

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Změny v obsahu bílkovinných frakcí ovčího mléka v  
průběhu laktace**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Mgr. Veronika Radiměřská**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Alena Hejtmánková, CSc.**

© 2018 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Změny v obsahu bílkovinných frakcí ovčího mléka v průběhu laktace" 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 12. 4. 2018

## Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní doc. Ing. Aleně Hejtmánkové, CSc., za odborné vedení práce, trpělivost a čas, který mi věnovala. Děkuji i mé rodině za podporu.

## Změny v obsahu bílkovinných frakcí ovčího mléka v průběhu laktace

### Souhrn

Bílkoviny jsou významnou součástí mléka. Mléčné bílkoviny dělíme podle jejich vlastností při srážení na syrovátkové a kaseinové. Obě frakce jsou důležitým parametrem pro nutriční hodnotu mléka a výrobků z něj a také ovlivňují technologickou výtěžnost jeho zpracování. Metodou HPLC s detektorem diodového pole byly stanoveny jednotlivé bílkovinné frakce, konkrétně  $\alpha$ -kasein,  $\beta$ -kasein,  $\gamma$ -kasein,  $\alpha$ -laktalbumin a  $\beta$ -laktoglobulin A i B v ovčím mléce plemene ovce východofříská, Romanovská a Lacaune. Cílem práce byla optimalizace HPLC metody pro stanovení jednotlivých bílkovinných frakcí v ovčím mléce v jedné analýze a sledování jejich změn v průběhu laktace, dále porovnání a statistické zhodnocení zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí ve vzorcích ovčího mléka bahnic chovaných za stejných podmínek. Celkový obsah bílkovin v ovčím mléce se pohyboval v intervalu 1,95 – 8,25 g/100 ml mléka. Nejvyšší celkový obsah bílkovin ( $8,25 \pm 0,63$  g/100 ml) byl stanoven v bazénovém vzorku mléka plemene ovce východofříské chované na farmě F1 v červnu. Nejvyšší průměrné zastoupení kaseinu v mléčných bílkovinách bylo  $92,72 \pm 1,57$  %, jednalo se o bazénový vzorek mléka plemene Lacaune. S výjimkou vzorků mléka plemene ovce Romanovské byl ve vzorcích ze všech kaseinových bílkovin nejvíce zastoupen  $\beta$ -kasein. Pro bílkovinné frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LgA,  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA platí, že se jejich zastoupení v ovčím mléce mění podle období laktace. Pro bílkovinné frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -LgA,  $\beta$ -LgB a  $\alpha_{s1}$ -CN platí, že zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce se u různých plemen se liší. Procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí se měnilo v závislosti na počtu somatických buněk ve vzorcích ovčího mléka. Ve vzorcích mléka s vyšší hodnotou PSB, bylo zastoupení  $\beta$ -CN vyšší a současně nižší zastoupení  $\alpha_{s2}$ -CN s  $\beta$ -LgA než ve vzorcích s nižším obsahem PSB. Změny v procentuálním zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí lze uplatnit v potravinářském průmyslu při zpracování mléka na sýry.

**Klíčová slova:** ovčí mléko, syrovátkové proteiny, kaseiny

## Changes in the content of the protein fractions of sheep's milk during lactation

### Summary

Proteins are an important part of milk. Milk proteins are divided by their whey and casein clotting properties. Both fractions are an important parameter for the nutritional value of milk and its products and also influence the technological yield of processing. By HPLC using a diode array detector, individual protein fractions, namely  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\gamma$ -casein,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin A and B, were determined in sheep's milk of Friesian Milk Sheep, Romanov and Lacaune Sheep. The aim of the work was to optimize the HPLC method for determination of individual protein fractions in sheep milk in one analysis and to monitor their changes during lactation and to compare and statistically evaluate the representation of individual protein fractions in sheep milk samples of ewes kept under the same conditions. The total protein content in sheep's milk ranged from 1.95 - 8.25 g / 100 ml of milk. The highest total protein content ( $8.25 \pm 0.63$  g / 100 ml) was determined in a pool of Friesian Milk Sheep breed farmed on the F1 farm in June. The highest average casein content in milk proteins was  $92.72 \pm 1.57\%$ , and it was a Lacaune pool of milk. With the exception of the samples of milk from the Romanov Sheep breed, most of the casein proteins were most represented by  $\beta$ -casein. For protein  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LgA,  $\alpha_{s1}$ -CN and  $\alpha$ LA fractions, their sheep milk turnover varies according to the lactation period. For  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -LgA,  $\beta$ -LgB,  $\alpha_{s1}$ -CN protein fractions, the representation of protein fractions in sheep's milk of different breeds is different. The percentage of individual protein fractions varied depending on the number of somatic cells in sheep milk samples. In milk samples with a higher PSB value, both  $\alpha_{s2}$ -CN and  $\beta$ -LgA were higher and lower than in samples with lower PSB content. Changes in percentages of individual protein fractions can be applied in the food industry when processing milk for cheese.

Keywords: sheep's milk, whey protein, casein

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce.....	9
2.1	Cíle práce.....	9
2.2	Vědecké hypotézy.....	9
3	Literární rešerše.....	10
3.1	Mléko ve výživě člověka.....	10
3.1.1	Proteiny.....	11
3.1.2	Tuky.....	14
3.1.3	Sacharidy.....	16
3.1.4	Minerální látky.....	16
3.1.5	Enzymy.....	18
3.2	Počet somatických buněk v mléce.....	18
3.3	Ovčí mléko.....	19
3.3.1	Kaseiny ovčího mléka.....	21
3.3.2	Syrovátkové bílkoviny ovčího mléka.....	23
3.4	Výtěžnost ovčího mléka při výrobě sýrů.....	23
3.4.1	Obsah genetické varianty proteinů.....	25
3.5	Metoda HPLC při stanovení proteinů.....	26
4	Materiál a metody.....	28
4.1	Chemikálie.....	28
4.2	Pomůcky.....	28
4.3	Přístroje.....	28
4.4	Experimentální materiál.....	29
4.5	Příprava vzorků.....	29
4.6	Chromatografické podmínky.....	30

4.7	Statistické zhodnocení .....	32
5	Výsledky .....	32
5.1	Statistické zhodnocení .....	44
5.1.1	Důkaz hypotézy H1: Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce se liší během laktace 44	
5.1.2	Důkaz hypotézy H2: Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce různých plemen je odlišné.....	45
6	Diskuze .....	46
7	Závěr .....	51
8	Seznam použité literatury .....	52
9	Přílohy .....	57
	Příloha 1: Test normality rozložení .....	57
	Příloha 2: Důkaz hypotézy H1 .....	64
	Příloha 3: Důkaz hypotézy H2 .....	70
10	Seznamy .....	77
10.1	Seznam zkratk.....	77
10.2	Seznam tabulek .....	77
10.3	Seznam grafů .....	77
10.4	Seznam příloh .....	79

## 1 Úvod

Dle Českého statistického úřadu bylo v ČR (k 1.4.2017) chováno 217 141 kusů ovcí.

Ovčí mléko je vodnatá, bílá až lehce nažloutlá tekutina s mírně natrpklou chutí. Složením se ovčí mléko liší od mléka kravského. Obsahuje v průměru kolem 5,5 % bílkovin, 7 % tuku, 5 % cukru a 0,9 % popelovin. Jelikož ovčí mléko obsahuje vysoký podíl tuku a bílkovin je výživná hodnota ovčího mléka téměř dvakrát vyšší než mléka kravského. Ovčí mléko je bohatší na vitamíny skupiny B. Dále také obsahuje příznivé spektrum mastných kyselin. Jde zejména o n-3 mastné kyseliny s krátkým a středním řetězem a konjugovanou kyselinu linolovou-CLA, její obsah se mění dle výživy ovce.

Bílkoviny jsou významnou složkou mléka. Mléčné bílkoviny, podle jejich vlastností při srážení mléka, dělíme na syrovátkové a kaseinové. Obsah a složení jednotlivých bílkovinných frakcí má vliv při zpracovávání mléka, zejména ve výrobě sýrů a tvarohů.

Z mlék kopytníků obsahuje ovčí mléko nejvyšší podíl sušiny, zejména lipidů a kaseinu. Proteiny a lipidy tvoří 69 % sušiny ovčího mléka.

V ČR není tradice dojení ovcí, ale v sousedním Slovensku, a také ve světě, má využití ovčího mléka na výrobu různých mléčných výrobků značný ekonomický význam. V současné době v ČR roste poptávka po výrobcích z ovčího mléka a to zejména tvrdých sýrů. Někteří výrobci zkouší vyrábět např. i jogurty z ovčího mléka, ale není to příliš rozšířeno. Kvalita výsledného produktu, záleží na zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí.

V oblasti jakosti potravin jsou mléčné výrobky zvláště zajímavé vzhledem k sociálnímu a hospodářskému významu trhu s mléčnými výrobky. Riziko podvodné manipulace je v této oblasti vysoké, například nahrazení sušeného mléka syrovátkou je z ekonomického hlediska velmi zajímavé, proto je třeba mít k dispozici vhodné analytické metody pro stanovení všech mléčných složek. Vhodnou metodou je například vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Jedná se o metodu založenou na rozdílné afinitě látek k mobilní a stacionární fázi.



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

### 2.1 Cíle práce

Cílem diplomové práce je optimalizace HPLC metody pro stanovení jednotlivých bílkovinných frakcí v ovčím mléce v jedné analýze, sledování jejich změn v průběhu laktace a porovnání a statistické zhodnocení zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí ve vzorcích ovčího mléka bahnic chovaných za stejných podmínek.

### 2.2 Vědecké hypotézy

H1: Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce se liší během laktace.

H2: Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce různých plemen je odlišné.

H3: Různé bílkovinné frakce v ovčím mléce lze s dostatečnou spolehlivostí stanovit v jedné analýze vhodnou metodou HPLC.

### 3 Literární rešerše

#### 3.1 *Mléko ve výživě člověka*

Mléko a mléčné výrobky patří mezi základní potraviny a většina z nich se konzumuje od pradávna. Nejstarší záznamy o jeho konzumaci jsou několik tisíc let staré, archeologické důkazy jsou ještě starší. Konzumace mléka je doložena ve všech historických dobách i v Čechách a na Moravě.

Pro lidskou výživu se v ČR téměř výlučně využívá mléko kravské, v malém množství i mléko ovčí a kozí. Podle legislativy se mlékem nesmějí nazývat nápoje, které vzhledem mléko připomínají, ale jejich původ je jiný, např. ze sójových bobů, ovsy, pohanky a dalších rostlinných surovin. Tyto nápoje nesou na obalu označení „nápoj“, ne mléko (sójový nápoj, ovesný nápoj).

Mléko obsahuje řadu důležitých živin pro všechny populační skupiny obyvatel (Dostálová, 2016). Mléko je zdroj velmi kvalitních bílkovin, které ve srovnání s bílkovinami masa mají výhodu, že mají velmi nízký obsah purinových bází, které přispívají ke vzniku dny. Mléčný tuk má vysoký obsah nasycených mastných kyselin, protože však podstatnou část tvoří mastné kyseliny s krátkým a středním uhlíkovým řetězcem, je poměrně dobře stravitelný. Mléko obsahuje cholesterol, jehož množství závisí na množství tuku ve výrobku. Ze sacharidů obsahuje mléko téměř výlučně laktózu, která je příčinou trávicích potíží u lidí s laktózovou intolerancí.

Z dalších živin je mléko zdrojem řady vitaminů, jako je vitamin A, D včetně prekurzorů vitamínu A karotenů (v odstředěném mléce je obsah těchto vitaminů velmi nízký). Dále obsahuje vitaminy skupiny B (zvláště riboflavin) a minerální látky (vápník, zinek a jod) (STOB klub, 2012). Obsah základních živin v různých druzích mlék je v tabulce č. 1.

Tabulka 1: Obsah živin v mléce (Velíšek, 2012)

Složka	Obsah v % v mléce			
	kravském	kozím	ovčím	lidském
proteiny celkem	3,2	3,2	4,6	0,9 <sup>a)</sup>
kaseiny	2,6	2,6	3,9	0,4
proteiny syrovátky	0,6	0,6	0,7	0,5
tuky	3,9	4,5	7,2	4,5
sacharidy	4,6	4,3	4,8	7,1
minerální látky	0,7	0,8	0,9	0,2

a) Během kojení roste obsah proteinů na 1,6 %

### 3.1.1 Proteiny

Proteiny jsou základní funkční a strukturální komponentou lidského organismu. Jsou složené z jednotlivých aminokyselin (AMK), které jsou peptidovými vazbami spojeny ve vyšší strukturální jednotky. Proteiny tvoří strukturu živého organismu, fungují jako enzymy a jsou zásadní pro přepis genetické informace obsažené v DNA. K dalším funkcím patří výživa, imunita, transport, funkce jednotlivých systémů, regulace metabolismu a mnoho jiných. V těle neustále probíhá degradace a resyntéza bílkovin (Svačina et al., 2013; Zlatohlávek et al., 2016).

#### 3.1.1.1 Kasein

Hlavní složkou kaseinové frakce mléka je  $\beta$ -kasein (Borková et al., 2005). V kravském mléce se  $\alpha_{S1}$ -kasein vyskytuje ve čtyřech genetických variantách (A, B, C a D).  $\alpha_{S1}$ -kasein má molekulovou hmotnost 23,6 kDa a  $\alpha_{S2}$ -kasein 25,2 kDa. Genetické varianty se liší primární strukturou, nejčastější variantou je varianta B. Kaseiny  $\alpha_{S1}$  ve variantě B obsahují polypeptidové řetězce složené ze 199 AMK. V polohách 43 až 80 obsahují osm fosfoserinových zbytků, díky nimž je tato část molekuly polární. V polohách 100 až 199 jsou situovány nepolární postranní řetězce AMK. Za přítomnosti vápenatých iontů tvoří kasein  $\alpha_{S1}$  nerozpustnou vápenatou sůl. Fragmenty  $\alpha_{S1}$ -kaseinu jsou považovány za  $\lambda$ -kasein.

Kaseiny  $\alpha_{S2}$  mají podobnou strukturu jako  $\alpha_{S1}$ , ale nejsou tak citlivé k přítomnosti vápenatých iontů (Velíšek, 2012).

