sánské

- Plemeno: koza sánská dovezená z francouzské oblasti Vende
- Oblast a režim chovu: Moravskoslezský kraj, farmový chov
- Vzorky: 6x bazénový vzorek (265 koz)
- Skladování vzorků: zamražení 3–8 měsíců (podle data odběru)

Mléko kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu

- Plemeno: koza bílá krátkosrstá
- Oblast a režim chovu: Liberecký kraj, farmový chov
- Vzorky: 10x individuální vzorek
- Skladování vzorků: zamražení déle než 1 rok

Mléko kozy bílé krátkosrsté z domácího chovu

- Plemeno: koza bílá krátkosrstá
- Oblast a režim chovu: Liberecký kraj, domácí chov
- Vzorky: 1x individuální vzorek
- Skladování vzorků: zamražení méně než 1 měsíc

Mléko valašské ovce z farmového chovu

- Plemeno: valašská ovce
- Oblast a režim chovu: Liberecký kraj, farmový chov
- Vzorke: 1x individuální vzorek
- Skladování vzorků: zamražení méně než 1 měsíc

Mléko holštýnsko-fríského skotu

- Plemeno: holštýnsko-fríský skot
- Oblast a režim chovu: Středočeský kraj, farmový chov
- Vzorke: 1x individuální vzorek
- Skladování vzorků: chlazení několik hodin

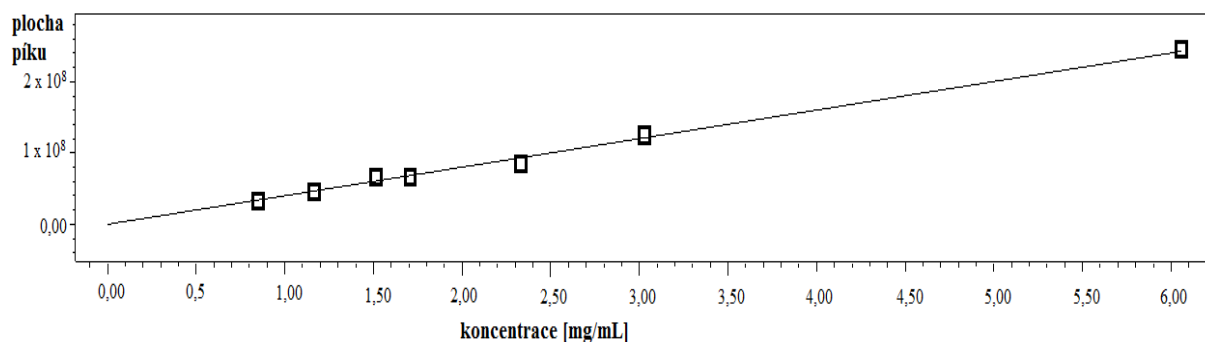
5 Výsledky

5.1 Kalibrace

Pro každou ze čtyř stanovovaných kaseinových frakcí byla stanovena vytvořena kalibrační závislost pomocí standardů bovinních kaseinů zakoupených u firmy Sigma-Aldrich. Pro α -kaseiny se jednalo o sedmibodovou kalibraci, pro κ -kasein šestibodovou a pro β -kasein pětibodovou. Ve všech případech byla získána kalibrace lineární.

Protože standardy α_{S1} a α_{S2} kaseinů nejsou samostatně dostupné, bylo nutné vyhodnotit jejich nejpravděpodobnější poměrné zastoupení ve standardu celkovém. Při analýze pouze α -kaseinu bylo zřejmé, že standard je separován do dvou píků. Píky byly identifikovány na základě poměrů α_{S1} a α_{S2} kaseinů v kravském mléce uváděných v literatuře. Jejich vzájemný reálný poměr ve standardu byl vyhodnocen po analýze standardního roztoku. Poměr ploch obou α -kaseinů vykazoval stabilní hodnotu. Na základě velikosti ploch chromatografických píků bylo určeno, že standard obsahuje 86,9 % α_{S1} -kaseinu a 13,1 % α_{S2} -kaseinu. Tento poměr byl aplikován při kvantitativním vyhodnocení kalibrační závislosti pro α_{S1} -kasein a α_{S2} -kasein a následně využit při kvantifikaci obou α -kaseinů v reálných vzorcích mléka.

Kalibrační křivky jednotlivých kaseinů jsou znázorněny v Obrázku 3, 4, 5 a 6.

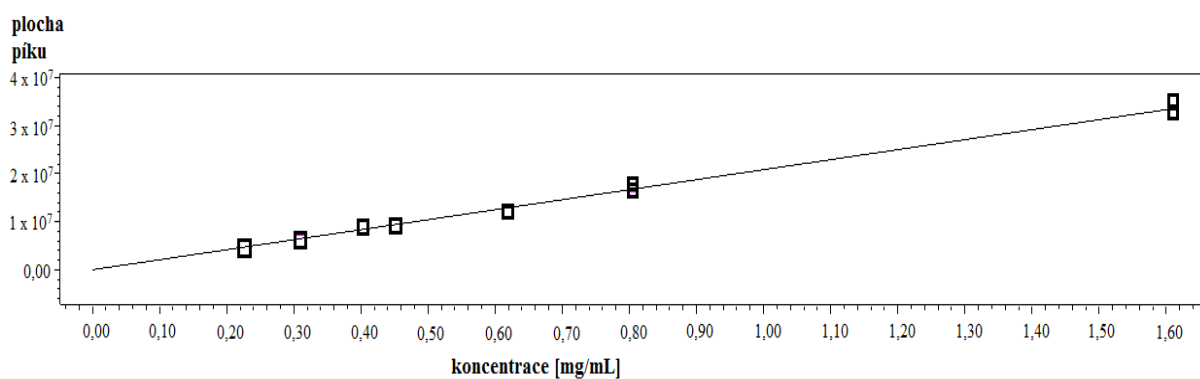


Obrázek 3 Kalibrační křivka α_{S1} -kaseinu

$$y = 4,01 \cdot 10^7 x$$

$$R = 0,997$$

$$R^2 = 0,995$$

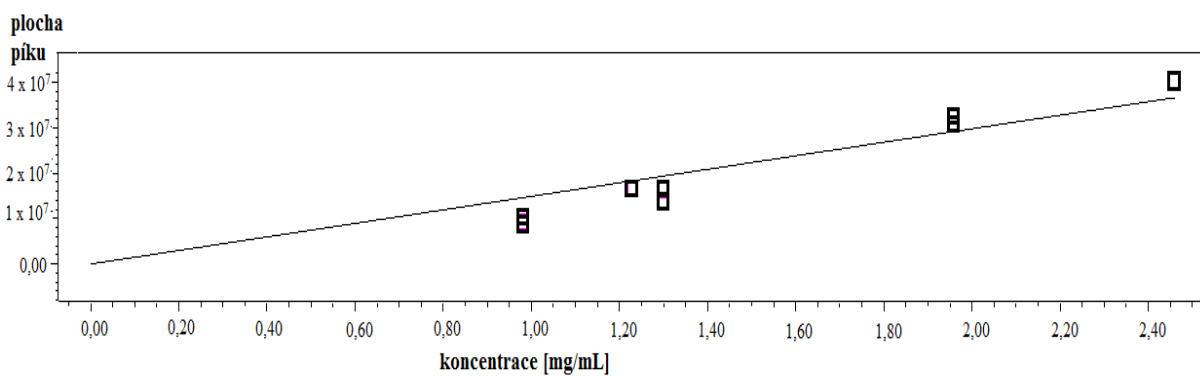


Obrázek 4 Kalibrační křivka α_2 -kaseinu

$$y = 2,08 \cdot 10^7 x$$

$$R = 0,996$$

$$R^2 = 0,993$$

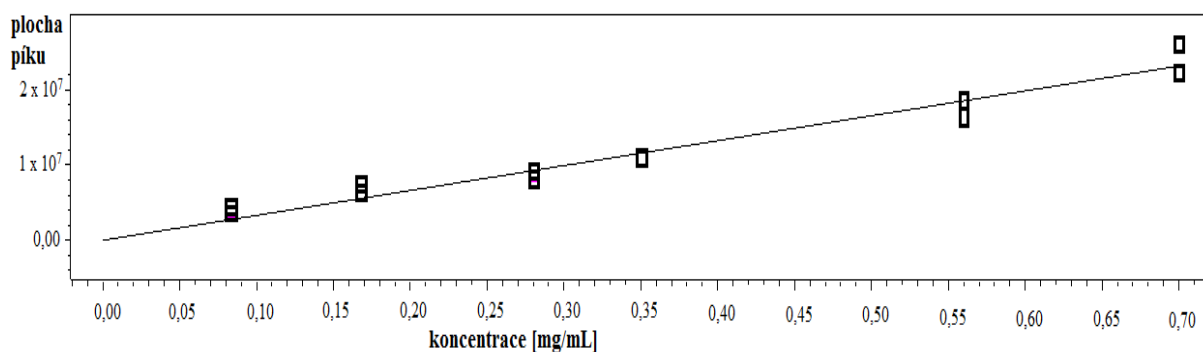


Obrázek 5 Kalibrační křivka β -kaseinu

$$y = 1,49 \cdot 10^7 x$$

$$R = 0,944$$

$$R^2 = 0,891$$



Obrázek 6 Kalibrační křivka κ -kaseinu

$$y = 3,31 \cdot 10^7 x$$

$$R = 0,981$$

$$R^2 = 0,964$$

5.2 Meze detekce a kvantifikace

Meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé kaseiny byly odvozeny od stanoveného šumu základní linie. Mez detekce (LOD) je definována jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti (LOQ) jako desetinásobek. Meze detekce a kvantifikace jednotlivých kaseinových frakcí jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10 Meze detekce a kvantifikace

Kaseinová frakce	LOD [mg.ml ⁻¹]	LOQ [mg.ml ⁻¹]
α_{S1} -kasein	0,02	0,07
α_{S2} -kasein	0,09	0,31
β -kasein	0,15	0,51
κ -kasein	0,09	0,31

5.3 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody byla testována na vzorku syrového kravského mléka. Jeden vzorek byl rozdělen na 10 dílů bylo provedeno 10 paralelních stanovení.

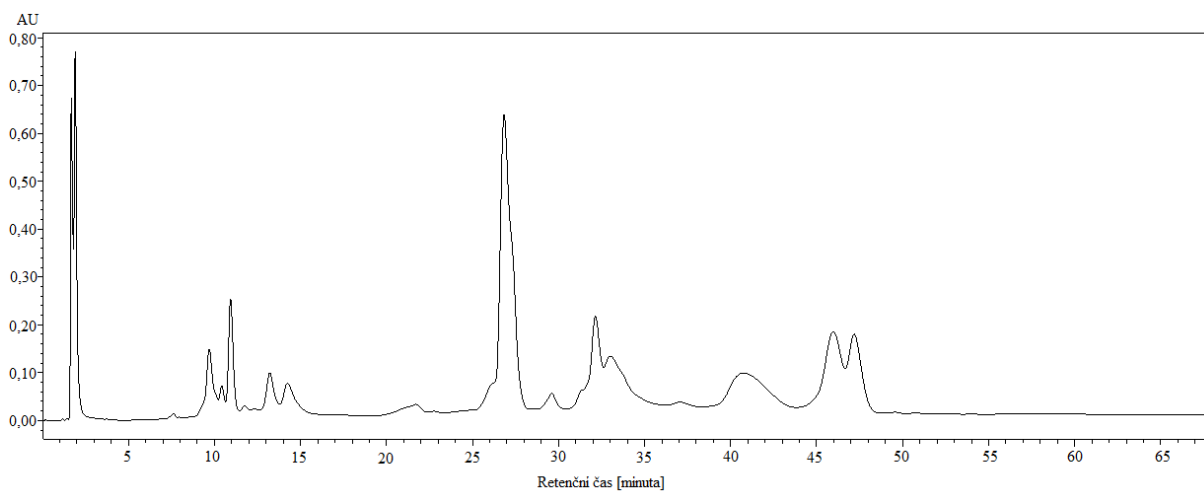
Tabulka 11 Opakovatelnost metody – kravské mléko

Pořadí	α _{S1} -CN [g.l ⁻¹]	β -CN [g.l ⁻¹]	κ -CN [g.l ⁻¹]	Celk. CN [g.l ⁻¹]	CN v mléce
analýzy	1]	1]	1]	1]	[%]
1	3,84	5,85	2,78	12,47	1,21
2	4,25	5,84	2,30	12,38	1,20
3	4,35	7,89	3,35	15,59	1,52
4	4,50	9,29	2,32	16,11	1,57
5	4,64	9,64	2,40	16,68	1,62
6	4,72	11,31	2,48	18,50	1,80
7	4,89	11,37	2,41	18,66	1,82
8	4,63	11,97	2,43	19,03	1,85
9	5,26	14,09	2,77	22,12	2,15
10	4,58	12,40	2,40	19,38	1,88
Průměr	4,56	9,96	2,56	17,09	1,66
Sm.odch.	0,36	2,64	0,30	2,93	0,28
Var.koef. [%]	7,92	26,47	11,89	17,13	17,13

5.4 Chromatogramy mlék

Pro porovnání zastoupení jednotlivých kaseinů bylo analyzováno kravské, kozí a ovčí mléko. Chromatogramy jsou znázorněny na Obrázku 7, 8, 9 a 10.