$\beta$ -kaseiny jsou složené z 209 aminokyselinových zbytků, 5 fosfoserinových zbytků a nepolárních postranních řetězců. V prostředí s obsahem vápenatých iontů tvoří  $\beta$ -kaseiny

sůl rozpustnou při teplotách nižších než 1 °C. Vlivem proteolytických enzymů se  $\beta$ -kaseiny rozkládají za vzniku  $\gamma$ -kaseinů. Pokud se odštěpí zbytek s počtem aminokyselin 1 až 28 vzniká  $\gamma_1$ -kasein, při odštěpení zbytku 1 až 105 vzniká  $\gamma_2$ -kasein a odštěpením zbytku 1 až 107 vznikne  $\gamma_3$ -kaseinu (Velíšek et Hajšlová, 2009).

Poslední složkou kaseinu jsou  $\kappa$ -kaseiny. V mléce se  $\kappa$ -kaseiny vyskytují ve dvou genetických variantách A a B. Běžnější B varianta je složena ze 169 AMK zbytků a sacharidů.  $\kappa$ -kaseiny obsahují především rozvětvený tetrasacharid, ale jsou i  $\kappa$ -kaseiny s navázaným rozvětveným nebo lineárním trisacharidem, disacharidem nebo N-acetyl-D-galaktosaminem. Sacharidy jsou vázány glykosidickou vazbou na aminokyselinu threonin s pořadovým číslem 133.  $\kappa$ -kasein tvoří rozpustné soli s vápenatými ionty, tím se stabilizuje  $\alpha_{s1}$ -kasein a  $\beta$ -kasein (Velíšek et Hajšlová, 2009). Hlavní frakce kaseinu a jejich obsah v mléce je udán v tabulce č. 2.

Kasein je tvořený směsí asi deseti různých bílkovin. Jde o čtyři základní druhy fosfoproteinů. Hydrofóbními silami za účasti fosforečnanů a citrátu vápenatého se seskupují do micel. V povrchové vrstvě micely je  $\kappa$ -kasein, ten není citlivý na vápenaté ionty a zabraňuje tak spojování kaseinových micel. Při zpracování mléka je důležitá koloidní stabilita kaseinu, která je ovlivňována různými faktory a procesy při zpracování mléka jako aktivní kyselost, teplotou, proteolýzou, aktivními  $\text{Ca}^{2+}$  ionty.

V kyselějším prostředí klesá disociace karboxylových skupin aminokyselin (AMK), tím se snižuje celkový negativní náboj i odpudivé síly kaseinových micel. Současně se přeměňuje koloidní fosforečnan vápenatý na rozpustný a uvolní se z kaseinových micel. Tím dochází k poklesu koloidní stability mléka. Tohoto jevu se využívá při „kyselém srážení“ při tvorbě fermentovaných mléčných výrobků a některých sýrů. Jestliže dojde k dosažení izoelektrického bodu kaseinu (pH 4,6), kaseinové micely agregují a dochází ke srážení mléka.

Pokud teplota mléka klesne pod 10 °C, část  $\beta$ -kaseinu přejde do mléčného séra a zmenší se kaseinové micely, to je nežádoucí zejména při výrobě sýrů. Naopak během tepelného ošetření se kaseinové micely zvětšují a zmenšuje se jejich hydratační obal. Proto může dojít při horší koloidní stabilitě k vysrážení mléka.

Vysoká aktivita  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v mléce se využívá u mléka pro výrobu sladkých sýrů, protože usnadňuje srážení kaseinu. Jako negativní je považována u mléka určeného k sterilaci. Základem výroby sladkých sýrů je proteolýza  $\kappa$ -kaseinu pomocí syřidlových enzymů (Kadlec et al., 2012).

Tabulka 2: Hlavní frakce kaseinu (Kadlec, 2012)

Frakce	Obsah (g·l <sup>-1</sup> )	Mol. Hmotnost	Poznámka
$\alpha_{s1}$ -CN	12 -15	23 000	nerozpustný v přítomnosti Ca <sup>2+</sup>
$\alpha_{s2}$ -CN	3-4	25 000	nerozpustný v přítomnosti Ca <sup>2+</sup>
$\beta$ -CN	9-11	24 000	pod 10 °C částečně rozpustný
$\kappa$ -CN	2-4	19 000	není citlivý na přítomnost Ca <sup>2+</sup>

### 3.1.1.2 Proteiny syrovátky

Syrovátkové (sérové) proteiny jsou různorodá skupina protilátek pocházející z krevního séra dojnice. Jsou součástí přirozeného antibakteriálního systému mléka. Syrovátkové proteiny tvoří asi z 50 % globulární protein  $\beta$ -laktoglobulin (relativní molekulová hmotnost 18 kDa). Polypeptidický řetězec  $\beta$ -laktoglobulinu je tvořen 162 AMK. V mléce je přítomen jako dimer a vyskytuje se ve třech genetických variantách. Minoritní složkou jsou vysokomolekulární globulární glykoproteiny zvané imunoglobuliny s účinností protilátek (Velíšek, 2002; Kadlec et al., 2012).

Hlavní složkou syrovátkových bílkovin jsou  $\beta$ -laktoglobulin (b-LG),  $\alpha$ -laktalbumin (a-LA), sérový albumin, imunoglobuliny a proteoso-peptonová frakce. Syrovátkové bílkoviny mají vysokou nutriční hodnotu, která je vyšší než nutriční hodnota kaseinu. Syrovátkové bílkoviny představují jeden z nejhodnotnějších běžně dostupných bílkovinných materiálů, pro jejich vhodné složení AMK. Celkový obsah bílkovin (N-látek) v syrovátce je od 14 do 24 %. Syrovátka dále obsahuje vitaminy a minerální látky. Přestože má syrovátka vysokou biologickou hodnotu, není mlékárenským průmyslem ekonomicky efektivně využívána.

Syrovátka se využívá v potravinářském i farmaceutickém průmyslu a ke krmným účelům (Jansová et al., 2007). Jednotlivé bílkoviny mléčného séra a jejich obsah v mléce jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Bílkoviny mléčného séra (Kadlec, 2012)

Frakce	Obsah g·kg <sup>-1</sup> mléka	Charakteristika
α-laktalbumin	1,2	
β-laktoglobulin	3,2	tepelná denaturace - vazba na κ-CN, zdroj - SH skupin pro chemické reakce
imunoglobuliny	0,8	antibakteriální účinky, aglutininy - shlukování kuliček, urychlení vystávání mléčného tuku v chladu
sérový albumin	0,4	
proteaso-peptonová frakce	0,8	heterogenní produkty hydrolýzy kaseinu tepelně stabilní
laktoferin	0,1	umožňuje transfer železa- inhibice některých sporotvorných bakterií
transferin	0,1	

Z technologického hlediska jsou u bílkovin mléčného séra důležité tyto vlastnosti:

Při teplotě nad 60 až 70 °C sérové bílkoviny denaturují, na rozdíl od kaseinu. Nedochozí k vysrážení, ale váží se s κ-kaseinem, a tím mění vlastnosti kaseinových micel. Zvětšují objem kaseinových micel a zvětšují jejich hydratační obal. Během srážení kaseinu se vytvoří měkčí sraženina s menším sklonem k synerezi a uvolňování syrovátky. To je žádoucí u výroby fermentovaných mléčných výrobků a negativně hodnoceno při výrobě řady sýrů.

Dále sérové bílkoviny spojené s κ-kaseinem zpomalují sladké srážení mléka a zrání sýrů, protože zhoršují přístup proteolytických enzymů ke kaseinu.

Rozbalením globulární struktury se odkryjí funkční skupiny AMK, zejména thiolové, tím se zpřístupní chemickým reakcím. Mezi významné patří reakce –SH skupin, které způsobují vařivou příchuť mléka po vysokém zahřevu. Pro snížení oxidačního žluknutí mléčného tuku se využívají –SH skupiny, které působí jako antioxidační činidlo (Kadlec et al., 2012).

### 3.1.2 Tuky

Tuky mají v lidském organismu nezastupitelnou roli. Pro svou energetickou hodnotu (1 g tuku = 9 kcal, 38 kJ) představují důležitý energetický substrát stravy. Jsou významnou zásobárnou energie, dále jsou nepostradatelné pro své tepelně izolační vlastnosti, jsou součástí buněčných membrán a substrátem pro syntézu steroidních hormonů a žlučových

kyselin. Také se pomocí nich ve střevě vstřebávají v tucích rozpustné vitaminy. Triacylglyceroly tvoří většinu přijatého tuku v potravě (kolem 100 g/den). Přibližně polovina přijatého tuku by měla být rostlinného původu a druhá živočišného (Svačina et al., 2013; Zlatohlávek et al., 2016).

### 3.1.2.1 Mléčný tuk

Tuk v mléce je dispergován ve formě tukových kuliček. 99 % mléčného tuku tvoří nepolární triacylglyceroly, obklopené vrstvou povrchově aktivních látek (fosfolipidy a membránovými lipoproteiny). Velikost tukových kuliček je v rozmezí 0,1 až 15  $\mu\text{m}$ , 90 % tuku je v kuličkách o průměru 2 až 6  $\mu\text{m}$ .

Z technologického hlediska jsou významné tyto vlastnosti:

Nižší měrná hmotnost mléčného tuku než mléčné plazmy. Proto při stání mléka dochází k samovolnému vyvstávání tuku. Této vlastnosti tuku se využívá při odtučnění mléka a získávání smetany odstředováním.

V triacylglycerolech mléčného tuku je zastoupeno mnoho druhů mastných kyselin, které mají různé fyzikální vlastnosti. Důsledkem toho je široké rozmezí teploty tuhnutí (19 až 26 °C) a tání (28 až 35 °C) mléčného tuku, který je tvořen směsí tekutého a tuhého podílu. Množství nenasycených mastných kyselin s nižším bodem tuhnutí je proměnný v závislosti na krmení dojníc v průběhu roku, s maximem v letních a s minimem v zimních měsících.

Na rozdíl od jiných tuků vykazuje mléčný tuk stabilnější polymorfismus ve směsných krystalech triacylglycerolů, proto rychlost chlazení ovlivňuje podíl tuhého tuku a teplotu tání. Během skladování dochází pomalu ke změnám krystalů. Čím vyšší teplota, tím vyšší rychlost změn. Krystalizace tuku má zásadní význam pro konzistenci másla.

Tukové kuličky, u kterých neproběhla krystalizace tuku dostatečně, jsou křehké a mechanickým namáháním, jako je tomu u čerpání nebo míchání, se snadno poruší a uvolní se tekutý tuk. Tekutý tuk snadno podléhá lipolýze a způsobuje slepování tukových kuliček. Tento jev je nazýván „ztlučení tuku“ a je principem výroby másla zpěňovacím způsobem, u ostatních výrobků je negativní.

Během tepelného ošetření mléka dochází jen k částečné inaktivaci bakteriálních a nativních lipáz. Hydrolýzou vznikající volné mastné kyseliny, ty způsobují chuťové vady a mohou také negativně ovlivnit růst bakterií mléčného kvašení při výrobě fermentovaných mléčných výrobků a sýrů.

Mléčný tuk podléhá snadno autooxidaci za vzniku chuťových vad jako lojovitá, kovová, rybí aj. Vyšší riziko je u vysokotučných výrobků s dlouhou trvanlivostí (máslo, trvanlivá smetana atd.), proto se při zpracování mléka musí minimalizovat faktory způsobující autooxidaci. Mezi tyto faktory patří: kontaminace  $\text{Cu}^{2+}$ , působení světla (použití obalů nepropustných pro světlo) a obsah kyslíku (deareace mléka při tepelném ošetření) (Kadlec et al., 2012).

### 3.1.3 Sacharidy

Sacharidy jsou organické látky, které jsou chemicky definované jako polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony. Dělí se podle počtu sacharidových jednotek na mono-, oligo- (2 až 10 sacharidových jednotek) a polysacharidy. Označují se podle počtu atomů uhlíku (3 až 6 atomů C) jako triózy, tetrózy, pentózy a hexózy. Sacharidy jsou důležitou součástí potravy. Zdrojem sacharidů jsou potraviny rostlinného původu, mléko a med. Organismus je ukládá ve formě glykogenu (Svačina et al., 2013; Zlatohlávek et al., 2016).

#### 3.1.3.1 Laktóza

Laktóza patří mezi disacharidy. Je tvořena D-glukózou a D-galaktózou navzájem spojenými  $\beta$ -glykosidovou vazbou.

Význam laktózy v mlékárenské technologii:

Laktóza je využívána jako substrát bakteriemi mléčného kvašení, při výrobě fermentovaných mléčných výrobků a sýrů.

Laktóza je redukující cukr. Během tepelného ošetření mléka reaguje s volnými aminoskupinami bílkovin za vzniku produktů Maillardových reakcí, způsobujících změnu chuti a hnědnutí sterilovaného mléka. Je omezeně rozpustná, proto během výroby např. slazeného kondenzovaného mléka dochází k její krystalizaci.

Během rychlého sušení nebo zmrazování vzniká bezvodá laktóza, která je hydrokopická a postupně přijímá vodu za tvorby  $\alpha$ -hydrátu. Dochází tak k tvorbě slepenců v sušeném mléce nebo syrovátce (Kadlec et al., 2012).

### 3.1.4 Minerální látky

Z technologického hlediska patří k nejvýznamnějším minerálním látkám v mléce vápník, zejména jeho obsah a forma. Aktivita vápníku významně ovlivňuje koloidní stabilitu kaseinu. Zaprvé termostabilitu mléka a za druhé sladké srážení mléka a vlastnosti sýřeniny



při výrobě sýrů. Obsah vápníku v mléce je průměrně  $1200 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , z toho je 30 % v rozpustné formě v mléčném séru především jako hydrogenfosforečnan a citrát, méně než 10 % z celkového množství je v disociované formě.

Větší část vápníku je přítomna v nerozpustné formě koloidního fosforečnanu vápenatého, který je obsažen v kaseinových micelách.