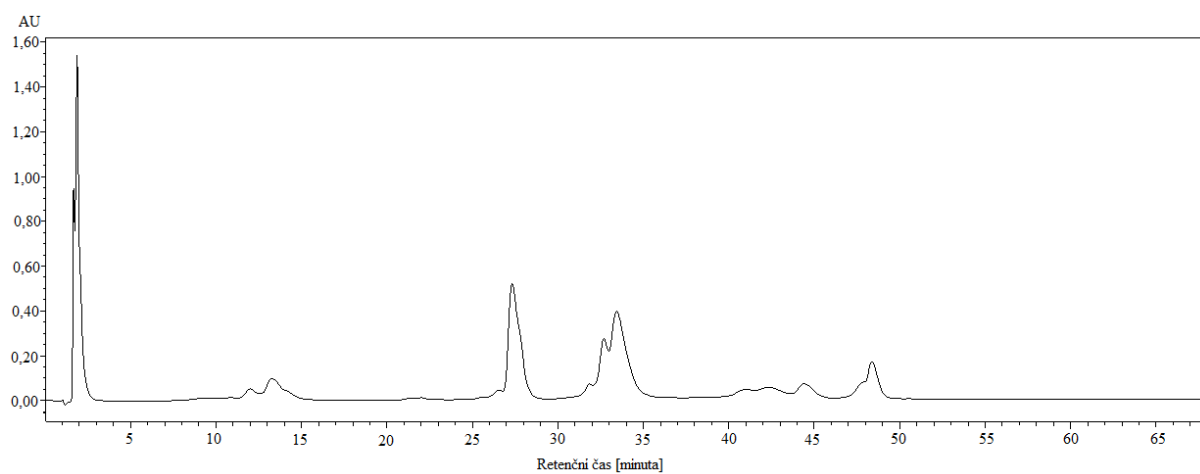
Z Obrázku 7 znázorňujícího chromatogram kravského mléka je patrné, že rozlišení píků kaseinových frakcí je dostačující. Tvarově obdobný chromatogram získal Bodin et al. (2001), tento chromatogram je uveden v příloze 3.



Obrázek 7 Chromatogram kravského mléka

Retenční časy jednotlivých kaseinů:

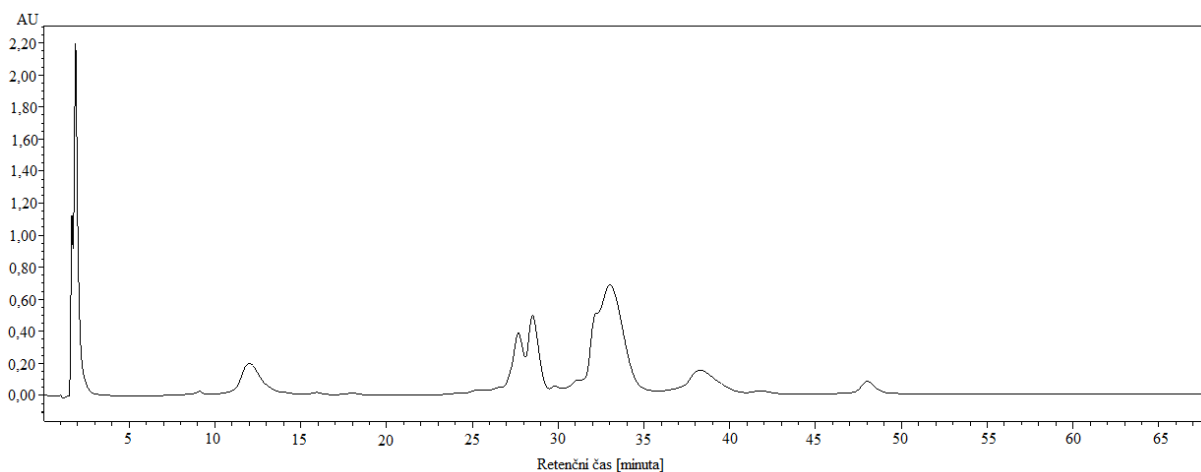
κ-CN: 10,93 min; α_{S2}-CN: 14,25 min; α_{S1}-CN: 26,84 min; β-CN: 32,14 min



Obrázek 8 Chromatogram kozího mléka

Retenční časy jednotlivých kaseinů:

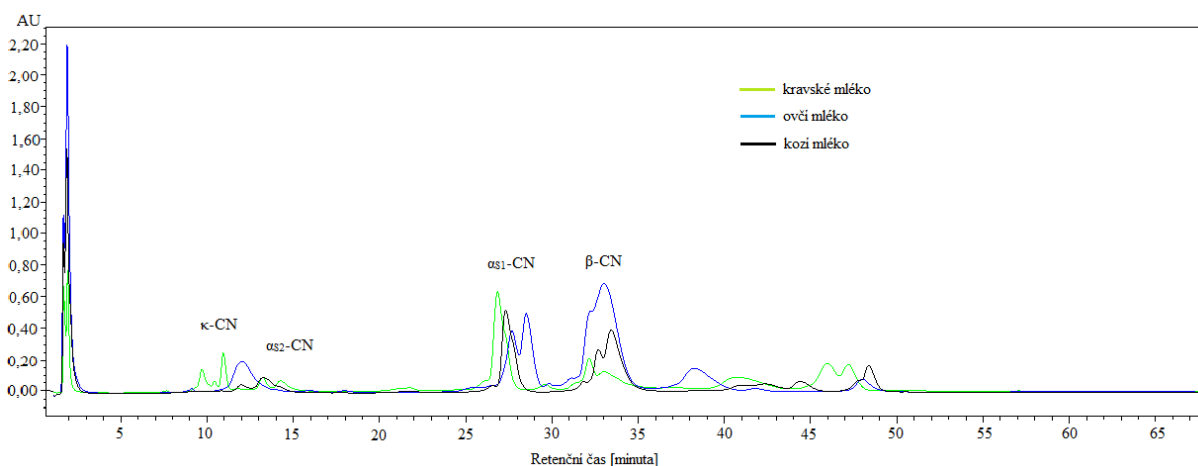
κ-CN: 13,25 min; α_{S2}-CN: 15,97 min; α_{S1}-CN: 27,31 min; β-CN: 33,43 min



Obrázek 9 Chromatogram ovčího mléka

Retenční časy jednotlivých kaseinů:

κ -CN: 12,01 min; α_{S2} -CN: 15,94 min; α_{S1} -CN: 28,50 min; β -CN: 33,01 min



Obrázek 10 Překryv chromatogramů kravského, koziho a ovčího mléka

Z Obrázku 10 je patrné, že jednotlivé druhy mlék mají rozdílné chromatogramy. Kaseinové frakce jsou mezi druhy mírně odlišné a v důsledku toho i retenční časy jsou při porovnání chromatogramů mlék různých druhů rozdílné. Tvary píků odpovídají skutečnosti, že každá kaseinová frakce vykazuje několik genetických variant, které nejsou zcela totožné. V chromatogramu jsou jednotlivé genetické varianty kaseinů patrné jako nepříliš separované analyty s blízkým retenčním časem.

Syrovátkové bílkoviny (α -laktalbumin, β -laktoglobulin A a B) vykazují retenční časy vyšší než 35 minut od počátku analýzy.

5.5 Obsah kaseinu v kravském mléce

Vzorek kravského mléka byl nejprve analyzován na obsah základních složek mléka metodou spektrofotometrie v blízké infračervené oblasti (NIR) a poté metodou HPLC byly stanoveny jednotlivé kaseinové frakce.

Tabulka 12 NIR stanovení – kravské mléko

	Tuk [%]	Bílkoviny [%]	Laktóza [%]	Tukuprostá sušina [%]
Kravské mléko	3,785	3,43	4,94	8,98

Pro vyhodnocení obsahu kaseinu při stanovení metodou HPLC bylo využito deseti chromatogramů získaných při analýze opakovatelnosti metody. Výsledky stanovení kaseinů v kravském mléce metodou HPLC jsou uvedeny v Tabulce 13. Ve všech z deseti chromatogramů byl α_{S2} -kasein přítomen v koncentraci pod mezí detekce, proto není tento uveden.

Tabulka 13 HPLC stanovení kaseinů – kravské mléko

	α_{S1}-CN [g.l⁻¹]	β-CN [g.l⁻¹]	κ-CN [g.l⁻¹]	Celk. CN [g.l⁻¹]	CN v mléce [%]
Průměr	4,56	9,96	2,56	17,09	1,66
Sm.odch.	0,36	2,64	0,30	2,93	0,28
Var.koef. [%]	7,92	26,47	11,89	17,13	17,13

Při obsahu 3,43 % bílkovin zjištěném spektrofotometricky by obsah kaseinu měl činit přibližně 80 % této hodnoty, tedy 2,74 %. Při stanovení metodou HPLC byl zjištěn obsah 1,66 % kaseinu v mléce. Výtěžnost HPLC metody v tomto případě činila 60,58 %

Dále byl v tomto vzorku stanoven poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu, poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu a poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu. Tyto údaje jsou uvedeny v Tabulce 14.

Tabulka 14 Poměry kaseinů – kravské mléko

Pořadí analýzy	poměr β -CN : α -CN	poměr β -CN : κ -CN	poměr α -CN : κ -CN
1	1,53	2,10	1,38
2	1,37	2,54	1,85
3	1,81	2,36	1,30
4	2,07	4,00	1,94
5	2,08	4,02	1,93
6	2,40	4,56	1,90
7	2,33	4,72	2,03
8	2,59	4,93	1,91
9	2,68	5,10	1,90
10	2,71	5,16	1,91
Průměr	2,16	3,95	1,80
Sm.odch.	0,45	1,12	0,24
Var.koef. [%]	20,68	28,48	13,12

5.6 Obsah kaseinů v mléce kozy sánské

Bylo analyzováno 6 bazénových vzorků mléka stáda kozy sánské. Vzorky byly odebírány 1x měsíčně v období dubna až září. Každý bazénový vzorek byl nejprve analyzován spektrofotometricky v oblasti blízkého infračerveného záření. K tomuto účelu byl použit přístroj Dairy Spec FT kalibrovaný na kozí mléko. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15 NIR stanovení – koza sánská

Měsíc	Tuk	Bílkovin	Kasein	Podíl CN	Laktóza	Sušina	TPS
	[g.100 ml⁻¹]	y [%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Duben	4,50	3,47	2,71	78,10	5,00	13,46	9,14
Květen	3,81	3,06	2,55	83,33	4,62	12,18	8,43
Červen	2,91	3,06	2,54	83,01	4,48	11,14	8,27
Červenec	3,52	3,12	2,58	82,69	4,53	11,86	8,38
Srpen	3,41	3,11	2,61	83,92	4,29	11,48	8,27
Září	3,70	3,21	2,63	81,93	4,46	11,98	8,53
Průměr	3,64	3,17	2,60	82,16	4,56	12,02	8,50
Sm.odch.	0,52	0,16	0,06	2,10	0,24	0,80	0,33

Podíl CN [%] – podíl kaseinu na celkových bílkovinách v %

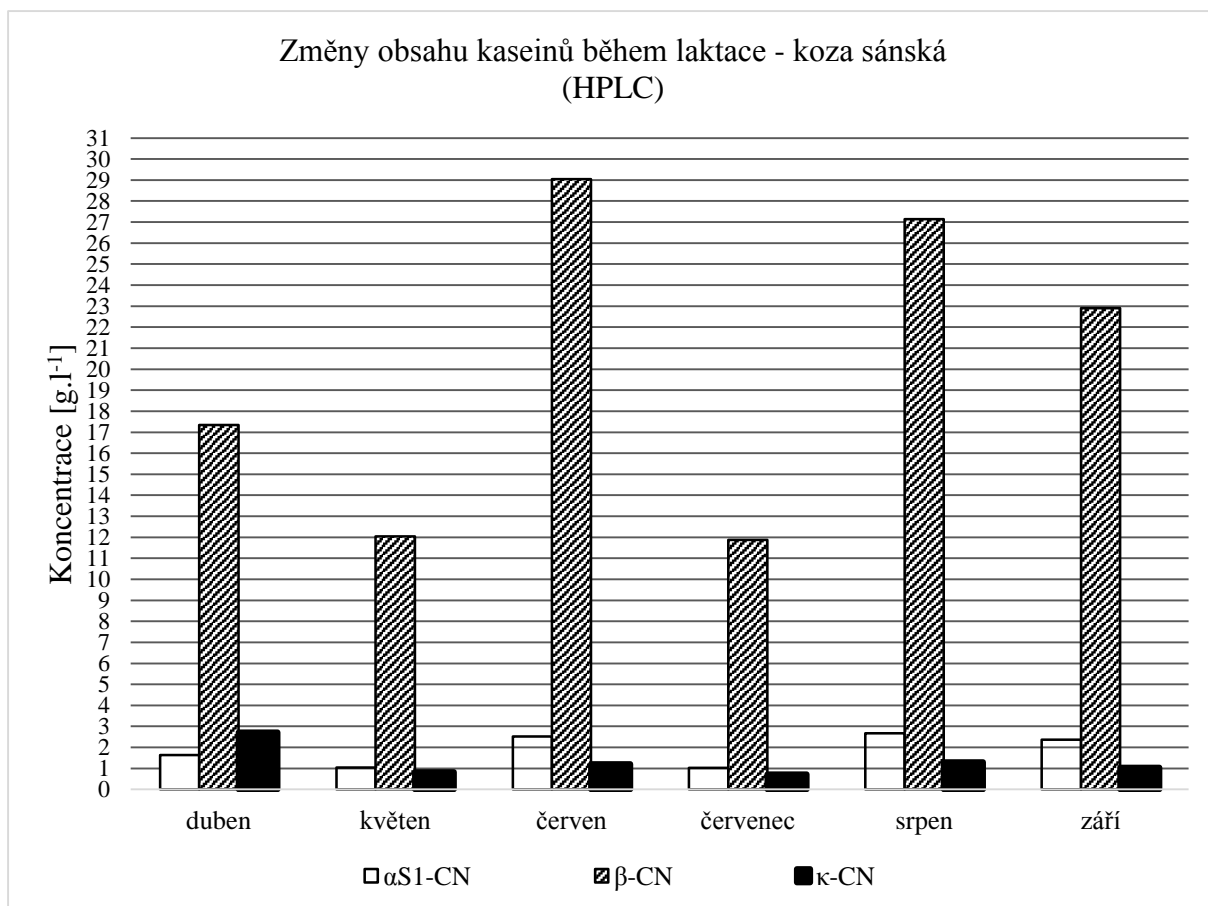
TPS – tukuprostá sušina

Každý vzorek byl analyzován ve dvou paralelních opakováních. Ze dvou analýz pro daný měsíc byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. α_{S2} -kasein se ve všech vzorcích vyskytoval v koncentraci nižší než mez detekce, a proto není v tabulce uveden. Výsledky analýz jsou uvedeny v Tabulce 16.

Tabulka 16 HPLC stanovení kaseinů – koza sánská

	α s1-CN [g.l ⁻¹]		β -CN [g.l ⁻¹]		κ -CN [g.l ⁻¹]	
	1.analýza	2.analýza	1.analýza	2.analýza	1.analýza	2.analýza
Duben	1,62	1,64	16,51	18,17	3,86	1,58
Průměr	1,63		17,34		2,72	
Sm.odch.	0,02		1,18		1,61	
Var.koef. [%]	1,19		6,79		59,38	
Květen	1,05	1,03	11,77	12,32	1,13	0,52
Průměr	1,04		12,04		0,82	
Sm.odch.	0,01		0,39		0,43	
Var.koef. [%]	0,75		3,23		52,87	
Červen	2,45	2,58	29,01	29,09	1,15	1,28
Průměr	2,52		29,05		1,22	
Sm.odch.	0,09		0,06		0,09	
Var.koef. [%]	3,55		0,19		7,57	
Červenec	1,00	1,05	12,11	11,64	0,94	0,50
Průměr	1,02		11,88		0,72	
Sm.odch.	0,04		0,33		0,31	
Var.koef. [%]	3,80		2,80		43,51	
Srpen	2,65	2,70	27,24	27,04	1,28	1,32
Průměr	2,67		27,14		1,30	
Sm.odch.	0,03		0,14		0,03	
Var.koef. [%]	1,16		0,53		2,18	
Září	2,34	2,38	22,97	22,85	1,08	1,01
Průměr	2,36		22,91		1,04	
Sm.odch.	0,03		0,08		0,05	
Var.koef. [%]	1,15		0,37		4,41	

V Obrázku 11 jsou znázorněny změny obsahu jednotlivých kaseinových frakcí v průběhu laktace.



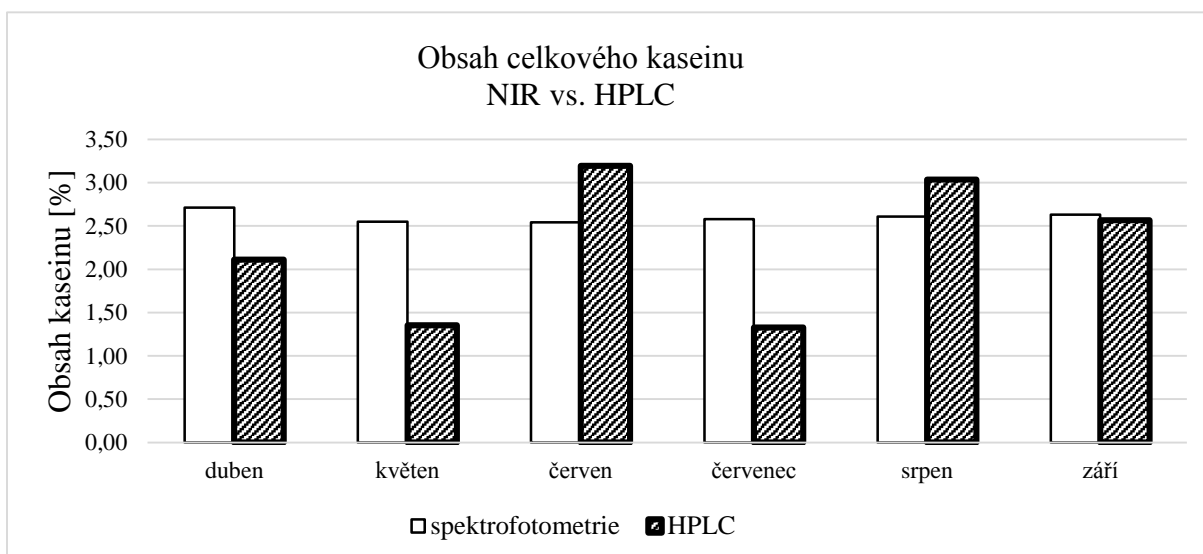
Obrázek 11 Změny obsahu kaseinů během laktace – koza sánská

Pro každý měsíc byl stanoven obsah celkového kaseinu a ten byl přepočten pomocí hustoty mléka uvedené v literatuře (Roginski et al., 2003) na procenta celkového kaseinu v mléce. Zároveň bylo procento kaseinu v mléce stanovené HPLC metodou porovnáno s procentuálním podílem získaným NIR analýzou a stanovena výtěžnost HPLC metody oproti NIR metodě. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 17.

Tabulka 17 Porovnání HPLC a NIR – koza sánská

Měsíc	Celk. CN – HPLC [g.l ⁻¹]	Celk. CN – HPLC [%]	Celk. CN – NIR [%]	Výtěžnost HPLC [%]
Duben	21,71	2,11	2,71	77,93
Květen	13,92	1,35	2,55	53,10
Červen	32,82	3,19	2,54	125,70
Červenec	13,63	1,33	2,58	51,40
Srpen	31,19	3,03	2,61	116,24
Září	26,36	2,56	2,63	97,50
Průměr	23,27	2,26	2,60	86,98
Sm.odch.	8,32	0,81	0,06	31,50
Var.koef. [%]	35,76	35,76	2,40	36,22

Z Obrázku 12 je patrný rozdíl mezi stanovením procentuálního zastoupení kaseinu v mléce kozy sánské při stanovení spektrofotometricky a HPLC.

Obrázek 12 NIR a HPLC stanovení celkového kaseinu – koza sánská

Dále byl pro každý měsíc stanoven poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu, poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu α -kaseinu vůči κ -kaseinu. Hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 18.

Tabulka 18 Poměry kaseinů – koza sánská

Měsíc	poměr β -CN : α -CN	poměr β -CN : κ -CN	poměr α -CN : κ -CN
Duben	10,46	6,39	0,61
Květen	11,39	14,64	1,29
Červen	11,36	23,91	2,10
Červenec	11,40	16,61	1,46
Srpen	9,86	20,88	2,12
Září	9,51	21,98	2,31
Průměr	10,66	17,40	1,65
Sm.odch.	0,84	6,40	0,65
Var.koef. [%]	7,92	36,80	39,45

5.7 Obsah kaseinů v mléce kozy bílé krátkosrsté

Byla analyzována skupina 10 individuálních vzorků mléka kozy bílé krátkosrsté ze stáda farmového chovu. Všech deset vzorků bylo nejprve analyzováno metodou NIR. Výsledky NIR stanovení jsou uvedeny v Tabulce 19.

Tabulka 19 NIR stanovení – koza bílá krátkosrstá, farmový chov

Označení vzorku	Tuk [g.100 ml ⁻¹]	Bílkoviny %	Kasein [%]*	Celková sušina%
K20	3,56	3,20	2,56	11,68
K22	3,33	2,65	2,12	10,54
K23	2,25	2,53	2,02	9,20
K24	2,72	2,90	2,32	10,42
K25	3,18	2,79	2,23	10,55
K26	3,41	3,02	2,42	11,46
K27	2,53	2,95	2,36	10,15
K28	2,50	3,09	2,47	10,27
K29	2,84	2,86	2,29	10,34
K30	3,23	3,00	2,40	11,15
Průměr	2,96	2,90	2,32	10,58
Sm.odch.	0,45	0,20	0,16	0,71
Var.koef. [%]	15,10	6,96	6,96	6,75