Mezi jednotlivými formami vápníku se utváří rovnováha ovlivňující vlastnosti kaseinu. Pokud dojde ke zvýšení kyselosti mléka (např. fermentací laktózy na mléčnou kyselinu), zvýší se podíl rozpustného a disociovaného vápníku. Při tepelném ošetření mléka nad  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  přecházejí částečně ionty vápníku na koloidní fosforečnan vápenatý. Tato změna je vratná, ale k dosažení původní rozpustnosti dochází pomalu. Přídavek sacharidů zvyšuje aktivitu  $\text{Ca}^{2+}$  a přidávkem solí se zvýší jeho iontová síla. Snížení iontové síly se dosáhne přidáním fosforečnanu nebo citrátu.

Technologický význam sodíku, draslíku a chloridů spočívá v jejich vlivu na koligativní vlastnosti mléka. Ty jsou určeny molární koncentrací látek rozpustných v mléce. Přibližně z poloviny je to koncentrací laktózy a z poloviny rozpustnými solemi. Osmotický tlak syrového mléka je stálý, odpovídá osmotickému tlaku krevního séra dojnice. Tomu také odpovídá pokles bodu tuhnutí vody v mléce. Stanovení bodu tuhnutí v mléce se využívá pro důkaz porušení mléka přidáním vody (Kadlec et al., 2012).

#### 3.1.4.1 Vápník

Na rozdíl od většiny rostlinných zdrojů, z nichž je využitelnost vápníku pouze 5 až 10 %, je vápník v mléce využitelný asi z 30 %. Nejbohatším zdrojem vápníku jsou z mléčných výrobků tvrdé sýry s průměrným obsahem kolem  $800 \text{ mg}/100 \text{ g}$  (po máku nejvyšší obsah) (Velíšek et Hajšlová, 2009).

Doporučený denní příjem vápníku je dle výživových doporučených dávek pro dospělé  $1000 \text{ mg}/\text{den}$  (pro těhotné  $1500 \text{ mg}/\text{den}$ , kojící  $2000 \text{ mg}/\text{den}$ , někteří odborníci doporučují ženám po padesátém roku věku, které neužívají estrogeny zvýšit dávku až na  $1500 \text{ mg}/\text{den}$ ). Dávku  $1000 \text{ mg}/\text{den}$  uhradí asi  $100 \text{ g}$  tvrdého sýru. Optimální z výživového hlediska je, aby se prostřednictvím mléka a mléčných výrobků uhradily asi dvě třetiny doporučené denní dávky vápníku. Tyto dávky by měly být rozděleny v poměru 1:1:1 mezi sýry, tekuté mléko a zakysané mléčné výrobky. Plnění výživových doporučených dávek vápníku je v naší populaci nedostatečné. Nedostatečný příjem vápníku souvisí zejména s nízkou spotřebou mléka a mléčných výrobků v ČR (Dostálová, 2016).

### 3.1.5 Enzymy

V mléku se vyskytuje široké spektrum nativních enzymů, pocházejících z mléčné žlázy. Mnoho z nich je součástí přirozeného antibakteriálního systému mléka, některé mohou také katalyzovat biochemické reakce, vedoucí ke vzniku sensorických vad mléčných výrobků a ke změně technologických vlastností. Dále se v mléce vyskytují bakteriální enzymy z bakteriální mikroflóry, jedná se zejména o termorezistentní proteázy a lipázy psychrotrofních mikroorganismů. Ty představují větší riziko z hlediska sensorického a technologických vlastností než přirozeně se vyskytující enzymy (Kadlec et al., 2012).

### 3.2 Počet somatických buněk v mléce

Kromě hodnocení mikrobiologické kvality mléka a stanovení obsahu pevných složek je kvalita vyprodukovaného mléka určována i dalšími faktory jako je např. počet somatických buněk (PSB). Hodnocení PSB v mléce patří k základním ve světě rozšířeným kontrolním programům pro velké a malé přežvýkavce, kozy, ovce a dojnice. PSB je hodnocen z bazénového vzorku alespoň dvakrát měsíčně. Výsledná průměrná hodnota počtu somatických buněk se používá jako hlavní ukazatel pro zpeněžování.

V každém stádě existuje určitý podíl dojnic, v jejichž mléce je zvýšený PSB. Důvody zvýšeného množství PSB ve vyprodukovaném mléce mohou být různé. Kromě sezónního působení vysokých teplot může být zvýšení somatických buněk způsobeno také působením stresové zátěže před nebo v průběhu dojení. Mezi nejčastější důvody vysokého PSB patří výskyt subklinických popřípadě klinických mastitid. Klasickou metodou léčby je použití antibiotik, to je ovšem vhodné pouze při akutním průběhu mastitidy, tedy při vzniku infekce. Navíc použití antibiotik vyřazuje mléko na určitou dobu z dodávky ke zpracování. Další vhodný způsob aktivního působení na množství somatických buněk v mléce, kromě trvalého vyřazení mléka takto postižených dojnic, je aplikace homeopatických léčiv (Stádník et al., 2000).

V současnosti v Evropské unii neexistuje norma pro hodnoty PSB v mléce koz, ani ovcí. Existuje limit pouze pro mikrobiologickou kvalitu mléka (1500000 CFU/ml). PSB má úzký vztah k užitkovosti malých přežvýkavců, vysoké hladiny mohou způsobit snížení produkce až o 20 %. Somatické buňky obsahují lipolytický a proteolytický enzymatický systém, který narušuje jednotlivé složky mléka, ovlivňuje zpracovatelnost suroviny i trvanlivost produkce. Mastitidní patogeny jsou doprovázeny specifickými toxiny, které znehodnocují výchozí surovinu. V mléce s vysokým obsahem PSB dochází ke změně látkového složení, a to ke snížení obsahu tuku,

bílkovin a laktózy. Zároveň stoupá obsah volných syrovátkových bílkovin a mastných kyselin. Pro zpracování takového mléka je typický prodloužený čas srážení a snížení výtěžnosti (Seydlová a Dragounová, 2017).

### 3.3 *Ovčí mléko*

Ovčí mléko představuje z hlediska svého složení velmi cennou potravinu a surovinu pro lidskou výživu.

Ovčí mléko je vodnatá, bílá až lehce nažloutlá tekutina s mírně natrpklou chutí. Složením se ovčí mléko liší od mléka kravského. Obsahuje v průměru kolem 5,5 % bílkovin, 7 % tuku, 5 % cukru a 0,9 % popelovin. Procentuální složení ovčího mléka je uvedeno v tabulce č. 4. Jelikož ovčí mléko obsahuje vysoký podíl tuku a bílkovin, je výživná hodnota ovčího mléka téměř 2x vyšší než mléka kravského. Ovčí mléko je bohatší na vitamíny skupiny B.

Délka laktace ovcí se pohybuje od 100 do 250 dní a celková produkce mléka kolísá mezi 80 až 140 kg. Mléčnost se u dojných plemen pohybuje kolem 200 až 300 kg, u specializovaných dojných plemen (např. východofríská ovce, awassi aj.) 500 až 600 kg. Průměrná denní dojivost ovcí kolísá od 0,5 kg do 3 kg.

Laktační křivka má, v prvních čtyřech až šesti týdnech po porodu, stoupající trend. Pak se produkce mléka udržuje přibližně na stejné úrovni a pokles nastává po 10 až 12 týdnech po obahnění. Průběh laktační křivky je značně ovlivňován výživou, početností vrhu, kvalitou ošetrovatelské péče, plemennou příslušností, věkem bahnice, plodností, frekvencí a technikou dojení a zdravotním stavem.

Výrazný vliv na množství a složení mléka má plemeno ovce. Nejvíce mléka se získává od dojných plemen ovcí, např. v ČR je nejvíce chovaná ovce východofríská. Toto plemeno produkuje za laktaci 500 až 600 kg mléka, s denní dojivostí 2 až 5 kg. Naopak nízkou produkci mléka mají merinová plemena ovcí (60 – 120 kg), která se ale dojí výjimečně.

Výrazný vliv na celkové množství nadojeného mléka má stáří bahnic. Dojivost se zvyšuje od prvního obahnění do třetí až čtvrté laktace, kdy je nejvyšší, pak se 1 až 2 laktace udržuje na stejné výši a v následujících letech nastává postupné snižování.

Nejvýznamnější činitel, který rozhoduje o mléčné užitkovosti bahnic je výživa. Pouze při plnohodnotné výživě mohou bahnice uplatnit své genetické předpoklady pro mléčnou užitkovost. Velmi příznivě působí na množství a kvalitu mléka pastva na kvalitním pastevním porostu. Kvalitní pastva je zdrojem lehce stravitelných živin, vitamínů a minerálních látek.

Množství nadojeného mléka a tučnost se zvyšuje při zkrácení intervalu mezi dojeními současně s vyšším počtem dojení.

Při zhoršení zdravotního stavu bahnice, dochází vždy k poklesu množství nadojeného mléka. Výrazně na mléčnou produkci působí záněty mléčné žlázy, plicní a střevní parazitózy, metabolické poruchy apod.

V ČR není tradice dojení ovcí, ale v sousedním Slovensku, a také ve světě, má využití ovčího mléka na výrobu různých mléčných výrobků značný ekonomický význam.

Ve Slovenské republice patří mezi základní produkty, které se získávají z ovčího mléka, hrudkový sýr a bryzda, dále salašnické výrobky, oštěpek, parenica, různé parené sýry a žinčica.

Podstatná část produkce ovčího mléka ve světě se využívá k výrobě zrajících sýrů. V zemích východního Středomoří se jedná o sýry běžné spotřeby (gruyère a feta v Řecku, siréné v Bulharsku). V západním Středomoří a ve Francii jsou ovčí sýry naopak výrobky určenými pro luxusní spotřebu (plísňové sýry roqueforského typu), a tím se ovčí mléko vysoce zhodnocuje (Štolc, 1999).

Z mlék kopytníků obsahuje ovčí mléko nejvyšší podíl sušiny, zejména lipidů a kaseinu. Proteiny a lipidy tvoří 69 % sušiny ovčího mléka, v kravském mléce tvoří 56 % sušiny. Ovčí mléko má ve srovnání s kravským vyšší viskozitu a delší dobu odolává působení mikrobů po nadojení. Vyšší kyselost mléka je způsobena nejspíše větším podílem bílkovin. 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).

Ve studii popisované autory Tietze et Majewski (1997) byl stanovován obsah tuku a bílkovin v mléce 1464 jedinců různých plemen ovcí, které nebyly primárně chovány na produkci mléka. Vzorky byly odebrány 15., 45. a 75. den laktace. Průměrný obsah tuku byl 4,31 %. Obsah tuku v mléce se pro jednotlivá plemena statisticky významně lišil. Nejvyšší hodnota byla zjištěná v mléce plemene Berichonne ve 45. dni laktace a činila 7,19 % tuku. Nejvyšší zjištěný obsah bílkovin byl 8,55 % bílkovin v mléce plemene Suffolk. Základní bílkoviny v mléce ovcí jsou stejné jako v kravském a kozím mléce a jsou rozděleny do dvou tříd na kaseinové a syrovátkové proteiny (Giambra, 2014).

Tabulka 4: Procentuální složení ovčího mléka (Roginski et al., 2003)

Komponenta	Průměr (%)	Rozsah (%)	Podíl v sušině (%)
Voda	81,6	79,27 – 83,8	
Laktóza	4,61	4,1 – 4,95	25
Tuk	7,09	5,1 – 8,7	38,5
Hrubá bílkovina*	5,72	4,75 – 6,6	31,1
Kasein	4,44		
Syrovátkové bílkoviny	0,98		
Nebílkovinný dusík	0,047		
Popeloviny	0,91	0,7 – 1,1	4,9
Celková sušina	18,4	16,2 – 20,73	
Tukuprostá sušina	11,31		

\*Celkový dusík x 6,38

### 3.3.1 Kaseiny ovčího mléka

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

U kaseinů se rozlišují čtyři frakce  $\alpha_{s1}$ - (CSN1S1),  $\alpha_{s2}$ - (CSN1S2),  $\beta$ - (CSN2) a  $\kappa$ -kasein (CN, CSN3). Kaseiny jsou hlavními bílkovinami v ovčím mléce a tvoří 76 až 83 % celkového proteinu (Giambra et al., 2014).

Kaseiny jsou složeny z kaseinů citlivých na vápník ( $\alpha$ s a  $\beta$ ) a kalcium-necitlivého  $\kappa$ -kaseinu, který je zodpovědný za stabilizaci prvků proti srážení v přítomnosti vápníku. Úkolem kaseinů je přenášet fosforečnan vápenatý obsažený v mléce, a tím poskytnout kojenému mláděti zdroj vápníku a fosforu pro tvorbu kostí, ale zároveň také aminokyseliny. Mléko produkované různými plemeny může vykazovat odlišnou technologickou kvalitu (Selvaggi et al., 2014).

#### 3.3.1.1 $\alpha_{s1}$ -kasein (CSN1S1)

$\alpha_{s1}$ -kasein se v ovčím mléce vyskytuje až v pěti formách (Roginski et al., 2003). Více než z 50 % je přítomen ve formě o délce 199 aminokyselin. Ostatní varianty mají peptidový řetězec

kratší a liší se také mírou fosforylace na dvou molekulách serinu, celkem jsou popsány tři stupně fosforylace (Trujillo et al., 2000).

$\alpha_{s1}$ -kasein je strukturní složkou kaseinové micely a má důležitou funkční roli při tvorbě sýřeniny, která je charakterizována větší rozpustností v přítomnosti vápníku. Jedná se o vysoce fosforylovaný protein. Nukleotidová sekvence genů (CSN1S1) kódující  $\alpha_{s1}$ -kaseiny ukazuje přítomnost vysoce konzervované signální sekvence 15 zbytků, ale zcela odlišných sekvencí pro zralé proteiny, což naznačuje, že jsou kódovány rychle se vyvíjející genovou skupinou.

$\alpha_{s1}$ -kasein se skládá z 214 aminokyselin u každého druhu. Byla popsána řada variant  $\alpha_{s1}$ -kaseinu. Zatímco u skotu je známo osm proteinových variant  $\alpha_{s1}$ -kaseinu, které jsou klasifikovány od A do H, nejběžnější jsou B a C, ovčí  $\alpha_{s1}$ -kasein existuje jako řada odlišných genetických variant v heterozygotních i homozygotních formách. Primární struktura variant A, C a D se od sebe liší aminokyselinovými zastoupením a stupněm fosforylace (Selvaggi et al., 2014).

#### 3.3.1.2 $\alpha_{s2}$ -kasein (CSN1S2)

Kaseiny  $\alpha_{s2}$  představují rozmanitější skupinu vysoce fosforylovaných peptidů než  $\alpha_{s1}$ -kaseiny.  $\alpha_{s2}$ -kasein (kódovaný genem CSN1S2) na rozdíl od ovčího mléka nebyl v lidském mléce dosud zjištěn (Selvaggi et al., 2014). Z kaseinových frakcí v ovčím mléce má  $\alpha_{s2}$ -kasein největší heterogenitu, vyskytuje se v mnoha různě fosforylovaných variantách. Jsou popsány dvě formy proteinu s delecí 9 aminokyselin. První forma na pozicích 34 až 42 a ve druhé na pozicích 35 až 43. Deleci způsobuje nepřítomnost některých dalších uhlovodíkových zbytků (Trujillo et al., 2000).

#### 3.3.1.3 $\beta$ -kasein (CSN2)

$\beta$ -kasein obsahuje 55 % přítomného dusíku, je proto významnou frakcí ovčího mléka.  $\beta$ -kasein kravského mléka obsahuje pouze 36 % přítomného dusíku (Molik et al., 2012).  $\beta$ -kasein se v ovčím mléce vyskytuje ve dvou různých variantách, které se opět liší mírou fosforylace (Trujillo et al., 2000).

#### 3.3.1.4 $\kappa$ -kasein (CN, CSN3)

$\kappa$ -kasein se v ovčím mléce vyskytuje v několika frakcích o stejném peptidovém řetězci, ale s jiným uhlovodíkovým zbytkem, který se liší mírou glykosylace (Trujillo et al., 2000).  $\kappa$ -kasein představuje asi 15 % ze všech kaseinů a obsahuje cystein. Skládá se ze 169

aminokyselinových zbytků a má klíčovou roli v micelární struktuře a procesu srážení (Selvaggi et al., 2014).

### 3.3.2 Syrovátkové bílkoviny ovčího mléka

Syrovátkové proteiny tvoří 17 až 22 % bílkovin. Syrovátkové bílkoviny jsou skupinou proteinů, které zůstávají rozpustné v mléčném séru nebo syrovátce po kyselém srážení kaseinů při pH 4,6 a 20 ° C i po srážení syřidlem.

#### 3.3.2.1 $\alpha$ -laktalbumin ( $\alpha$ -LA)

Mezi dvě syrovátkové bílkoviny v mléce přežvýkavců, které jsou syntetizovány uvnitř vemene, patří  $\alpha$ -laktalbumin ( $\alpha$ -LA). Jsou pevně spojeny v klastru 250 kb na ovčím chromozómu 6 (OAR6). LALBA a LGB geny jsou oba lokalizovány na ovčím chromozómu 3 (Giambra et al., 2014; Selvaggi et al., 2014).

$\alpha$ -laktalbumin stimuluje syntézu laktózy v mléčné žláze, je nezbytný pro biosyntézu laktózy v mléčné žláze a pro pohyb vody do sekrečních vezikul mléčných žláz a poté do alveolárního lumenu. Kromě toho je  $\alpha$ -laktalbumin bohatý na esenciální a podmíněně esenciální aminokyseliny, má vysoký obsah lysinu a cysteinu a zvláště vysoký obsah tryptofanu. Na rozdíl od ovčího mléka je  $\alpha$ -laktalbumin dominantním proteinem v lidském mléce (Selvaggi et al., 2014).  $\alpha$ -laktalbumin je velmi podobný jeho analogu v kravském mléce a existuje ve dvou variantách, z nichž jedna je velmi vzácná (Hejtmánková et al. 2012; Roginski et al., 2003).

#### 3.3.2.2 $\beta$ -laktoglobulin

Majoritní syrovátkovou bílkovinou ovčího mléka je  $\beta$ -laktoglobulin, který se v ovčím mléce vyskytuje ve třech variantách.

$\beta$ -laktoglobulin je odpovědný za nástup alergických reakcí na mléčnou bílkovinu, které postihují vysoké procento kojenců krmených náhradami mateřského mléka, vyrobených z kravského mléka (Selvaggi et al., 2014).

### 3.4 Výťažnost ovčího mléka při výrobě sýrů

Sýr je nesmírně složitý fyzikální, biochemický a mikrobiologický systém. Chemické složení sýra závisí na složkách obsažených v mléce, přidaných ingrediencích jako jsou enzymy a mléčné kultury a v neposlední řadě kontaminantech životního prostředí. Rozmanitost

chemických složek ovlivňuje zrání, patří k nim endogenní mléčné enzymy, mléčné koagulanty, přidané proteázy a lipázy, enzymové systémy bakterií a jiné mikroflóry (Hill, 1995).

Stěžejní pro výtěžnost sýrů je kvalita a obsah mléčných bílkovin, zejména kaseinů. Byly provedeny studie týkající se výtěžnosti při výrobě sýrů z bovinního mléka (Van Boekel, 1993). Ovčí mléko se sráží velmi dobře, je vhodné zejména pro výrobu kvalitních sýrů. Na rozdíl od kravského mléka sýření probíhá rychleji. Ke koagulaci v daném čase je při výrobě z ovčího mléka spotřeba syřidla nižší. Nicméně synereze trvá déle. Syřitelnost ovčího mléka tolik neovlivňuje teplota, jako je tomu u mléka kravského. Odlišnost chování mléka po záhřevu je přisuzována změně velikosti kaseinových micel (Roginski et al., 2003).

Ke zhoršení syřitelnosti mléka dochází, pokud dojde ke snížení hladiny koloidního vápníku a zároveň zvýšení obsahu kaseinu disociovaného do mléčného séra, popřípadě také hydrolyzou kaseinu působením plazminu nebo proteáz somatických buněk. Částečně může být toto zhoršení kompenzováno přidávkem  $\text{CaCl}_2$  (McSweeney et al., 2007). V sýrařství se standardně přidává do koncentrace  $20 \text{ g.l}^{-1}$ , nejvíce pak  $30 \text{ g.l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ . Přidání vyšší dávky může zapříčinit hořknutí sýrů (Forman et al., 1996). Vápenaté kationty v mléce jsou pro výrobu sýrů nezbytné. Od určité koncentrace se váže vápník na kyselou část kaseinu (fosfoserin, asparagovou nebo glutamovou kyselinu). Dochází ke změně proporcí v kaseinové micle a vytváření větších agregátů a postupně je formován gel neboli sýřenina (Roginski et al., 2003). Výtěžnost sýrů při výrobě je definována jako počet kg sýra získaných ze 100 kg mléka nebo naopak počet kg mléka potřebných na výrobu 100 kg sýra. Protože se výtěžnost značně odvíjí od množství kaseinu v mléce, je vhodné vyjádřit počet kg sýra vyrobených z určitého počtu kg kaseinu (Van den Berg, 1993). Výtěžnost ovčího mléka je mezi 18 až 20 kg sýra ze 100 kg mléka, výtěžnost mléka kravského je průměrně 10 kg sýra. Vyšší výtěžnost ovčího mléka lze přičítat vysokému podílu sušiny. Sýry z nestandardizovaného ovčího mléka obsahují více tuku v sušině (Roginski et al., 2003). V praxi je maximální výtěžnost okolo 75 % z celkového obsahu bílkovin v mléce. Výtěžnost je značně ovlivněna také druhem mléka a složením kaseinů (Fox et al., 2004).



Ke stanovení teoretické výtěžnosti mléka je možné užít vzorce dle Van Slyka (Mullan, 2008):

$$Y = (0,93 F + C - 0,1) \times 1,091 - M$$

C – obsah kaseinu

F – obsah tuku

M – vlhkost sýra

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

Ze vzorce vyplývá, které parametry nejvíce ovlivňují výtěžnost. Ke stanovení výtěžnosti při výrobě sýrů je zásadní obsah parakaseinu, který vzniká jako štěp během srážení. Parakasein je komponenta, vznikající 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 díky ztrátám kaseinu během procesu složitě. Podle studií, činí ztráty kaseinu asi 5 až 6 %. Společně s parakaseinem je zachycena i část  $\beta$ -kaseinu a proteoso-peptonové frakce (Van Boekel, 1993).

### 3.4.1 Obsah genetické varianty proteinů

Ovce jsou druhým nejdůležitějším živočišným druhem, chovaným pro mléko, po krávě na světě, zejména v oblastech Středomoří a Středního východu. V méně rozvinutých zemích se postupně zvyšuje množství mléčných výrobků z ovčího mléka. Za účelem zlepšení mlékárenské produkce je nezbytné získat důkladné informace o kvalitě mléka a jeho reologických vlastnostech. Genetické polymorfizmy mléčných bílkovin jsou často spojeny s kvantitativními a kvalitativními parametry mléka a jsou potenciálními markery, které by měly být zahrnuty do šlechtitelských strategií podobných těm, které jsou již k dispozici pro skot (Selvaggi et al., 2014).

Ochotu mléka ke srážení a změnu vlastností mléka zapříčiňuje změna poměrů kaseinových frakcí. Pokud se mléko obohatí o  $\beta$ -kasein dojde ke zhoršení syřitelnosti a pro vyvolání srážení kaseinu je třeba přidat vápník. Takto vzniká tvrdší sýřenina, která obsahuje, oproti běžnému mléku méně vody a vápníku (St-Gelais et Haché, 2005). Zhoršenou syřitelnost způsobuje také zvýšení poměru  $\alpha_{s1}$ -kaseinu ku  $\beta$ -kaseinu (Forman et al., 1996).

Amigo et Racio (2000) porovnávali vliv genetického polymorfismu v bílkovinách ovčího mléka včetně heterogenity a jejich vztahů k technologickým vlastnostem mléka. V kaseinové

frakci byla velká heterogenita určena buď přítomností různých genetických variant, nebo jiných faktorů, jako je hladina fosforylace a koexistence proteinových forem s různou délkou řetězce. V syrovátce jsou pro  $\beta$ -laktoglobulin (b-LG) popsány tři genetické varianty (A, B a C) a dvě pro  $\alpha$ -laktalbumin (a-LA). AA genotyp z b-LG se jevil jako mnohem efektivnější při výrobě sýrů než ostatní genotypy b-LG. Varianta  $\alpha_{S1}$ -CN D je i ve spojení s ostatními považována za škodlivou pro ovčí mléko, neboť se zdá, že snižuje skutečný obsah kaseinu a zhoršuje technologické vlastnosti mléka. Mléko obsahující variantu  $\alpha_{S1}$ -CN CC vykazovalo nejlepší technologické vlastnosti díky vyššímu obsahu kaseinu (Amigo et al., 2000).

Podle Giambra et al. (2014) se významně lišily frekvence alel na úrovni proteinů mléka u různých plemen ovcí. Dále měl genotyp ovcí vliv na výtěžek mléka a obsahy bílkovin a tuku. Chybějící alely CSN1S1 \* A a D, u některých plemen ovcí, jsou spojeny s nižším obsahem bílkovin a/nebo tuků a horší syřitelností a vlastnostmi tvorby sýru (Giambra et al., 2014).

Moioli et al. (1998) uvádí, že polymorfismus DNA má vliv na dobu srážení mléka. Varianta A  $\beta$ -laktoglobulinu v mléce ovcí Manchega vykazovala lepší vlastnosti při výrobě sýrů, než varianta B. Naopak varianta B měla pozitivní vliv na dobu srážení mléka u italských mléčných ovcí. Alely korelovaly s celkovým obsahem dusíku, kaseinu a tuku. Genetické varianty kaseinu měly vliv na velikost a mineralizaci micel.

### 3.5 Metoda HPLC při stanovení proteinů

V oblasti jakosti potravin jsou zvláště vzhledem k sociálnímu a hospodářskému významu trhu s mléčnými výrobky zajímavé mléčné výrobky skotu. Existuje vysoké riziko podvodné manipulace, například nahrazení sušeného mléka syrovátkou, které je z ekonomického hlediska velmi zajímavé, proto je třeba mít k dispozici vhodnou analytické metody pro stanovení všech mléčných složek (Bordin et al., 2001).

Chromatografické metody mají rozsáhlé uplatnění v izolaci mléčných proteinů. Výhodou HPLC techniky je její rychlost, jednoduchost a možnost automatizace (Borková et Snášelová, 2005). Nicméně rozhodující faktor pro rozvoj HPLC je citlivost této metody. V dnešní době se vyvíjejí stále menší kolony s menším průměrem a nové typy stacionárních fází, které jsou schopny selektivně vázat určité typy analytu (Mitulovic et Mechter, 2006).

Analýza mléčných proteinů může být provedena pomocí reverzní fáze, výměnou iontů (jak aniontů, tak i kationtů), molekulovou permeační chromatografií i hydrofobní kapalinovou chromatografií (Borková et Snášelová, 2005).

HPLC reverzní fáze je technika chromatografické separace analytů na základě jejich hydrofobních vlastností (Borková et Snášelová, 2005). Tato technika je založená na interakci mezi vzorkem, hydrofobní stacionární fází a hydrofilní polární mobilní fází. Tento postup je nejpoužívanější separační technikou v proteomice (Mitulovic et Mechter, 2006). Kvantifikace druhů mlék se touto metodou provádí v rozsahu koncentrací proteinů 5 – 95 %. Touto metodou byla úspěšně stanovena pravost a množství jednotlivých druhů mlék v ovčích a kozích sýrech. Lze ji také využít k detekci přítomnosti kravského mléka v kozím mléce analýzou syrovátkových proteinů. Nevýhodou této metody je, že nezaznamená rozdíl mezi kozím a ovčím mlékem, jelikož jejich syrovátkové proteiny mají velmi podobné retenční časy (Borková et Snášelová, 2005).

Iontová chromatografie je metoda založená na separaci iontovou výměnou mezi mobilní a stacionární fází. Pro identifikaci pravosti kozích produktu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Podařilo se tak oddělit kaseiny kravského a kozího mléka. Vzorek byl ovšem negativně ovlivněn značnou proteolýzou, proto nebylo možné identifikovat příměsi. Touto metodou je možné, detekcí bovinního  $\alpha_{s1}$ -kaseinu, identifikovat kravské mléko v kozím mléce (Borková et Snášelová, 2005).