* Procentuální podíl kaseinu v mléce, vypočítaný jako 80 % z celkové bílkoviny

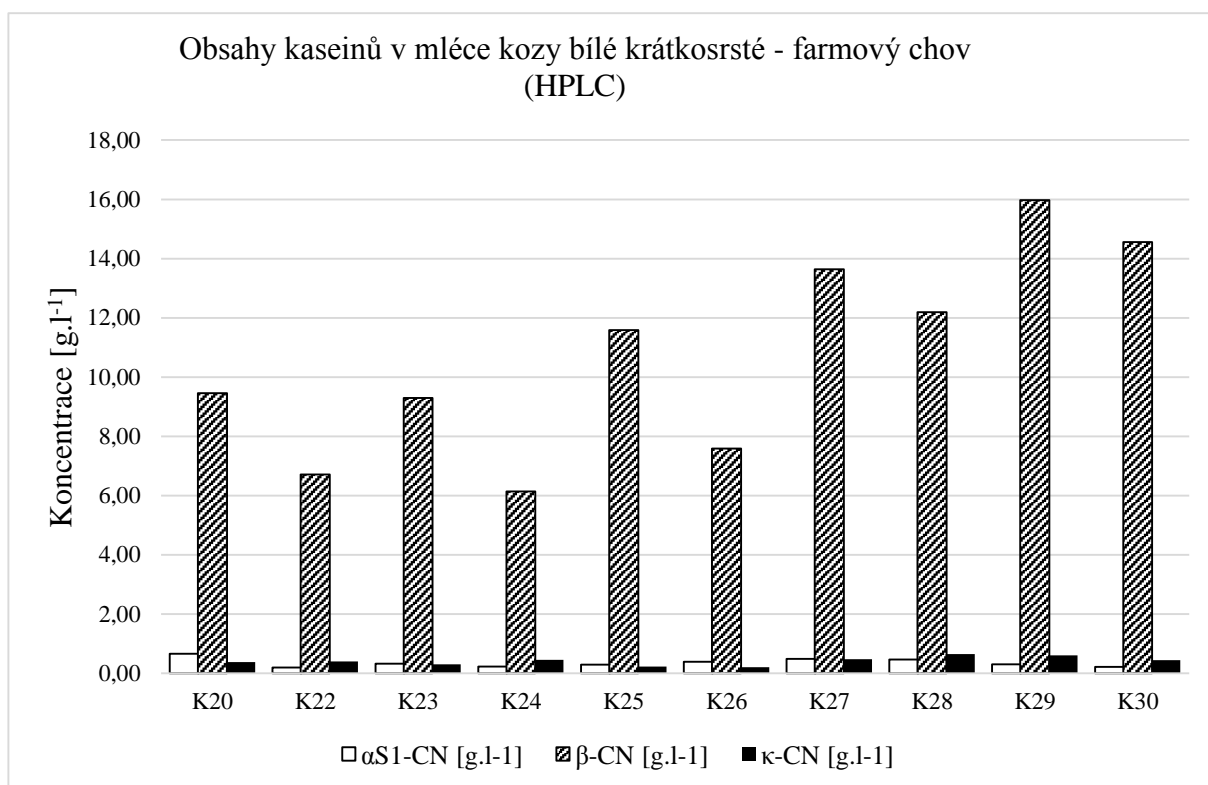
Každý individuální vzorek mléka kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu byl analyzován ve dvou paralelních stanoveních. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 20.

Tabulka 20 HPLC stanovení kaseinů – koza bílá krátkosrstá z farmového chovu

Označení vzorku	α_{S1} -CN [g.l ⁻¹]		β -CN [g.l ⁻¹]		κ -CN [g.l ⁻¹]	
	1.analýza	2.analýza	1.analýza	2.analýza	1.analýza	2.analýza
K20	0,70	0,61	9,74	9,17	0,45	0,31
Průměr	0,66		9,46		0,38	
Sm.odch.	0,07		0,40		0,10	
Var.koef. [%]	10,06		4,26		26,05	
K22	0,20	0,19	6,66	6,77	0,40	0,40
Průměr	0,20		6,71		0,40	
Sm.odch.	0,00		0,08		0,00	
Var.koef. [%]	1,99		1,21		0,89	
K23	0,32	0,31	9,49	9,09	0,34	0,26
Průměr	0,32		9,29		0,30	
Sm.odch.	0,01		0,28		0,05	
Var.koef. [%]	3,69		3,04		18,34	
K24	0,25	0,19	6,33	5,94	0,57	0,34
Průměr	0,22		6,13		0,45	
Sm.odch.	0,04		0,27		0,16	
Var.koef. [%]	19,21		4,44		36,14	
K25	0,28	0,30	10,88	12,29	0,16	0,30
Průměr	0,29		11,58		0,23	
Sm.odch.	0,01		1,00		0,10	
Var.koef. [%]	4,04		8,61		44,05	
K26	0,38	0,39	7,36	7,82	0,21	0,21
Průměr	0,38		7,59		0,21	
Sm.odch.	0,00		0,33		0,00	
Var.koef. [%]	1,02		4,29		0,00	

Označení vzorku	α_{S1} -CN [g.l ⁻¹]		β -CN [g.l ⁻¹]		κ -CN [g.l ⁻¹]	
	1.analýza	2.analýza	1.analýza	2.analýza	1.analýza	2.analýza
K27	0,57	0,40	16,05	11,23	0,56	0,39
Průměr	0,49		13,64		0,47	
Sm.odch.	0,12		3,41		0,12	
Var.koef. [%]	24,77		25,02		26,19	
K28	0,32	0,61	8,74	15,65	0,44	0,86
Průměr	0,46		12,19		0,65	
Sm.odch.	0,20		4,89		0,30	
Var.koef. [%]	43,77		40,10		46,04	
K29	0,28	0,32	16,01	15,94	0,60	0,61
Průměr	0,30		15,98		0,60	
Sm.odch.	0,03		0,05		0,01	
Var.koef. [%]	10,48		0,31		1,76	
K30	0,21	0,20	14,72	14,40	0,48	0,39
Průměr	0,21		14,56		0,44	
Sm.odch.	0,01		0,22		0,06	
Var.koef. [%]	3,72		1,53		14,63	
Průměr vzorků	0,32		10,85		0,42	
Sm.odch.	0,15		3,40		0,14	
Var.koef. [%]	46,25		31,37		34,71	

Na Obrázku 13 je znázorněno zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí v individuálních vzorcích mléka kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu.



Obrázek 13 Obsahy kaseinů v mléce – koza bílá krátkosrstá

Pro každý individuální vzorek byl vypočten celkový obsah kaseinů a tento obsah byl přepočten pomocí hustoty mléka uvedené v literatuře (Roginski et al., 2003) na procento kaseinu v mléce. Dále byl stanoven poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu, poměr α -kaseinu a α -kaseinu vůči κ -kaseinu. Údaje jsou uvedeny v Tabulce 21.

Tabulka 21 Celkový kasein a poměry kaseinů – koza bílá krátkosrstá

Vzorek	Celk. CN [g.l ⁻¹]	Celk. CN [%]	Poměr β : α -CN	Poměr β : κ -CN	Poměr α : κ -CN
K20	10,56	1,03	14,39	24,88	1,73
K22	7,31	0,71	34,38	16,89	0,49
K23	9,93	0,97	29,38	31,10	1,06
K24	6,83	0,66	27,53	13,63	0,50
K25	12,10	1,18	40,10	50,62	1,26
K26	8,21	0,80	19,86	37,02	1,86
K27	14,60	1,42	28,02	28,86	1,03
K28	13,34	1,30	26,39	18,90	0,72

Vzorek	Celk. CN [g.l⁻¹]	Celk. CN [%]	Poměr β : α-CN	Poměr β : κ-CN	Poměr α : κ-CN
K29	16,95	1,65	53,79	26,51	0,49
K30	15,41	1,50	69,65	33,47	0,48
Průměr	11,63	1,13	36,57	28,56	0,88
Sm.odch.	3,53	0,34	16,47	10,84	0,27
Var.koef.[%]	30,32	30,32	45,03	37,97	0,52

Procentuální zastoupení kaseinu v mléce stanovené HPLC metodou bylo porovnáno s procentuálním podílem získaným NIR analýzou a byla stanovena výtěžnost HPLC metody oproti NIR metodě. Porovnání je uvedeno v Tabulce 23.

Tabulka 23 Porovnání HPLC a NIR – koza bílá krátkosrstá, farmový chov

Vzorek	Celk. CN HPLC [g.l⁻¹]	Celk. CN - HPLC [%]	CN v mléce - NIR [%]	Výtěžnost HPLC [%]
K20	10,56	1,03	2,56	40,12
K22	7,31	0,71	2,12	33,52
K23	9,93	0,97	2,02	47,75
K24	6,83	0,66	2,32	28,65
K25	12,10	1,18	2,23	52,72
K26	8,21	0,80	2,42	33,04
K27	14,60	1,42	2,36	60,17
K28	13,34	1,30	2,47	52,49
K29	16,95	1,65	2,29	72,08
K30	15,41	1,50	2,40	62,45
Průměr	11,63	1,13	2,32	48,30
Sm.odch.	3,53	0,34	0,16	14,33
Var.koef. [%]	30,32	30,32	6,96	29,67

Dále byl analyzován jeden individuální vzorek kozy bílé krátkosrsté z domácího chovu. Vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních. Výsledky jsou vedeny v Tabulce 23. α₂-kasein byl ve všech případech přítomen v koncentraci pod mezí detekce a z toho důvodu není v tabulce uveden.

Tabulka 23 HPLC stanovení kaseinů – koza bílá krátkosrstá, domácího chov

Pořadí analýzy	α_{S1} -CN [g.l ⁻¹]	β -CN [g.l ⁻¹]	κ -CN [g.l ⁻¹]	Celk. CN [g.l ⁻¹]	Celk. CN [%]
1	4,08	12,37	2,51	18,96	1,84
2	3,54	13,64	1,72	18,89	1,84
3	2,50	11,93	1,12	15,54	1,51
Průměr	3,37	12,65	1,78	17,80	1,73
Sm.odch.	0,80	0,89	0,70	1,95	0,19
Var.koef. [%]	23,82	7,00	39,31	10,97	10,97

Pro každé za tři stanovení byl stanoven poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu, poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu a poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu. Údaje jsou uvedeny v Tabulce 24.

Tabulka 24 Poměry kaseinů – koza bílá krátkosrstá, domácí chov

Pořadí analýzy	poměr β -CN : α -CN	poměr β -CN : κ -CN	poměr α -CN : κ -CN
1	3,04	4,93	1,62
2	3,85	7,95	2,07
3	4,78	10,70	2,24
Průměr	3,89	7,86	1,98
Sm.odch.	0,87	2,89	0,32
Var.koef. [%]	22,43	36,73	16,06

5.8 Obsah kaseinů ovčím mléce

Jeden individuální vzorek ovčího mléka byl analyzován paralelně ve třech stanoveních. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 25. α_{S2} -kasein byl v tomto ovčím mléce přítomen v koncentraci pod mezí detekce a z toho důvodu není v tabulce uveden.

Tabulka 25 HPLC stanovení kaseinů – ovčí mléko

Pořadí analýzy	α_{S1} -CN [g.l ⁻¹]	β -CN [g.l ⁻¹]	κ -CN [g.l ⁻¹]	Celk. CN [g.l ⁻¹]	Celk. CN [%]
1	6,93	19,29	1,93	28,24	2,75
2	5,15	12,07	1,46	18,75	1,82
3	4,56	11,38	1,35	17,76	1,73
Průměr	5,55	14,25	1,58	21,59	2,10
Sm.odch.	1,23	4,38	0,31	5,79	0,56
Var.koef. [%]	22,23	30,74	19,42	26,82	26,82

Dále byl v ovčím mléce stanoven poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu, poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu a poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu. Poměry jsou uvedeny v Tabulce 26.

Tabulka 26 Poměry kaseinů – ovčí mléko

Pořadí analýzy	poměr β -CN : α -CN	poměr β -CN : κ -CN	poměr α -CN : κ -CN
1	2,78	10,01	3,60
2	2,34	8,27	3,53
3	2,50	8,43	3,38
Průměr	2,54	8,90	3,50
Sm.odch.	0,22	0,96	0,11
Var.koef. [%]	8,81	10,79	3,19

5.9 Porovnání obsahů a poměrů kaseinů

Obsahy a poměry kaseinů byly statisticky testovány pomocí jednovýběrového T-testu. Principem všech nulových hypotéz bylo konstatování o stejné střední hodnotě. Nulová hypotéza poté byla podle zvoleného intervalu spolehlivosti ($\alpha = 0,05$) a hodnoty testové statistiky buď zamítnuta, nebo nezamítnuta.

Byly testovány rozdíly mezi těmito skupinami:

- A - Mléko kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu vs. ovčí mléko
- B - Mléko kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu vs. kravské mléko
- C - Mléko skupiny kozy bílé krátkosrsté kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu vs. mléko kozy bílé krátkosrsté z domácího chovu

Ve všech případech byl testován rozdíl mezi obsahem jednotlivých kaseinových frakcí v mléce a rozdíl mezi poměry kaseinů (poměry β -CN : α -CN, β -CN : κ -CN, α -CN : κ -CN).