Separace látek hydrofobní interaktivní chromatografií probíhá v hydrofobní stacionární fází snížením iontové síly mobilní fáze. Tato metoda byla použita k separaci a stanovení  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ - a  $\kappa$ -kaseinu v kravském, kozím a ovčím mléce, jejich směsí a sýrů. Pokud je příměs jiného mléka v koncentraci alespoň 10 % nebo vyšší, lze touto metodou tuto příměs také stanovit (Borková et Snášelová, 2005).

Přístrojové vybavení pro HPLC výzkum v proteomice se neliší od běžného HPLC vybavení. Čerpací systémy, separační kolony a detektory používané pro detekci proteinů jsou používány také pro konvenční analýzu. Rozdíl je v rozměrech chromatografických kolon a parametrech stacionární fáze (Mitulovic et Mechter, 2006).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Chemikálie

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

- Acetonitril – CHROMASOLV® Plus pro HPLC, čistota  $\geq 99,9\%$
- Citran sodný, čistota  $\geq 99\%$
- Deionizovaná voda (odpor = 18,2 M $\Omega$ )
- Dithiotreitol (DTT) – řada BioUltra,  $c = 1 \text{ mol.dm}^{-3}$ , čistota p.a.
- Guanidin hydrochlorid, čistota  $\geq 99,5\%$
- Kyselina trifluoroctová (TFA) – řada ReagentPlus®, čistota  $\geq 99\%$
- $\alpha$ -kasein – lyofilizovaný prášek, čistota  $\geq 70\%$
- $\alpha$ -La - lyofilizovaný prášek, čistota  $\geq 85\%$
- $\beta$ -kasein – lyofilizovaný prášek, řada BioUltra, čistota  $\geq 98\%$
- $\beta$ -LgA - lyofilizovaný prášek, čistota  $\geq 90\%$
- $\beta$ -LgB - lyofilizovaný prášek, čistota  $\geq 90\%$
- $\kappa$ -kasein – lyofilizovaný prášek, čistota  $\geq 70\%$

### 4.2 Pomůcky

- Automatické pipety (100–1000  $\mu\text{l}$ )
- Běžné laboratorní sklo
- HPLC vialka (2 ml) (WATERS)
- Injekční stříkačky (2 ml)
- Acetát celulózové filtry s porozitou 0,45  $\mu\text{m}$ , Chromservis, Česká Republika

### 4.3 Přístroje

- Analytické váhy (Kern&Sohn GmbH, Německo)
- Centrifuga 5810R (Eppendorf, Německo)
- Filtrační přístroj na demineralizaci vody značky Millipore, s vodní vývěvou (Německo)
- Kapalinový chromatogram e2695 s PDA detektorem 996 (Waters Corporation, USA)
- Lednice (Candy, Itálie)
- Mrazicí box ( Liebherr Mediline, Německo)

- Ultrazvuková lázeň (Notus – Powersonic, Slovakia)
- Měřič somatických buněk De Laval cell counter (DCC De Laval International AB, Švédsko)

#### 4.4 Experimentální materiál

Bylo analyzováno ovčí mléko nadojené ve čtyřech různých farmách (F1, F2, F3 a F4) nacházejících se na různých místech České republiky. Na farmě F1 je chováno plemeno ovce východofříská (OVF) na farmě F2 a F3 je shodně chováno plemeno ovce Lacaune (OL), na farmě F4 ovce Romanovská (OR).

Bazénové vzorky mléka i vzorky mléka získané individuálním nádojem byly v průběhu laktačního období odebírány opakovaně. Vzorky mléka byly roztříděny do tří skupin podle počtu somatických buněk. Ty byly stanoveny ve Výzkumném ústavu mlékárenském, který zajišťoval odběr vzorku.

Individuální vzorky mléka zařazené do stejné skupiny byly slity a následně byly jednotlivé skupiny mlék analyzovány. Počty somatických buněk v jednotlivých skupinách byly následující  $< 500 \times 10^3$ ,  $500 - 1000 \times 10^3$  a  $> 1000 \times 10^3$ .

#### 4.5 Příprava vzorků

Na centrifuze Eppendorf 5810R rychlostí 12000 rpm (15 281 g) při teplotě 4 °C po dobu 10 minut bylo odstředěno přibližně 10 ml syrového nehomogenizovaného mléka. Následně bylo odstředěné mléko ponecháno 5 minut v mrazicím boxu (-20 °C) a poté bylo slito mléčné sérum (supernatan). K 0,5 ml mléčného séra bylo přidáno 2,5 ml pufru obsahujícího 6M guanidin-HCl, 20mM dithiothreitol a 5mM citran trisodný a naředěno deionizovanou vodou (7,5 ml). Po krátkém vortexování byl vzorek ponechán 1 hodinu inkubovat. Po uplynutí této doby byl vzorek opět krátce vortexován a následně přefiltrován přes membránový filtr (celulóza-acetát, 0,45 µm) do vialky. K filtraci každého vzorku bylo nutné použít nový mikrofiltr, neboť část vzorku se ve filtru zachytí, to je pravděpodobně jeden z důvodů, proč metoda neposkytuje 100% výtěžnost.

#### 4.6 Chromatografické podmínky

Analytická kolona: Vydac 214TP C4 5  $\mu\text{m}$  (průměr 2,1 mm, délka 150 mm), (Grace Discovery Sciences, USA)

Složení mobilní fáze A – H<sub>2</sub>O: acetonitril (10:90), (v/v) s podílem 0,1 % TFA

Složení mobilní fáze B – H<sub>2</sub>O: acetonitril (90:10), (v/v) s podílem 0,1 % TFA

Průtok mobilní fáze: 0,25 ml.min<sup>-1</sup>

Typ eluce: gradientová

Teplota chromatografické kolony: 40 °C

Objem analyzovaného vzorku: 10  $\mu\text{l}$

Doba analýzy: 71 minut

Podmínky detekce: detektor diodového pole (PDA), vlnová délka  $\lambda = 218 \text{ nm}$

Schéma gradientové eluce je uvedeno v tabulce č. 5.

Tabulka 5: Podmínky gradientové eluce

Čas (min)	Průtok (ml.min <sup>-1</sup> )	%A	%B	Typ 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
31	0,25	63,9	36,1	2
39	0,25	62,2	37,8	6
52	0,25	58,7	41,3	11
63	0,25	56,7	43,3	11
66	0,25	56,7	43,3	6
69	0,25	78,5	21,5	6
71	0,25	78,5	24,5	6

Kalibrační křivky byly vytvořeny podle analyzovaných standardů kaseinu i syrovátkových bílkovin, standardy byly rozpuštěny ve výše uvedeném pufru. Všechny kalibrační křivky byly

ve zvoleném koncentračním rozsahu lineární. Koncentrační rozsah byl vybrán podle očekávaných hodnot sledovaných analytů v mléce (korelační koeficient  $R = 0,972 - 0,999$ ). Nejnižší hodnota korelačního koeficientu odpovídá kalibrační závislosti  $\kappa$ -kaseinu. Meze stanovitelnosti (LOQ) a detekce (LOD) pro jednotlivé bílkovinné frakce jsou uvedeny v tabulce č. 6.

*Tabulka 6: Meze detekce a stanovitelnosti sledovaných analytů*

<b>Bílkovinná frakce</b>	<b>Symbol</b>	<b>LOD [mg.ml<sup>-1</sup>]</b>	<b>LOQ [mg.ml<sup>-1</sup>]</b>
$\alpha_{S1}$ -kasein	$\alpha_{S1}$ -CN	0,02	0,07
$\alpha_{S2}$ -kasein	$\alpha_{S2}$ -CN	0,05	0,17
$\beta$ -kasein	$\beta$ -CN	0,05	0,17
$\kappa$ -kasein	$\kappa$ -CN	0,02	0,07
$\alpha$ -laktalbumin	$\alpha$ -LA	0,03	0,1
$\beta$ -laktoglobulin A	$\beta$ -Lg A	0,03	0,1
$\beta$ -laktoglobulin B	$\beta$ -Lg B	0,02	0,07

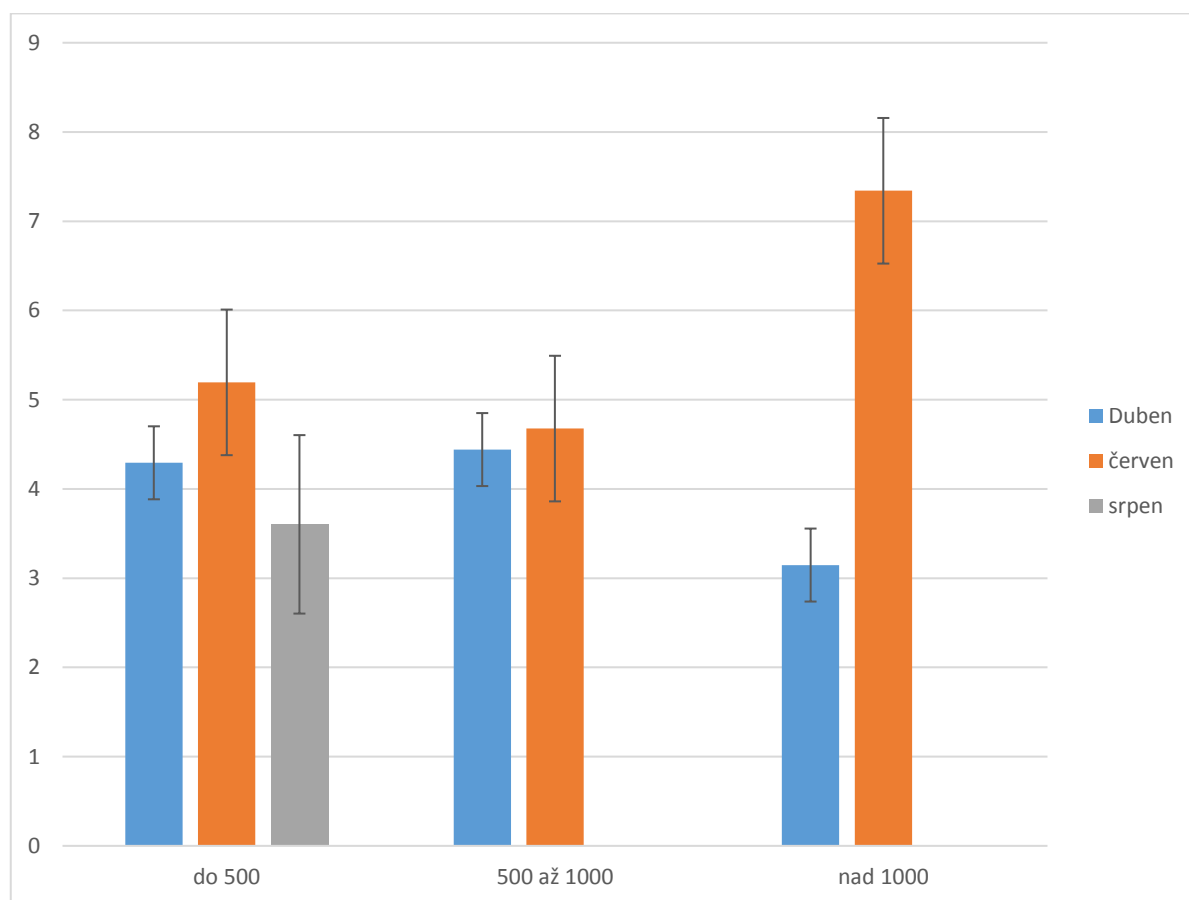
#### 4.7 Statistické zhodnocení

Výsledky byly statisticky zhodnoceny v programu Minitab16. Ze vzorků mléka byly vypočteny základní statistické charakteristiky (aritmetický průměr a směrodatná odchylka). Každý parametr ( $\alpha$ 1-CN,  $\alpha$ 2-CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\alpha$ LA,  $\beta$ -LgA a  $\beta$ -LgB) byl otestován, zda má normální rozložení a podle toho byl následně použit vhodný statistický test. Dále byl podle těchto výsledků použit Kruskal-Wallisův test nebo test variace rozptylu ANOVA.

### 5 Výsledky

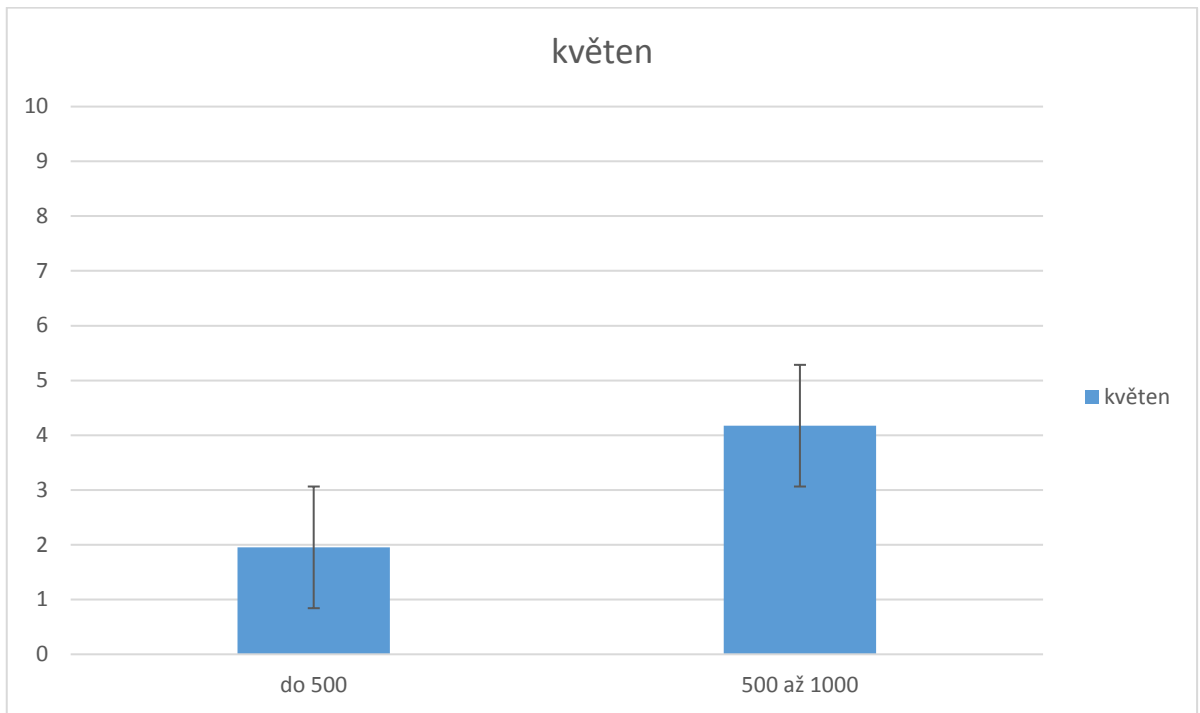
V grafech č. 1 a 2 je znázorněno celkové množství bílkovin v analyzovaných vzorcích ovčího mléka na jednotlivých farmách. Vzorky jsou rozděleny do skupin podle počtu somatických buněk. V grafu č. 3 je znázorněno celkové množství bílkovin v bazénových vzorcích mléka. Celkový obsah bílkovin je udán jako součet obsahu jednotlivých bílkovinných frakcí stanovených metodou HPLC.