Výpočet T-testu je uveden v Přílohách 1 a 2. Vyhodnocení T-testu je uvedeno v Tabulce 27.

Tabulka 27 Výsledky T-testu

„Liší se střední hodnoty?“

Případ	α_{S1} -CN	β -CN	κ -CN	Celkový kasein	Poměr β : α -CN	Poměr β : κ -CN	Poměr α : κ -CN
A	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
B	ano	ne	ano	ano	ano	ano	ano
C	ano	ne	ano	ano	ano	ano	ano

Střední hodnoty se statisticky významně nelišily v 9,5 % případů. Jednalo se o střední hodnoty obsahu β -kaseinu při srovnání mléka kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu s mlékem téhož plemene z domácího chovu a při srovnání s kravským mlékem.

6 Diskuze

V rámci diplomové práce byla zavedena a částečně optimalizována metodika stanovení kaseinů metodou HPLC. Během optimalizace metody bylo provedeno 280 analýz standardů kaseinů nebo vzorků mléka. Při vývoji metody bylo vycházeno z metodiky Bordina et al. (2004). Autor uvádí, že metoda byla otestována na vnitřním standardu – vzorku sušeného odtučněného mléka. Zároveň byla autorem navržena teoretická příprava reálného vzorku mléka. V rámci diplomové práce byla použita jednoduchá příprava vzorku bez separování kaseinu, která by i podle dalších citovaných autorů (Pomastowski et al., 2014; Léonil et al., 1991; Trujillo et al., 2000) měla být dostačující. Výhodami zvoleného postupu přípravy vzorku jsou nenáročnost a rychlost, při přípravě vzorku se používá pouze jeden ředící roztok (6M močovina s 10mM DTT), kompletní příprava vzorku je kratší než dvě hodiny.

Experimentálně získaný chromatogram kravského mléka (Obrázek 7) má obdobný profil jako chromatogram získaný Bordinem et al. (2001) (Příloha 3). Bylo zjištěno, že za daných podmínek jsou kaseinové frakce α , β a κ dobře separovány a rozlišení metody je dostačující. Tvary píků odpovídají skutečnosti, že jednotlivé kaseiny jsou v mléce přítomny ve více genetických variantách, které mají velmi podobný retenční čas. Na základě získaných chromatogramů kravského, ovčího a kozího mléka (Obrázek 10) lze konstatovat, že kaseinové frakce jsou mezi kravským, kozím a ovčím mlékem mírně odlišné – retenční časy jsou při porovnání chromatogramů mlék rozdílné. V některých případech se liší i tvary píků. Nejvíce patrný je rozdíl píku κ -kaseinu, který má u každého z mlék jiný profil. V případě α -kaseinu je znatelně odlišný tvar píku v ovčím mléce, profil píku nasvědčuje větší polydisperzitě α -kaseinu v ovčím mléce. Pík β -kaseinu je v kozím, kravském a ovčím mléce podobně vykreslený.

Identita píků byla potvrzena analýzami zakoupených standardů jednotlivých bovinních kaseinů značky Sigma-Aldrich. Standardy jednotlivých genetických variant kaseinů nebyly dostupné, identifikace byla provedena na úrovni frakcí, nikoliv genetických variant. Stejně standardy byly použity i ke kalibraci. Získané kalibrační křivky poukazují na dobrou opakovatelnost při stanovení samotných standardů. Hodnoty korelačních a determinačních koeficientů jednotlivých kalibračních přímek jsou dostačující. Reprodukovatelnost měření standardu β -kaseinu, jehož kalibrační křivka vykazovala nejnižší míru spolehlivosti, byla následně ověřena a vyhodnocena jako přijatelná.

Byl stanoven šum základní linie a od něj byly odvozeny meze detekce a kvantifikace pro jednotlivé kaseinové frakce. Všechny tyto meze mají takovou hodnotu, že by mělo být

možné kaseinové frakce detekovat i kvantifikovat v kravském mléce. Meze kvantifikace jsou nižší než obsahy kaseinů udávané Roginskim et al. (2003).

Analýzami reálných vzorků bovinního, kozího a ovčího mléka bylo zjištěno, že kvantifikace obsahu kaseinů v reálných vzorcích je problematická. Jednou z příčin může být nedostačující informace o čistotě standardů α -kaseinu a κ -kaseinu. Čistotu těchto standardů udává výrobce jako 70 % a vyšší. Při kalibraci bylo počítáno s nejnižší deklarovanou hodnotou čistoty, ale reálná čistota standardů mohla být vyšší. To odpovídá hodnotám zjištěným napříč všemi výsledky – ve všech případech bylo stanoveno nejvíce β -kaseinu a méně α -kaseinu a κ -kaseinu.

Koncentrace a poměry kaseinů stanovené metodou HPLC jsou odlišné od údajů uváděných v literatuře. Obsahy celkového kaseinu, stanovené metodou HPLC jako součet obsahů jednotlivých kaseinů, jsou odlišné od hodnot získaných metodou NIR. To platilo jak v případě obsahů celkového kaseinu přímo stanovených metodou NIR, tak i v případě obsahů dopočtených, pokud byl metodou NIR stanoven pouze celkový obsah bílkovin v mléce. Zároveň v některých případech stanovení metodou HPLC byla opakovatelnost nízká.

Ve shodě s těmito experimentálními zkušenostmi také Nováková et al. (2013b) udávají, že i přes separaci na koloně C4 není zajištěna vysoká výtěžnost při stanovení bílkovin metodou RP-HPLC. Mohou se objevit i nečekané píky. Ke zlepšení dochází při využití endcapovaných stacionárních fází. Také Pomastowski et al. (2014) uvádí, že kolona C4 je běžně používána pro separaci proteinů, avšak jejím nedostatkem je špatná reprodukovatelnost, rozlišení a selektivita.

Celkem bylo provedeno přes 300 analýz standardů nebo vzorků mléka (optimalizace metody a poté samotná stanovení reálných vzorků). Nečekané píky byly přítomny jen v několika málo případech. Používanou kolonu výrobce doporučuje jako zvláště vhodnou ke stanovení bílkovin. Zdá se, že změna kolony nenabízí vhodnou alternativu k vylepšení metody.

Rovněž využití 0,1 % TFA do mobilní fáze se zdá být optimální. Yüksel et Erdem (2009) potvrzují zlepšení rozlišení a tvarů píků. Při využití TFA je zlepšena rozpustnost hydrofobních proteinů v mobilní fázi. TFA napomáhá lepšímu vykreslení píků v pozdějších fázích separace, kdy narůstá v mobilní fázi podíl organické složky.

Výtěžnost metody HPLC pro celkový kasein v kravském mléce činila 60,58 %. Výtěžnost celkového kaseinu v mléce kozy sánské se pohybovala v rozmezí 53,10–125,70 % s průměrem 86,98 % a relativní směrodatnou odchylkou 36,22 %. Výtěžnost celkového kaseinu v mléce kozy bílé krátkosrsté byla 33,04–72,08 % s průměrem 48,30 % a relativní směrodatnou

odchylkou 29,67 %. Významné změny výtěžnosti mohou být způsobeny možným zadržováním analytů na koloně a jejich vymytí po několika cyklech. Tím by bylo možné objasnit výtěžnost vyšší než 100 %, která byla zjištěna ve dvou případech ve vzorku mléka kozy sánské.

Opakovatelnost metody byla ověřována 10 paralelními analýzami kravského mléka. Pro stanovení α -kaseinu byla opakovatelnost poměrně dobrá, relativní směrodatná odchylka z 10 analýz činila 7,92 % a obdobně pro κ -kasein přijatelných 11,89 %. Nejproblematičtější z pohledu opakovatelnosti bylo stanovení β -kaseinu, jehož koncentrace v průběhu 10 analýz kravského mléka postupně narůstala a relativní směrodatná odchylka činila 26,47 %. To negativně ovlivnilo i relativní směrodatnou odchylku obsahu celkového kaseinu (17,13 %). Postupný nárůst koncentrace β -kaseinu v čase vedl k domněnce, že doba jedné hodiny, po kterou byl vzorek ponechán k reakci s močovinou a DTT, není dostačující k úplnému proběhnutí derivatizace. Tato domněnka byla vyvrácena analýzou roztoku standardu β -kaseinu. Roztok standardu β -kaseinu byl analyzován postupně v deseti opakováních, což odpovídá více než 10 hodinám rozdílu času derivatizace mezi první a poslední analýzou. Koncentrace β -kaseinu byla v tomto případě stabilní, relativní směrodatná odchylka činila pouze 2 %. Pro standardní látku je hodina derivatizace dostačující. Je ale možné, že β -kasein v mléce je vzhledem ke složité povaze matrice derivatizován odlišně.

V některých případech byly mezi paralelními stanoveními téhož vzorku zjištěny hodnoty koncentrací kaseinů navzájem odlišné. To nastalo při analýzách mléka kozy bílé krátkosrsté a kozy sánské, kdy relativní směrodatná odchylka při analýze jednotlivých kaseinů ze dvou stanovení dosahovala vždy hodnot přes 30 %. V úvahu připadá možná heterogenita v rámci jednoho vzorku, která by mohla být způsobena degradací bílkovin během zamražení nebo ztrátou konzistence mléka během procesu zamražení a rozmražení. Nurliyani et al. (2015) uvádí, že kozí mléko ztrácí stabilitu po 30 dnech zamražení a nemělo by proto být skladováno déle. Oproti tomu Dutra et al. (2014) uvádějí, že zamražení má vliv pouze na mikrobiologické parametry kozího mléka a fyzikálně-chemické vlastnosti zůstávají nezměněny, zamražení nijak neovlivňuje bílkoviny ani jiné komponenty sušiny. Mléko kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu bylo před vlastní analýzou uchováváno déle než rok v mrazicím boxu, mléko kozy sánské bylo zamraženo 3 a více měsíců v závislosti na době odběru vzorku. Pro mléko kozy bílé krátkosrsté z domácího chovu činila směrodatná odchylka ze tří paralelních stanovení κ -kaseinu 39,31 %, pro α_{S1} -kasein to bylo 23,82 % a pro β -kasein 7,00 %. Toto mléko bylo povolna zamraženo ihned po zchladnutí po nadojení a analyzováno do 1 měsíce od zamražení. V ovčím mléce, taktéž zamraženém méně než 1 měsíc, činila směrodatná odchylka ze tří paralelních stanovení κ -kaseinu 19,42 %, pro α_{S1} -kasein to bylo 22,23 % a pro β -kasein

30,47 %. Na základě vlastní experimentální zkušenosti lze konstatovat, že doba zamražení nemá výraznější vliv na velikost relativní směrodatné odchylky a kratší doba zamražení není zárukou zlepšení opakovatelnosti stanovení kaseinů metodou HPLC.

Velikosti relativních směrodatných odchylek z paralelních stanovení jsou podstatně nižší v případě kravského mléka, při analýzách mléka malých přežvýkavců byly získané relativní směrodatné odchylky oproti kravskému mléku vždy vyšší. Prvotní příčinou může být to, že metoda byla vyvíjena a testována na kravském mléce. Ač jsou kaseiny bovinního mléka a mléka malých přežvýkavců rámcově podobné, nejde o zcela totožné molekuly. Jednotlivé kaseiny jsou napříč druhy odlišné v míře glykosylace, fosforylace a i v primární sekvenci aminokyselin (Roginski et al., 2003). Bylo by proto vhodné metodu dále optimalizovat na kozí a ovčí mléko se zaměřením na modifikace v přípravě vzorku mléka. Je možné, že zjednodušená příprava vzorku není dostatečně vyhovující.

Data získaná metodou HPLC byla statisticky vyhodnocena. Hodnoceny byly koncentrace jednotlivých kaseinů a poměry kaseinů a dále byly tyto údaje porovnávány mezi různými druhy mléka. α_{s2} -kasein byl ve všech analyzovaných vzorcích přítomen v koncentraci nižší, než je mez detekce.

Experimentálně stanovený průměrný obsah α_{s1} -kaseinu v kravském mléce byl 4,56 g.l⁻¹, obsah β -kaseinu 9,96 g.l⁻¹, obsah κ -kaseinu 2,56 g.l⁻¹. Tyto stanovené hodnoty odpovídají poměru přibližně 2:0:4:1. Bordin et al. (2001) uvádějí poměr kaseinů $\alpha_{s1} : \alpha_{s2} : \beta + \gamma : \kappa$ roven 4:1:4:1, bez rozlišení α -kaseinů je tento poměr 5:4:1. Ve srovnání s údaji Bordina et al. (2004) byla nalezena shoda pouze v poměru β -kaseinu vůči κ -kaseinu. Velíšek et Hajšlová (2009) uvádí zastoupení kaseinů následovně: $\alpha_s \approx 42 \%$, $\beta \approx 25 \%$, $\kappa \approx 9 \%$, $\gamma \approx 4 \%$. Hodnoty stanovené analýzou kravského mléka odpovídají podílům přibližně: $\alpha_s \approx 27 \%$, $\beta \approx 58 \%$, $\kappa \approx 15 \%$. Oproti literatuře byl v kravském mléce stanoven větší podíl β -kaseinu na úkor nižších hodnot α -kaseinu, což by mohlo souviset s podhodnoceným množstvím α -kaseinu ve standardu.

HPLC analýzou ovčího mléka byly zjištěny hodnoty: $\alpha_s \approx 5,55 \text{ g.l}^{-1}$ (26 %), $\beta \approx 14,25 \text{ g.l}^{-1}$ (67 %), $\kappa \approx 1,58 \text{ g.l}^{-1}$ (7 %). Podle Molika et al. (2012) je zastoupení kaseinových frakcí v ovčím mléce následující: $\alpha_s \approx 48,5 \%$, $\beta \approx 38,1 \%$, $\kappa \approx 13,4 \%$, $\gamma \approx 5 \%$. Hodnoty Molika et al. (2012) jsou od experimentálně získaných dat odlišné. Metodou HPLC byl stanoven významný podíl β -kaseinu, který by ale podle Molika et al. (2012) měl být až druhou nejvíce zastoupenou kaseinovou frakcí, jak je uvedeno výše.

Analýzou mléka kozy sánské byly zjištěny hodnoty obsahu kaseinů v průběhu laktace v rozmezích: $\alpha_s \approx 1,02\text{--}2,63 \text{ g.l}^{-1}$, $\beta \approx 11,88\text{--}29,05 \text{ g.l}^{-1}$, $\kappa \approx 0,72\text{--}2,72 \text{ g.l}^{-1}$. Roginski et al.

(2003) uvádí poměrně variabilní podíl kaseinů v kozím mléce. Největší podíl lze předpokládat pro β -kasein, který může v kozím mléce tvořit až 64 % kaseinů, ale není vyloučena ani jeho úplná absence v mléce. V každém stanovení mléka kozy sánské β -kasein přítomen jakožto frakce s nejvýznamnějším podílem na celkovém kaseinu. Procentuální podíl β -kaseinu v mléce kozy sánské činil až 89 % (v měsíci červnu), což značně překračuje 64 % uvedených Roginskim et al. (2003).

Analýzou mléka kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu byly pro deset individuálních vzorků zjištěny následující průměrné hodnoty koncentrace kaseinů: $\alpha_s \approx 0,32 \text{ g.l}^{-1}$ (3 %), $\beta \approx 10,85 \text{ g.l}^{-1}$ (94 %), $\kappa \approx 0,42 \text{ g.l}^{-1}$ (3 %). Podobně jako v případě kozy sánské, tak i zde podíl β -kaseinu značně překročil 64 % uváděných Roginskim et al (2003). Směrodatné odchylky obsahu jednotlivých kaseinů v analýze těchto 10 individuálních vzorků činily řádově desítky procent, což poukazuje na značné rozdíly ve složení mléka jednotlivých zvířat. Ve vzorku mléka kozy bílé krátkosrsté z domácího chovu byly zjištěny tyto hodnoty obsahu kaseinů: $\alpha_s \approx 3,37 \text{ g.l}^{-1}$ (20 %), $\beta \approx 12,65 \text{ g.l}^{-1}$ (70 %), $\kappa \approx 0,42 \text{ g.l}^{-1}$ (10 %). Pro vzorky mléka kozy bílé krátkosrsté z farmového a z domácího chovu bylo statisticky prokázáno, že obsah β -kaseinu se nelišil. Pro ostatní kaseiny bylo prokázáno, že jejich obsah v mléce kozy bílé krátkosrsté z domácího a farmového chovu byl statisticky významně odlišný.

Mimo absolutní množství kaseinových frakcí byly vyhodnoceny vzájemné poměry jednotlivých kaseinů a jejich možné využití k charakterizaci mléka daného druhu. Byl vyhodnocen poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu, poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu a poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu. Všechny tyto poměry byly mezi testovanými skupinami vzorků (kravské mléko, ovčí mléko, mléko kozy sánské, mléko kozy bílé krátkosrsté z domácího chovu a mléko kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu) prokázány jako statisticky významně rozdílné.

Roginski et al. (2003) uvádí, že oproti kravskému mléku je v kozím mléce přítomno poměrně více β -kaseinu a méně α -kaseinu. Tomu odpovídají výsledky HPLC analýzy kravského a kozího mléka. Poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu v kravském a kozím mléce byl statisticky významně odlišný. V kravském mléce poměr činil β -kaseinu vůči α -kaseinu průměrně 2,16:1, v mléce kozy bílé krátkosrsté z domácího chovu byl tento poměr 3,89:1 a v mléce téhož plemene z farmového chovu byl rozdíl oproti kravskému mléku ještě výraznější – v některých případech byl poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu v mléce kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu vyšší než 50:1. Rozdíl v koncentraci β -kaseinu v kravském mléce a mléce kozy bílé krátkosrsté z domácího i farmového chovu byl statisticky prokázán jako nevýznamný.

Naopak koncentrace α -kaseinu byla v kravském mléce a v mléce kozy bílé krátkosrsté prokázána jako odlišná. Lišila se také při porovnání mléka kozy bílé krátkosrsté z domácího chovu a mlékem téhož plemene z farmového chovu. V souladu s experimentální zkušeností také Mátlová et Sztankóová (2010) potvrzují variabilitu v koncentraci α -kaseinu v kozím mléce. Vyskytují se i případy, kdy α -kasein není v kozím mléce přítomen. Z toho vyplývá, že širší poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu v mléce kozy bílé krátkosrsté z domácího i farmového chovu byl zapříčiněn nižším obsahem α -kaseinu v těchto vzorcích mléka.

Poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu byl v případě bazénových vzorků mléka kozy sánské během laktace relativně neměnný, činil průměrně 10,66:1 a relativní směrodatná odchylka pro všechny stanovené měsíce činila 7,92 %. Naopak se v průběhu laktace výrazně měnil poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu a poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu, relativní směrodatné odchylky byly v řádech desítek procent. To poukazuje na proměnlivost obsahu κ -kaseinu v mléce kozy sánské. Nejnižší obsah κ -kaseinu byl stanoven v červenci (0,72 g.l⁻¹), nejvyšší v dubnu (2,72 g.l⁻¹).

Poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu činil v kravském mléce 3,95:1, což odpovídá hodnotě 4:1 uváděnou Bordinem et al. (2004). V ovčím mléce byl experimentálně zjištěn poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu 8,9:1. To je zřetelně vyšší hodnota oproti údaji 2,84:1, který udává Molik et al. (2012). V mléce kozy bílé krátkosrsté z domácího chovu poměr činil 7,86:1. V mléce kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu činil poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu průměrně 28,56:1. Tento poměr je vzhledem k možné variabilitě v obsahu jednotlivých kaseinů v kozím mléce reálný, avšak v rámci 10 individuálních vzorků byla v případě tohoto poměru zjištěna velmi vysoká relativní směrodatná odchylka (téměř 38 %). Značné rozdíly v poměru β -kaseinu vůči κ -kaseinu mezi individuálními zvířaty jsou zřejmé. V mléce kozy sánské byl zjištěn poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu průměrně 17,4:1 s nejnižší hodnotou 6,39:1 a nejvyšší hodnotou 23,91:1. Široké rozmezí poměru β -kaseinu vůči κ -kaseinu v mléce kozy sánské je způsobeno značným kolísáním obsah především κ -kaseinu, jak bylo naznačeno výše.

Vysoké hodnoty (nad 10:1) poměru β -kaseinu vůči κ -kaseinu při stanovení metodou HPLC vždy náležely kozímu mléku. Nejnižší hodnota poměru byla zjištěna v kravském mléce, avšak podle údajů z literatury je poměr nejnižší v ovčím mléce.

Poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu činil v kravském mléce 1,8:1, Bordin et al. (2004) uvádí poměr až 5:1, podobně Velíšek et Hajšlová (2009) uvádí 4,5:1. V ovčím mléce byl HPLC metodou stanoven poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu 3,5:1, což je v souladu s hodnotou 3,7:1, kterou uvádí Molik et al. (2012). V mléce kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu činil poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu průměrně 0,98:1 a hodnoty značně kolísaly, avšak maximální hodnota

poměru byla 2:1. Ve vzorku mléka kozy bílé krátkosrsté z domácího chovu činil poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu 1,98:1. V mléce kozy sánské byla průměrná hodnota poměru α -kaseinu vůči κ -kaseinu 1,65:1, avšak s vysokou relativní směrodatnou odchylkou (téměř 40 %). To je způsobeno značným kolísáním obsahu především κ -kaseinu, což bylo naznačeno výše.

Po porovnání poměrů α -kaseinu vůči κ -kaseinu v jednotlivých druzích mléka lze konstatovat, že nejvyšší hodnota poměru náležela ovčímu mléku a zároveň tento údaj souhlasí s údajem uvedeným v literatuře. Pro ostatní mléka byl poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu nižší, v kravském i ovčím mléce bylo zjištěno rozmezí 0,98:1 až 2:1.

I přes nedostatky v kvantifikaci a opakovatelnosti naznačují rozdíly v poměrech kaseinů, že by tyto poměry mohly být dále využity ke specifikaci a rozlišení druhů mlék. Pro kozí mléko byla typická vyšší hodnota poměru β -kaseinu vůči κ -kaseinu, bylo zjištěno nejméně 3,89:1 a případně více. Nižší hodnota poměru byla zjištěna v kravském a ovčím mléce (2,16:1) a ovčím mléce (2,54:1). V případě poměru β -kaseinu vůči κ -kaseinu hodnoty nad 10:1 vždy náležely kozímu mléku. Poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu byl nejvyšší v ovčím mléce – 3,5:1, v kravském a kozím mléce byly tyto hodnoty vždy nižší než 2:1.

Na základě provedených analýz a jejich následného vyhodnocení by bylo vhodné stanovení jednotlivých kaseinů metodou HPLC dále optimalizovat se zaměřením na možné změny v přípravě vzorku, a to nejen v souvislosti s možností izolace kaseinů ze vzorků mléka. Další modifikací může být využití pufrů v roztoku močoviny, což bylo uvedeno v metodice Bordina et al. (2004), případně zvolit jiný poměr vzorku močoviny a DTT. Dále je nutné každý vzorek mléka analyzovat alespoň ve třech paralelních stanoveních. Vzhledem k nízké opakovatelnosti by bylo v dalším postupu žádoucí využít metodu vnitřního standardu. Ke zlepšení kvantifikace metody by bylo možné využít metody standardního přídatku, ale rovněž je možné rovněž stanovit výtěžnost metody srovnáním s výsledky metody NIR.

7 Závěr

Byla zavedena a částečně optimalizována metodika stanovení jednotlivých kaseinů metodou HPLC. Jednotlivé formy kaseinu lze stanovit metodou HPLC. Bylo by ale vhodné dále zlepšit spolehlivost metody se zaměřením na přípravu vzorku. Vzhledem ke složitosti matrice by bylo vhodné kaseiny z mléka izolovat a při kvantifikaci zvážit využití vnitřního standardu nebo porovnání s výsledky stanovení NIR spektrometrií.