Graf 1: Celkový obsah bílkovin v mléce ( $g \cdot 100 ml^{-1}$ ) dle počtu somatických buněk, farma F1

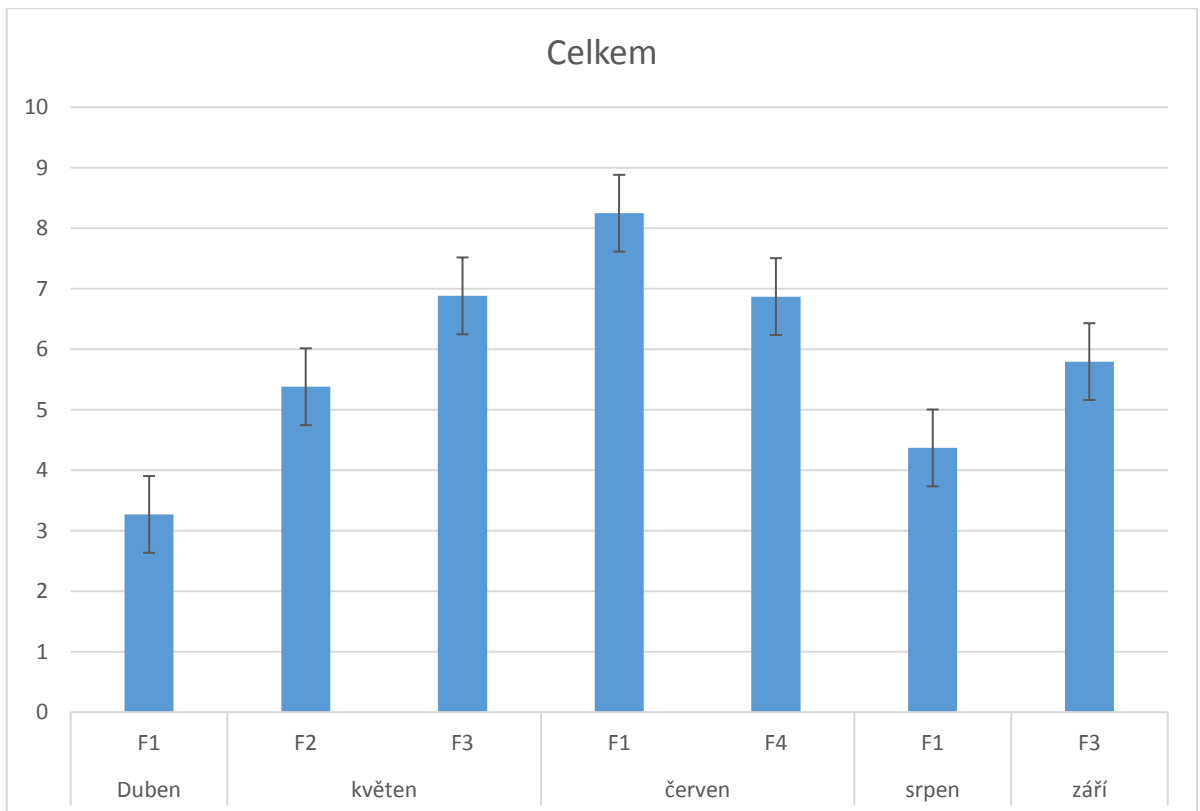




Graf 2: Celkový obsah bílkovin v mléce ( $\text{g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ ) dle počtu somatických buněk, farma F3



Graf 3: Celkový obsah bílkovin v mléce ( $\text{g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ ) v bazénových vzorcích mléka



Procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí dohromady s procentuálním zastoupením kaseinového podílu a vypočteného celkového množství bílkovin ve všech analyzovaných vzorcích ovčího mléka je uvedeno v tabulkách č. 7 a 8.

Tabulka 7: Zastoupení bílkovin a bílkovinných frakcí v ovčím mléku

Farma	Plemeno	Počty SB(x10 <sup>3</sup> )	měsíc	CN suma (g/100ml)	W suma (g/100ml)	α <sub>s1</sub> -CN (%)	α <sub>s2</sub> -CN (%)	β-CN (%)	κ-CN (%)	α-LA (%)	β-LgA (%)	β-LgB (%)	Σ CN (%)	Σ Proteiny g/100 ml
F1	OVF	nad 1000	duben	2,66	0,49	27,77	0,45	57,36	14,42	48,70	39,32	11,98	84,39	3,15
				0,17	0,03	0,50	0,12	1,50	1,11	1,22	2,74	1,63	2,03	0,18
F1	OVF	do 500	duben	3,64	0,65	29,42	16,66	44,79	9,13	44,71	40,28	15,01	84,88	4,29
				0,26	0,07	0,20	0,29	0,67	0,36	7,90	5,21	13,00	1,53	0,37
F1	OVF	500 až 1000	duben	3,78	0,66	38,04	0,53	41,44	19,99	26,48	63,75	9,77	85,17	4,44
				0,03	0,04	1,38	0,18	1,65	0,43	1,37	1,26	1,49	1,07	0,02
F3	OL	500 až 1000	květen	3,69	0,49	29,36	13,07	46,44	11,14	41,02	51,30	7,68	88,25	4,17
				0,19	0,04	0,48	0,13	1,08	1,10	3,96	2,99	6,82	1,59	0,19

Tabulka 7: Pokračování

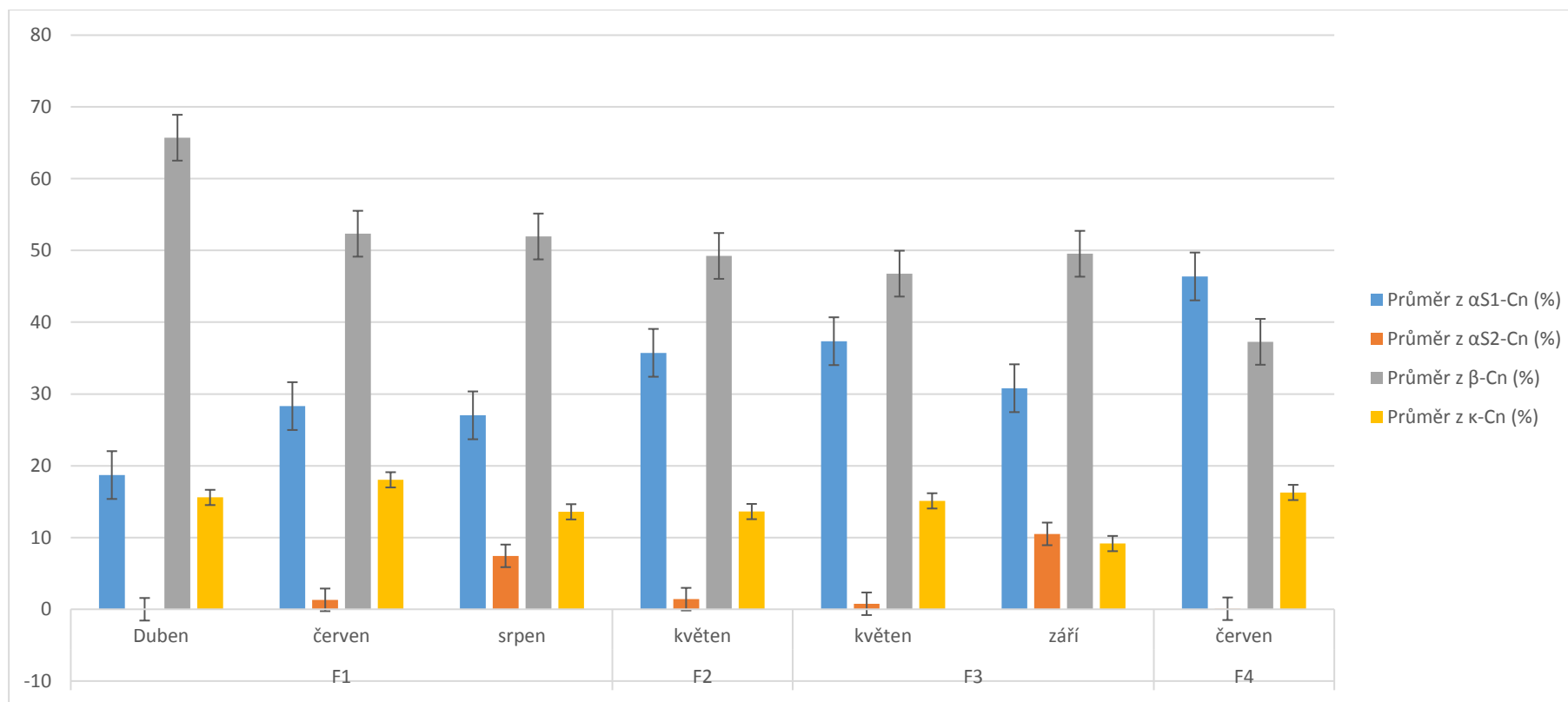
Farma	Plemeno	Počty SB(x10 <sup>3</sup> )	měsíc	CN suma (g/100ml)	W suma (g/100ml)	α <sub>s1</sub> -CN (%)	α <sub>s2</sub> -CN (%)	β-CN (%)	κ-CN (%)	α-LA (%)	β-LgA (%)	β-LgB (%)	Σ CN (%)	Σ Proteiny g/100 ml
F1	OVF	nad 1000	červen	6,75	0,60	37,36	0,77	46,77	15,11	74,62	25,38	0,00	92,72	6,88
smodch				0,83	0,02	0,15	0,01	0,64	0,50	1,39	1,39	0,00	1,28	1,06
F1	OVF	do 500	červen	3,68	1,51	42,79	0,38	34,62	22,21	35,69	64,31	< LOD 1	70,85	5,19
smodch				0,11	0,15	1,31	0,02	1,89	0,98	5,81	5,81	< LOD 1	3,16	0,05
F1	OVF	500 až 1000	červen	3,49	1,19	34,94	0,60	40,42	24,05	45,44	54,56	< LOD 1	74,62	4,68
smodch				0,13	0,05	0,43	0,02	0,22	0,37	0,36	0,36	< LOD 1	1,76	0,12
F3	OL	do 500	květen	1,60	0,35	26,51	15,05	46,63	11,80	40,67	46,76	12,57	82,02	1,95
smodch				0,12	0,06	1,14	0,66	0,52	1,02	8,48	2,49	10,92	4,41	0,07
F1	OVF	do 500	srpen	3,21	0,40	29,68	13,89	47,33	9,10	87,10	< LOD 1	12,90	88,73	3,60
smodch				0,46	0,05	1,34	0,85	2,19	0,17	11,92	< LOD 1	11,92	2,88	0,55

Tabulka 8: Zastoupení bílkovin a bílkovinných frakcí v ovčím mléku v bazénových vzorcích