Ze získaných chromatogramů je patrné, že kaseinové složení je pro kravské, ovčí a kozí mléko odlišné. To bylo potvrzeno i při kvantifikaci jednotlivých kaseinových frakcí. Odlišné koncentrace jednotlivých kaseinů v mléce různých druhů zvířat byly statisticky prokázány téměř ve všech případech. Výjimkou byla pouze koncentrace β -kaseinu v mléce kozy bílé krátkosrsté z domácího i farmového chovu a kravském mléce, v těchto druzích mléka nebyl prokázán rozdíl v koncentraci β -kaseinu.

Byla zjištěna odlišnost kaseinového složení mléka mezi jedinci plemene kozy bílé krátkosrsté z farmového chovu. Zvířata byla chována za stejných podmínek a vzorky byly odebrány ve stejný čas, odlišné zastoupení kaseinů může být důsledkem individuality zvířete. Koncentrace kaseinů byly poměrně variabilní.

Dále byly hodnoceny poměry kaseinových frakcí v jednotlivých druzích mléka. Poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu, poměr β -kaseinu vůči κ -kaseinu a poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu byl ve všech druzích mléka statisticky prokázán jako odlišný. I přes nedostatky v kvantifikaci a opakovatelnosti naznačují rozdíly v poměrech kaseinů, že by tyto poměry mohly být dále využity ke specifikaci a rozlišení druhů mlék. V mléce kozy sánské byl zjištěn stabilní poměr β -kaseinu vůči α -kaseinu, který se během laktace výrazně nezměnil. Pro kozí mléko byla typická vyšší hodnota poměru β -kaseinu vůči κ -kaseinu, bylo zjištěno nejméně 3,89:1 a případně více. Nižší hodnota poměru byla zjištěna v kravském a ovčím mléce (2,16:1) a ovčím mléce (2,54:1). V případě poměru β -kaseinu vůči κ -kaseinu hodnoty nad 10:1 vždy náležely kozímu mléku. Poměr α -kaseinu vůči κ -kaseinu byl nejvyšší v ovčím mléce – 3,5:1, v kravském a kozím mléce byly tyto hodnoty vždy nižší než 2:1.

Poměr kaseinových frakcí je jedním z faktorů určujících vlastnosti mléka, projevuje se na syřitelnosti mléka a výtěžnosti při výrobě sýrů. Metodu HPLC lze i přes uvedené nedostatky využít právě k těmto účelům, je však třeba dále pokračovat v její optimalizaci.

8 Seznam použité literatury

- Bordin, G., Cordeiro Raposo, F., de La Calle, B., Rodriguez, A.R. 2001. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 928. 63-76.
- Devold, T.G., Raghild, N., Langsrud, T., Svenning, C., Brovold, M.J., Sorensen, E.S., Christensen, B., Adnoy, T., Vegarud, E. 2010. Extreme Frequencies of the "Null" Variant in Milk from Norwegian Dairy Goats - Implications for Milk Composition, Micellar Size and Renneting Properties. *Dairy Science & Technology*. 91. 39-51.
- Douša, M. UV/VIS HPLC detektory [online]. 4.dubna 2015 [cit. 2015-11-01]. Dostupné z <<http://hplc.cz/>>.
- Drbohlav, J., Vodičková, M., 2002. Tabulky látkového složení mléka a mléčných výrobků. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 84 s. ISBN: 8072170052.
- Dutra, C.M.R., Svierk, B., Ribeiro, M.E.R., Pinto, A.T., Zanela, M.B., Schmidt, V. 2014. Effects of cold storage on the quality parameters of goat milk. *Arquivos do Instituto Biológico*. 81(1). 36-42.
- Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F., Swaisgood, H.E. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk - Sixth Revision. *Journal Dairy Science*. 87. p.1641-1674.
- FitzGerald, R. J., 1997. Exploitation of Casein Variants. In: Welch, R. A. S., Burns, D. J. W., Davis, S. R., Popay A. I., Prosser, C. G. (eds.). 1997. *Milk Composition, Production and Biotechnology*. CAB International. p. 153 - 171. ISBN: 9780851991610.
- Forman, L. (ed.), Hušek, V., Plocková, M., Snášelová, J., Štípková, J., 1996. *Mlékárenská technologie II*. VŠCHT, Praha, 228 s. ISBN: 8070802502.
- Fox, F. P., McSweeney, P. L. H. (eds.), 2003. *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1: Proteins, Part A&B*. 3rd ed. Springer Science+Business Media, New York, p. 1346. ISBN: 978-0-306-47271-8
- Fox, F. P., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee, T. P. (eds.), 2004. *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1 General Aspects*, 3rd ed. Elsevier Academic Press, Italy, p. 617. ISBN: 0-12-263652-X.

Grosclaude, F., Martin, P. 1997. Casein Polymorphism in the Goat. In: Milk protein polymorphisms. 4.12. 1997. International Dairy Federation, Brussels. P.241-253. ISBN 92-9098-026-9

Hejtmánková, A., Pivec, V., Trnková, E., Dragounová, H. 2012. Differences in the Composition of Total and Whey Proteins in Goat and Ewe Milk and their Changes throughout the Lactation Period. Czech Journal of Animal Science. 57 (7). 323-332.

Hill, A.R. 1995. Chemical Species in Cheese and their Origin in Milk Components. Advances in Experimental Medicine and Biology. 367. 43-58.

HPLC.CZ

Léonil, J., Mollé, Gaucheron, D. F., Arpino, P., Guénot, P., et al.. 1995. Analysis of major bovine milk proteins by on-line high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. Le Lait. 75 (3), p. 193-210.

Mátlová, V., Sztankóová, Z. 2010. Využití polymorfismu mléčných bílkovin pro zlepšení kvalitativních a technologických vlastností mléka koz - certifikovaná metodika. Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha. 34 s. ISBN: 978-80-7403-076-5.

McSweeney, P. L. H. (ed.), Alichanides, E., Ardo, Y., Banks, J. M., Beresford, T., Donnelly, C.W., Dusterhoft, E.-M., van den Berg, G., Farkye, N. Y., Frolich-Wyder, M. T., Bachmann, H. P., Gobetti, M., Di Cagno, R., Guinee, T. P., Kelly, A. L., Kindstedt, P. S., O'Brien, N. M., O'Connor, T. P., Sheehan, J., Spinnler, H.-E., Leclercq-Perlat, M.-N., 2007. Cheese problems solved. Woodhead Publishing Limited. Cambridge. p. 424. ISBN: 9781845690601.

Meza-Nieto, M.A., González-Córdova, A.F., Piloni-Martini, J., Vallejo-Cordoba, B. 2013. Effect of β -laktoglobulin A and B Whey Protein Variants of Cheese Yield Potential of a Model Milk System. Journal of Dairy Science. 96 (11). 6777-6781.

Mitulovic, G., Mechtler, K. 2006. HPLC techniques for proteomics analysis – a short overview of latest developments. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 38 (3). 390-403.

Molik, E., Bonczar, E., Misztal, T., Żebrowska, A., Zieba, A. 2012. The Effect of the Photoperiod and Exogenous Melatonin on the Protein Content in Sheep Milk. In: Hurley, W.L. (ed.). 2012. Milk Protein. InTech. Rijeka. 325-340. ISBN: 978-953-51-0743-9.

- Mullan, W.M.A. Determination of Theoretical Yield of Cheddar Cheese Using Milk Composition Only and a Modified Version of the Van Slyke Yield Equation. [online]. 2008. [cit. 2015-23-04] Dostupné z <<http://www.dairyscience.info/newcalculators/yield-01.asp>>
- Ng-Kwai-Hang, K.F. 1993. Genetic Variant of Milk Proteins and Cheese Yield. In: International Dairy Federation.1994. Cheese Yield & Factors Affecting Its Control. IDF, Brussels, p. 160–166. ISBN: 9290980135.
- Nováková, L., Douša M., Blatný, P., Jandera, P., Planeta, J., Maier, V., Znaleziiona, J. 2013a. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Europrint a.s. Praha. 299 s. ISBN: 978-80-260-4243-3.
- Nováková, L., Douša M., Blatný, P., Jandera, P., Planeta, J., Maier, V., Znaleziiona, J. 2013b. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. Europrint a.s. Praha. 253 s. ISBN: 978-80-260-4244-0.
- Nurliyani, Suranindyah, Y., Pretiwi, P. 2015. Quality And Emulsion Stability Of Milk From Ettawah Crossed Bred Goat During Frozen Storage. First International Symposium on Food and Agro-Biodiversity Conducted by Indonesian Food Technologists Community. Procedia Food Science. 3. 142-149.
- Pijanowski, E., 1977. Základy chemie a technológie mliekarstva I. diel. Príroda Bratislava, Bratislava, 506 s.
- Pomastowski, P., Walczak, J., Gawin, M., Bocian, S., Piekoszewski, Buszewski, B. 2014. HPLC separation of casein components on a diol-bonded silica column with MALDI TOF/TOF MS identification. Analytical Methods. 6 (14). 5236-5244.
- Puhan, Z., Jakob, E., 1993. Genetic Variants of Milk Proteins and Cheese Yield. In: International Dairy Federation.1994. Cheese Yield & Factors Affecting Its Control. IDF. Brussels. p. 111–122. ISBN: 9290980135.
- Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (eds.) 2003. Encyklopedia of Dairy Sciences, Volumes: 1-4. Academic Press, London. p. 2799. ISBN: 0-12-227235-8.
- St-Gelais, D., Haché, S. 2005. Effect of β -casein Concentration in Cheese Milk on Rennet Coagulation properties, Cheese Composition and Cheese Ripening. Food Research International. 38 (5). 523-531.

- Suková, I. 2005. Hydrolytický účinek plasminu v mléce. *International Dairy Journal*. 15 (4). 305-313.
- Suková, I. 2006. *Syrovátka v potravinářství*. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 64 s. ISBN: 8072711733
- Tietze, M., Majewski, T. 1997. Chemical Composition and Sanitary Value of Cow and Sheep milk. In: *Milk protein polymorphisms*. 4.12. 1997. International Dairy Federation, Brussels. p.303-307. ISBN 92-9098-026-9
- Tong, P. S., Vink, S., Farkye, N. Y., Medrano, J. F., 1993. Effect of Genetic Variant of Milk Proteins on the Yield of Cheddar Cheese. In: International Dairy Federation.1994. *Cheese Yield & Factors Affecting Its Control*. IDF, Brussels, p. 179–187. ISBN: 9290980135.
- Trujillo, A-J., Casals, I., Guamis, B. 2000. Analysis of major bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography and flow injection analysis with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 870. 371-380.
- Van Boekel, M. A. J. S., 1993. Transfer of Milk Components to Cheese: Scientific Considerations. In: International Dairy Federation.1994. *Cheese Yield & Factors Affecting Its Control*. IDF, Brussels, p. 19–28. ISBN: 9290980135.
- Van den Berg, M. G., 1993a. Genetic Polymorphism of κ -kasein and β -lactoglobulin in Relation to Milk Composition and Cheesemaking Properties. In: International Dairy Federation.1994. *Cheese Yield & Factors Affecting Its Control*. IDF, Brussels, p. 123–133. ISBN: 9290980135.
- Van den Berg, M. G., 1993b. The Transformation of Casein in Milk into Paracasein Structure of Cheese and its Relation to Non-casein Milk Components. In: International Dairy Federation.1994. *Cheese Yield & Factors Affecting Its Control*. IDF, Brussels, p. 35–47. ISBN: 9290980135.
- Velíšek, J., Hajšlová, J. 2009. *Chemie potravin I*. OSSIS, Tábor, 602 s. ISBN: 978-80-86659-15-2.
- Yüksel, Z., Erdem, Y.K. 2009. Detection of the Milk Proteins by RP-HPLC. *Research*. Bayramic Vocational Collage, Hacettepe University. Ankara. p.7.