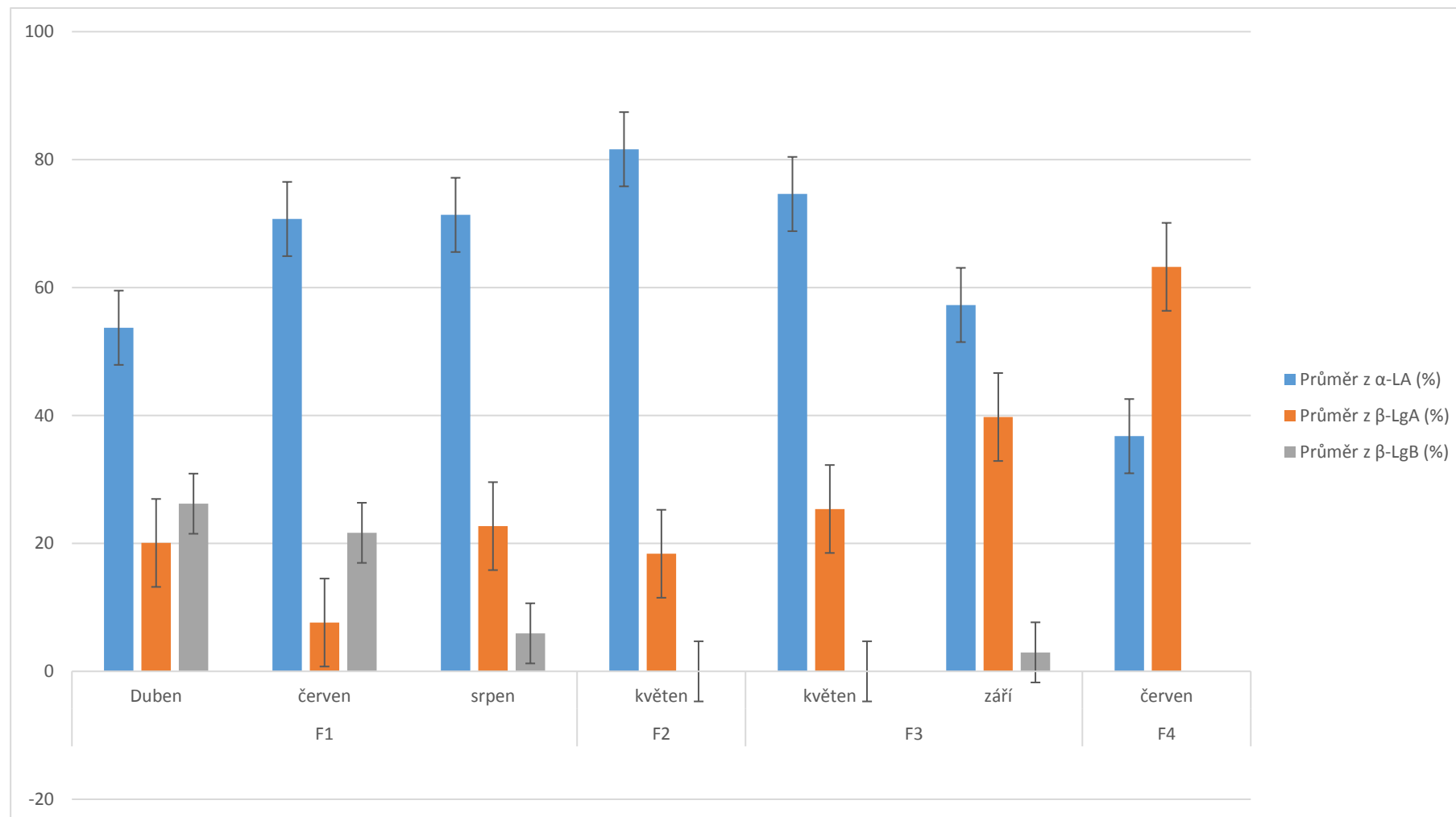
Farma	Plemeno	měsíc	CN suma (g/100ml)	W suma (g/100ml)	$\alpha_{S1}$ -CN (%)	$\alpha_{S2}$ -CN (%)	$\beta$ -CN (%)	$\kappa$ -CN (%)	$\alpha$ -LA (%)	$\beta$ -LgA (%)	$\beta$ -LgB (%)	$\Sigma$ CN (%)	$\Sigma$ Proteiny g/100 ml
F1	OVF	duben	2,70	0,57	18,70	0,00	65,71	15,59	53,72	20,08	26,21	82,58	3,27
smodch			0,14	0,03	4,57	0,00	3,57	1,06	1,36	4,21	2,86	0,12	0,20
F2	OL	květen	4,73	0,65	35,74	1,41	49,24	13,62	81,62	18,38	0,00	87,99	5,38
smodch			0,17	0,02	0,28	0,06	0,11	0,22	0,92	0,92	0,00	0,62	0,21
F3	OL	květen	6,39	0,49	37,36	0,77	46,77	15,11	74,62	25,38	0,00	92,72	6,88
smodch			1,07	0,01	0,18	0,02	0,78	0,61	1,70	1,70	0,00	1,57	1,30
F4	OR	červen	5,64	1,24	46,38	0,07	37,27	16,28	36,76	63,24	< LOD 1	81,96	6,87
smodch			0,02	0,01	0,71	0,03	0,88	0,21	2,42	2,42	< LOD 1	0,11	0,03
F1	OVF	červen	7,60	0,65	28,31	1,32	52,33	18,04	70,71	7,63	21,66	91,97	8,25
smodch			0,65	0,13	4,18	0,18	4,95	1,00	0,84	1,05	1,86	2,66	0,63
F1	OVF	srpen	3,22	0,30	23,20	14,46	50,67	11,67	71,04	28,96	0,00	91,53	3,52
smodch			0,06	0,01	0,12	1,11	0,62	1,82	3,69	3,69	0,00	0,47	0,06
F1	OVF	srpen	4,68	0,54	30,85	0,43	53,23	15,49	71,68	16,44	11,88	87,33	5,22
smodch			2,22	0,05	3,39	0,04	2,91	1,43	0,70	2,76	2,55	7,26	2,66
F3	OL	září	5,10	0,69	30,80	10,50	49,54	9,16	57,28	39,76	2,96	88,00	5,80
smodch			0,24	0,02	0,64	0,21	0,57	0,19	1,48	1,37	2,61	0,89	0,28

Graf č. 4 znázorňuje procentuální zastoupení jednotlivých kaseinových bílkovin z celkového množství přítomného kaseinu v bazénových vzorcích mléka. Vzorky jsou rozděleny podle původu a fáze laktace. V grafu č. 5 je znázorněno procentuální zastoupení jednotlivých stanovených syrovátkových bílkovin z jejich celkového vypočteného množství ve stejných bazénových vzorcích.

*Graf 4: Zastoupení jednotlivých frakcí kaseinových bílkovin (%) v celkovém množství kaseinových bílkovin v bazénových vzorcích, dle farem a fáze laktace*

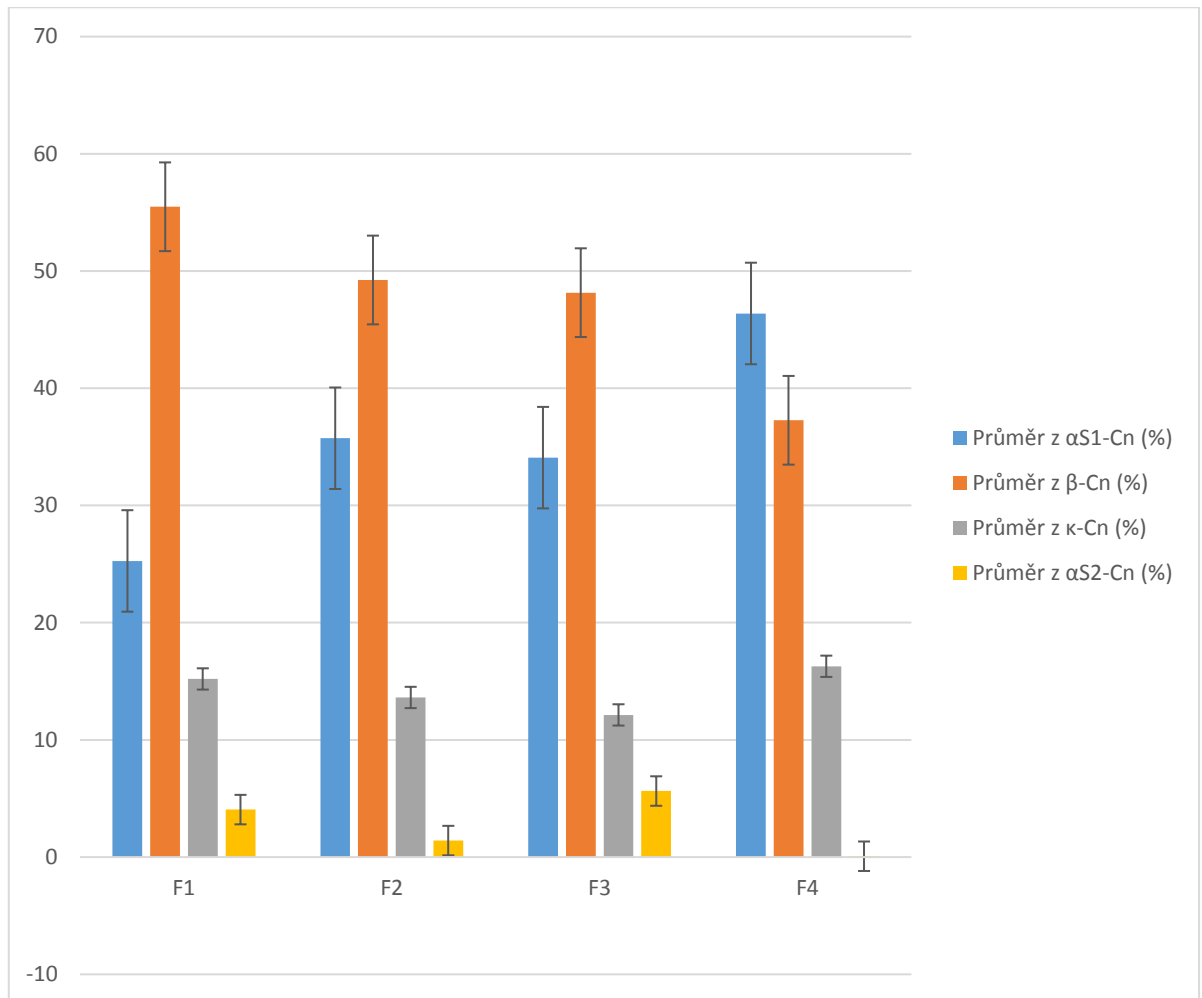


Graf 5: Zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin (%) v celkovém množství syrovátkových bílkovin v bazénových vzorcích, dle farem a dle fáze laktace

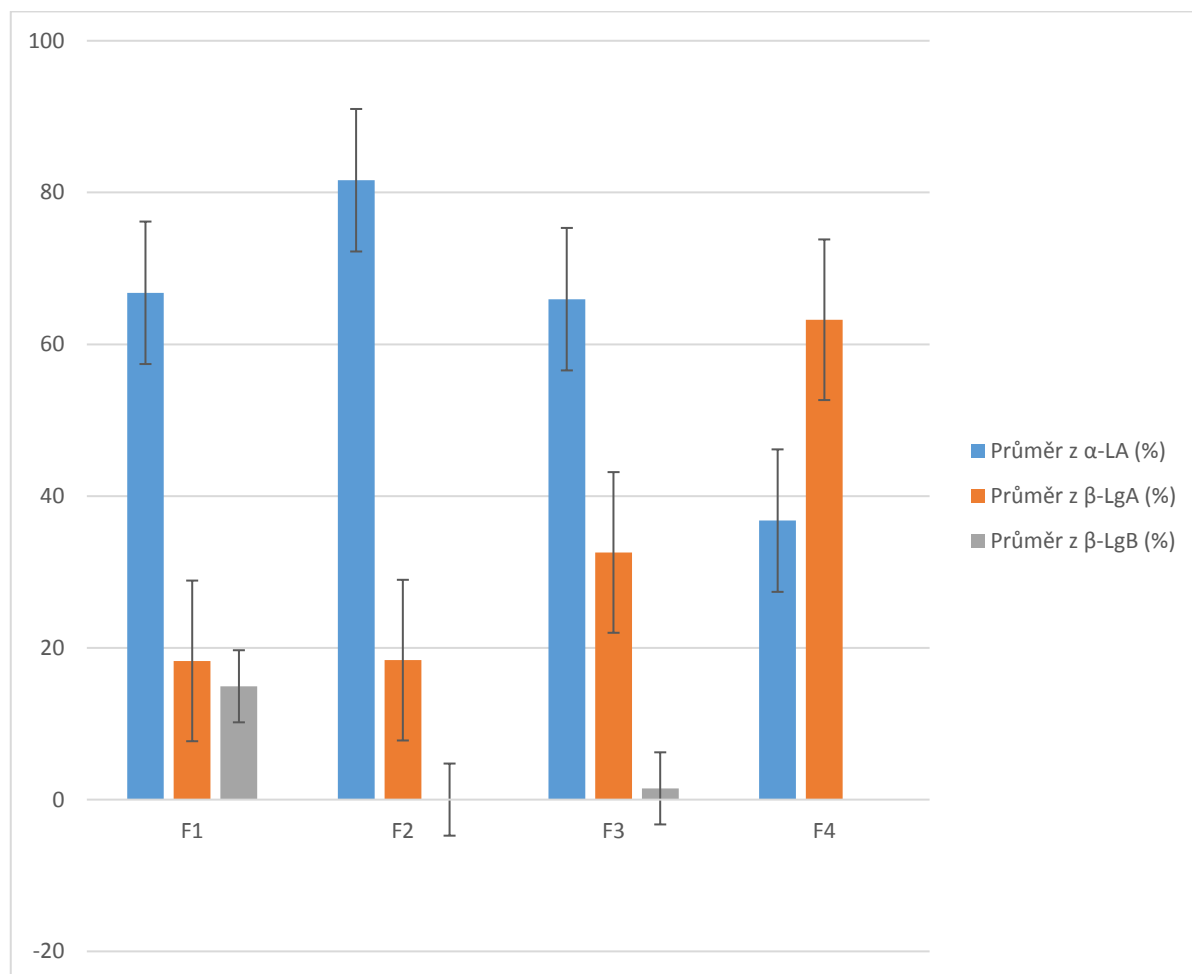


Graf č. 6 znázorňuje průměrné zastoupení jednotlivých frakcí kaseinových bílkovin z celkového množství stanoveného kaseinu v bazénových vzorcích mléka za celé období laktace. Vzorky mlék jsou rozděleny podle farmy, ze které pochází. Zastoupení jednotlivých frakcí z celkového množství syrovátkových bílkovin v bazénových vzorcích ukazuje graf č. 7.