9 Přílohy

Příloha 1: Statistické zhodnocení rozdílů v obsazích kaseinů

Skupina vzorků koz bílých krátkosrstých z velkochovu byla porovnána s kravským a ovčím mlékem a kozím mlékem z domácího chovu. K testování byl použit jednovýběrový t-test pro přezkoumání odlišnosti středních hodnot obsahů kaseinů mezi jednotlivými druhy mlék. Testová statistika jednovýběrového t-testu se získá výpočtem:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s} \sqrt{n}$$

t – hodnota testové statistiky

\bar{x} – průměrná hodnota výběrového souboru

μ – střední hodnota, se kterou je porovnáván výběrový soubor

n – počet pozorování výběrového souboru

Hladina spolehlivosti byla ve všech případech stanovena na 5 % ($\alpha = 0,05$). Počet pozorování ve výběrovém souboru byl ve všech případech $n = 10$ a stupeň volnosti d.f. = 9. Tomu odpovídá kritická hodnota 2,262. Pokud je absolutní hodnota $|t|$ vyšší než kritická hodnota, nulová hypotéza je zamítnuta a střední hodnoty se statisticky významně liší.

Nulové hypotézy pro rozdíly mezi ovčím a kozím mlékem:

H0(1): Střední hodnota obsahu α_{S1} -kaseinu v kozím a ovčím mléce je stejná.

H0(2): Střední hodnota obsahu β -kaseinu v kozím a ovčím mléce je stejná.

H0(3): Střední hodnota obsahu κ -kaseinu v kozím a ovčím mléce je stejná.

H0(4): Střední hodnota obsahu celkového kaseinu v kozím a ovčím mléce je stejná.

Výpočet	α_{S1} -CN [g.l ⁻¹]	β -CN [g.l ⁻¹]	κ -CN [g.l ⁻¹]	Celk. CN [g.l ⁻¹]
μ – ovčí mléko	5,55	14,25	1,58	21,59
\bar{x} – kozí mléko	0,32	10,85	0,42	11,63
s – kozí mléko	0,15	3,40	0,14	3,53
t	110,26	3,16	26,20	8,92
H0 zamítnuto?	ano	ano	ano	ano

Ve všech případech byla při testování středních hodnot kozího a ovčího mléka H_0 zamítnuta. Při zvolené hladině spolehlivosti 5 % se střední hodnoty obsahu α_{S1} -kaseinu, β -kaseinu, κ -kaseinu a celkového kaseinu mezi ovčím a kozím mlékem statisticky významně liší.

Nulové hypotézy pro rozdíly mezi kozím a kravským mlékem:

$H_0(1)$: Střední hodnota obsahu α_{S1} -kaseinu v kozím a kravském mléce je stejná.

$H_0(2)$: Střední hodnota obsahu β -kaseinu v kozím a kravském mléce je stejná.

$H_0(3)$: Střední hodnota obsahu κ -kaseinu v kozím a kravském mléce je stejná.

$H_0(4)$: Střední hodnota obsahu celkového kaseinu v kozím a kravském mléce je stejná.

Výpočet	α_{S1} -CN [g.l ⁻¹]	β -CN [g.l ⁻¹]	κ -CN [g.l ⁻¹]	Celk. CN [g.l ⁻¹]
μ – kravské mléko	4,16	9,96	2,56	17,09
\bar{x} – kozí mléko	0,32	10,85	0,42	11,63
s – kozí mléko	0,15	3,40	0,14	3,53
t	80,95	0,83	48,34	4,89
H_0 zamítnuto?	ano	ne	ano	ano

V případech α_{S1} -kaseinu, κ -kaseinu a celkového kaseinu byla při testování středních hodnot kozího a ovčího mléka H_0 zamítnuta. Při zvolené hladině spolehlivosti 5 % se střední hodnoty obsahu α_{S1} -kaseinu, κ -kaseinu a celkového kaseinu mezi kravským a kozím mlékem statisticky významně liší.

V případě β -kaseinu při testování středních hodnot kozího a ovčího mléka H_0 nebyla zamítnuta. Při zvolené hladině spolehlivosti 5 % se střední hodnoty obsahu β -kaseinu mezi kravským a kozím mlékem statisticky významně neliší.

Nulové hypotézy pro rozdíly mezi kozím mlékem z farmového chovu a kozím mlékem z domácího chovu:

$H_0(1)$: Střední hodnota obsahu α_{S1} -kaseinu v kozím mléce z farmového chovu a kozím mléce z domácího chovu je stejná.

$H_0(2)$: Střední hodnota obsahu β -kaseinu v kozím mléce z farmového chovu a kozím mléce z domácího chovu je stejná.

$H_0(3)$: Střední hodnota obsahu κ -kaseinu v kozím mléce z farmového chovu a kozím mléce z domácího chovu je stejná.

H0(4): Střední hodnota obsahu celkového kaseinu v kozím mléce z farmového chovu a kozím mléce z domácího chovu je stejná.

Výpočet	α_{S1} -CN [g.l ⁻¹]	β -CN [g.l ⁻¹]	κ -CN [g.l ⁻¹]	Celk. CN [g.l ⁻¹]
μ – kozí mléko, dom.chov	3,37	12,65	1,78	17,80
\bar{x} – kozí mléko, farm.chov	0,32	10,85	0,42	11,63
s – kozí mléko, farm.chov	0,15	3,40	0,14	3,53
t	64,30	1,67	30,72	5,53
H0 zamítnuto?	ano	ne	ano	ano

V případech α_{S1} -kaseinu, κ -kaseinu a celkového kaseinu byla při testování středních hodnot kozího mléka z farmového chovu a kozího mléka z domácího chovu H0 zamítnuta. Při zvolené hladině spolehlivosti 5 % se střední hodnoty obsahu α_{S1} -kaseinu, κ -kaseinu a celkového kaseinu mezi kozím mlékem z farmového chovu a kozím mlékem z domácího chovu statisticky významně liší.

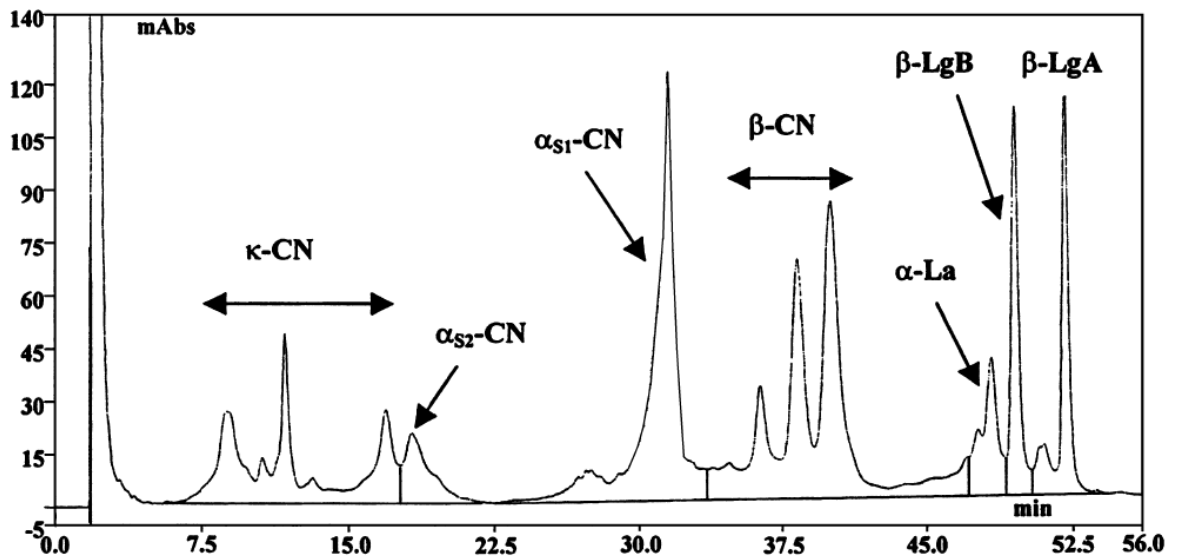
V případě β -kaseinu při testování středních hodnot kozího mléka z farmového chovu a kozího mléka z domácího chovu H0 nebyla zamítnuta. Při zvolené hladině spolehlivosti se střední hodnoty obsahu β -kaseinu mezi kozím mlékem z farmového chovu a kozím mlékem z domácího chovu statisticky významně neliší.

Příloha 2: Komentář statistického zhodnocení rozdílu obsahu kaseinů

K porovnání poměrů jednotlivých kaseinových frakcí v různých druzích mléka byl použit T-test. Provedení T-testu na rozdíl poměrů kaseinů probíhalo stejně jako u porovnání obsahů kaseinů. Nulové hypotézy byly stavěny obdobně a testovány byly stejné skupiny jako v předchozím případě. Se zvolenou $\alpha = 0,05$ bylo zjištěno, že žádné dvě srovnávané skupiny nemají stejnou střední hodnotu poměrů β -CN : α -CN, β -CN : κ -CN nebo α -CN : κ -CN. Ve všech případech se poměry statisticky významně liší.

Příloha 3: Chromatogram kravského mléka

Jde o chromatogram získaný HPLC metodou, kterou vyvinul Bordin et al. (2001).



10 Seznamy

10.1 Seznam zkratek

D-Galp	D-galaktopyranosa
D-GalpNAc	N-acetyl-D-galaktosamin
DTT	dithiothreitol
NeuAc	N-acetylneuraminová kyselina
R	korelační koeficient
R ²	koeficient determinace
Sm.odch.	výběrová směrodatná odchylka
TFA	kyselina trifluoroctová
TPS	tukuprostá sušina
Var. koef.	variační koeficient

10.2 Seznam obrázků

Obrázek 1	Genetické varianty mléčných bílkovin
Obrázek 2	Profily křivek gradientové eluce softwaru Waters Empower System
Obrázek 3	Kalibrační křivka α S1-kaseinu
Obrázek 4	Kalibrační křivka α S2-kaseinu
Obrázek 5	Kalibrační křivka β -kaseinu
Obrázek 6	Kalibrační křivka κ -kaseinu
Obrázek 7	Chromatogram kravského mléka
Obrázek 8	Chromatogram kozího mléka
Obrázek 9	Chromatogram ovčího mléka
Obrázek 10	Překryv chromatogramů kravského, kozího a ovčího mléka
Obrázek 11	Změny obsahu kaseinů během laktace – koza sánská
Obrázek 12	NIR a HPLC stanovení celkového kaseinu – koza sánská
Obrázek 13	Obsahy kaseinů v mléce – koza bílá krátkosrstá

10.3 Seznam tabulek

Tabulka 1	Procentuální složení mléka přežvýkavců
Tabulka 2	Molekulová hmotnost a izoelektrický bod kaseinů

Tabulka 3	Procentuální složení ovčího mléka
Tabulka 4	Procentuální složení kozího mléka
Tabulka 5	Složení kaseinu kozího mléka
Tabulka 6	Gradientová eluce – Pomastowski et al.
Tabulka 7	Gradientová eluce – Bordin et al.
Tabulka 8	Gradientová eluce – Léonil et al.
Tabulka 9	Podmínky gradientové eluce
Tabulka 10	Meze detekce a kvantifikace
Tabulka 11	Opakovatelnost metody – kravské mléko
Tabulka 12	NIR stanovení – kravské mléko
Tabulka 13	HPLC stanovení kaseinů – kravské mléko
Tabulka 14	Poměry kaseinů – kravské mléko
Tabulka 15	NIR stanovení – koza sánská
Tabulka 16	HPLC stanovení kaseinů – koza sánská
Tabulka 17	Porovnání HPLC a NIR – koza sánská
Tabulka 18	Poměry kaseinů – koza sánská
Tabulka 19	NIR stanovení – koza bílá krátkosrstá, farmový chov
Tabulka 20	HPLC stanovení kaseinů – koza bílá krátkosrstá z farmového chovu
Tabulka 21	Celkový kasein a poměry kaseinů – koza bílá krátkosrstá
Tabulka 22	Porovnání HPLC a NIR – koza bílá krátkosrstá, farmový chov
Tabulka 23	HPLC stanovení kaseinů – koza bílá krátkosrstá, domácího chov
Tabulka 24	Poměry kaseinů – koza bílá krátkosrstá, domácí chov
Tabulka 25	HPLC stanovení kaseinů – ovčí mléko
Tabulka 26	Poměry kaseinů – ovčí mléko
Tabulka 27	Výsledky T-testu

10.4 Seznam příloh

Příloha 1	Statistické zhodnocení rozdílů v obsazích kaseinů
Příloha 2	Komentář statistického zhodnocení rozdílů obsahu kaseinů
Příloha 3	Chromatogram kravského mléka