*Graf 6: Průměrné zastoupení jednotlivých frakcí kaseinových bílkovin (%) v bazénových vzorcích mléka, dle farem*



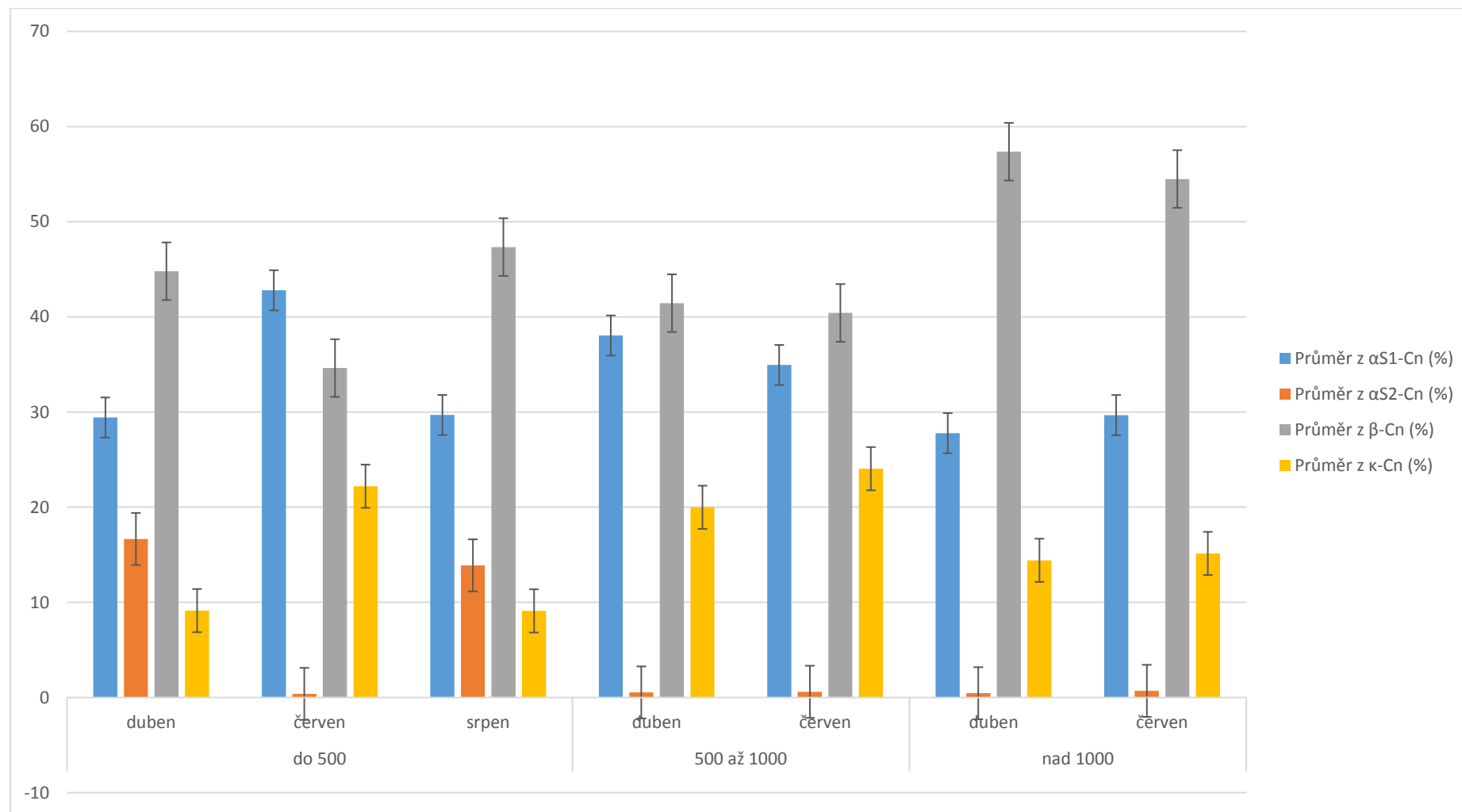
Graf 7: Průměrné zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin (%) v bazénových vzorcích mléka, dle farem



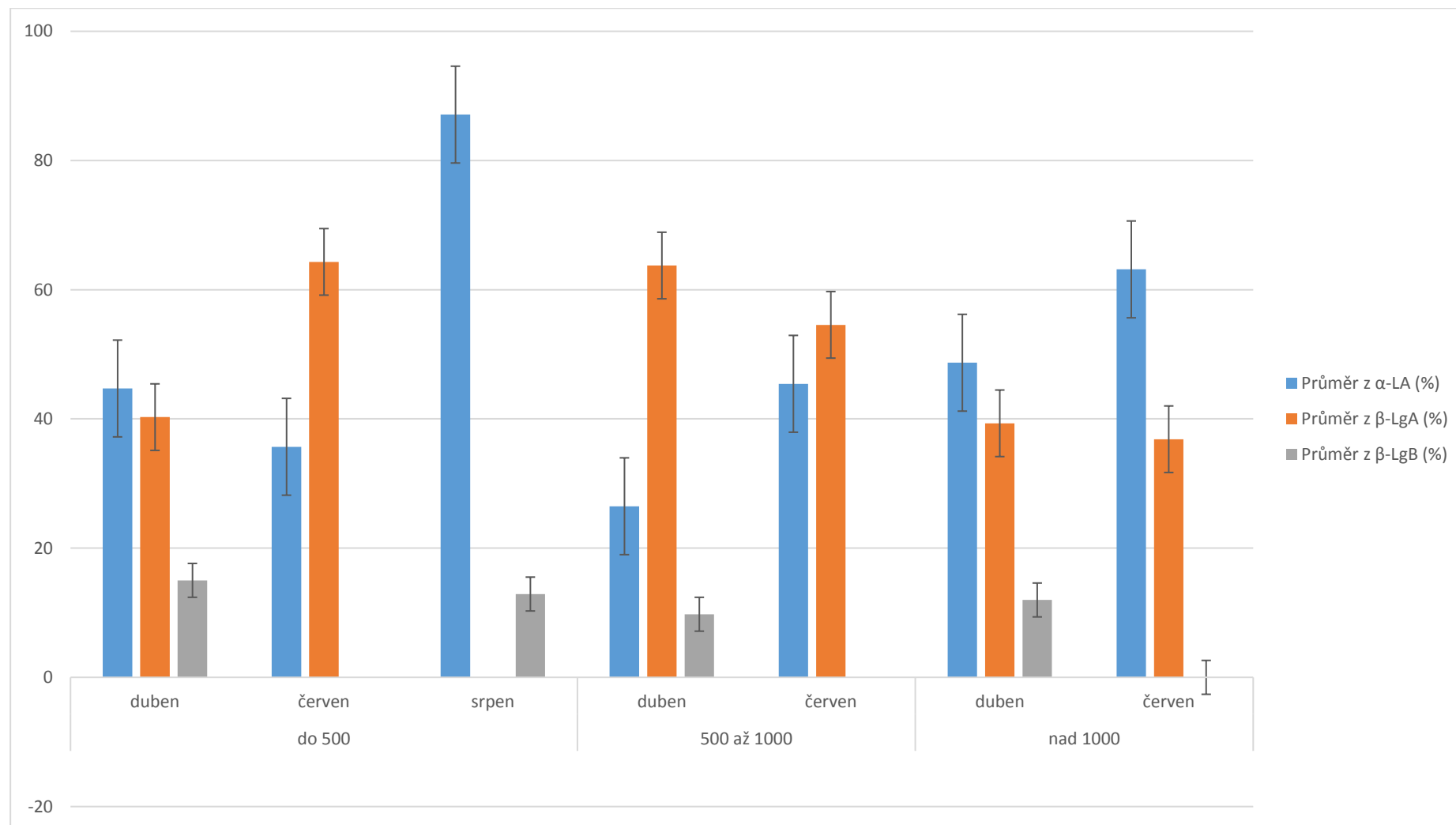
V grafech č. 8 a 10 je znázorněno procentuální zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkového množství kaseinu ve vztahu k počtu somatických buněk v průběhu laktačního období. Grafy č. 9 a 11 znázorňují procentuální zastoupení jednotlivých syrovátkových frakcí z celkového obsahu syrovátkových bílkovin ve vztahu k počtu somatických buněk.



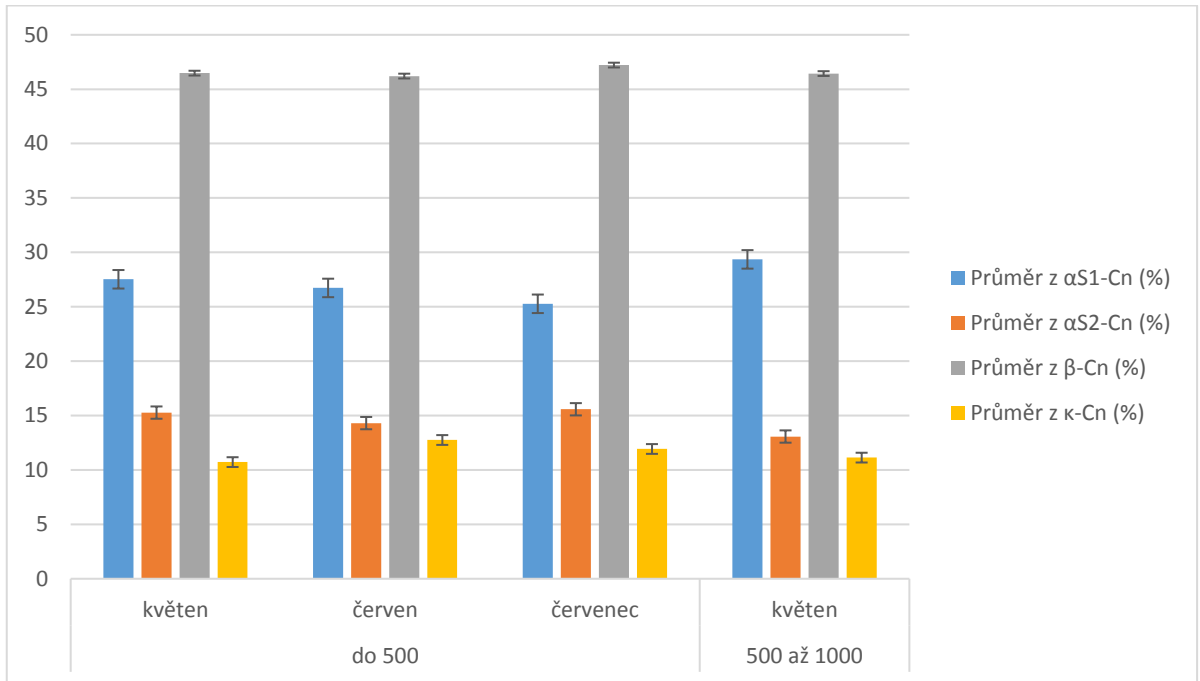
Graf 8: Procentuálního zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí k počtu somatických buněk (F1)- % z celkového množství kaseinu



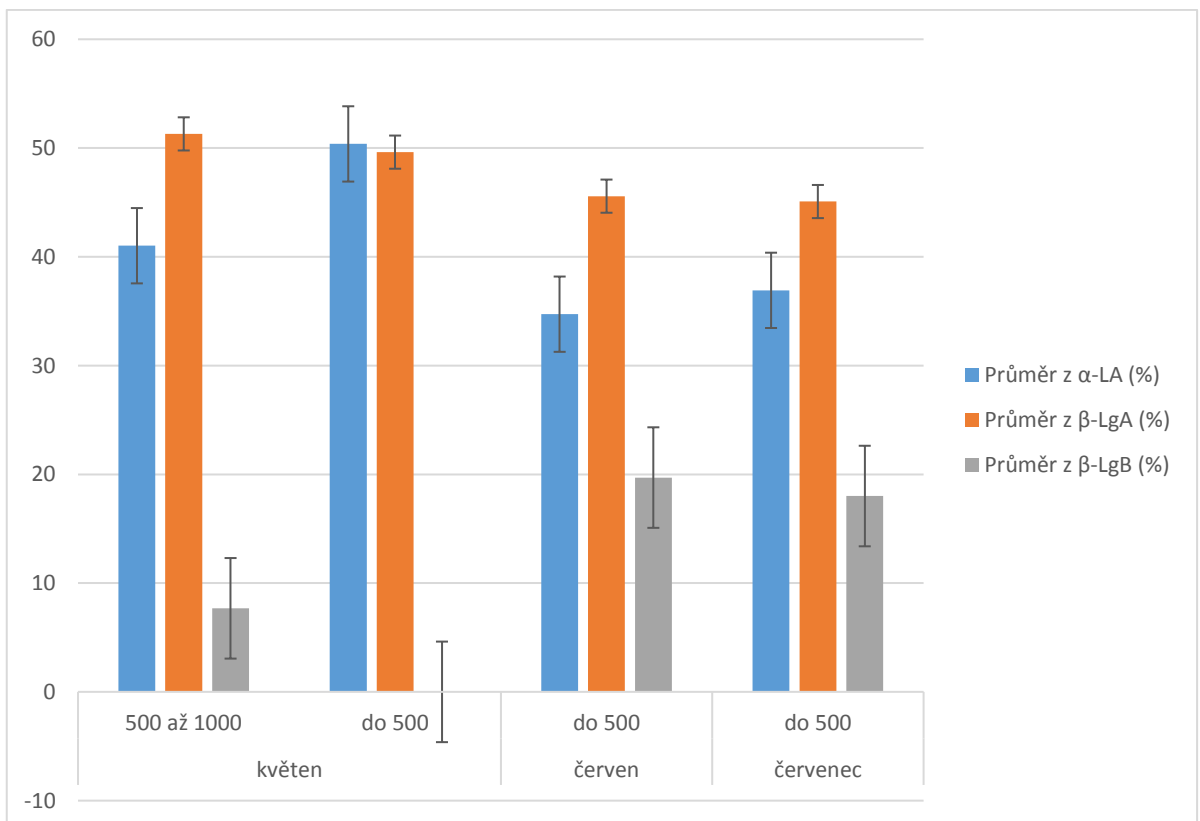
Graf 9: Zastoupení jednotlivých syrovátkových frakcí k počtu somatických buněk (F1)- % z celkového množství syrovátkových bílkovin



Graf 10: Zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí k počtu somatických buněk (F3)- % z celkového množství kaseinu



Graf 11: Zastoupení jednotlivých syrovátkových frakcí k počtu somatických buněk (F3)- % z celkového množství syrovátkových bílkovin



## 5.1 Statistické zhodnocení

### 5.1.1 Důkaz hypotézy H1: Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce se liší během laktace

H1: Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce se liší během laktace.

Pro frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LgA a  $\beta$ -LgB, jejichž hodnoty procentuálního zastoupení neodpovídají normálnímu rozložení (příloha č. 1) byl pro důkaz hypotézy použit neparametrický test dle metody Kruskal-Wallis, jako potvrzení či zamítnutí nulové hypotézy, že mediány hodnot procentuálního zastoupení jednotlivých frakcí budou během různých období laktace stejné.

Pro hodnoty procentuálního zastoupení frakcí  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA, které odpovídají normálnímu rozložení, byl k důkazu hypotézy použit statistický test ANOVA pro porovnání průměrů hodnot procentuálního zastoupení frakcí. Jako potvrzení či zamítnutí nulové hypotézy, že průměry hodnot procentuálního zastoupení jednotlivých frakcí budou během různých období laktace stejné.

Nulová hypotéza byla zamítnuta pro hodnoty frakcí  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN a  $\beta$ -LgA ( $P < 0,05$ ). Mediány hodnot bílkovinných frakcí  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN a  $\beta$ -LgA rozdělené podle měsíců budou s 95% pravděpodobností vždy rozdílné.

Nulová hypotéza se potvrdila pro hodnoty frakcí  $\beta$ -CN a  $\beta$ -LgB ( $P > 0,05$ ).

Mediány hodnot bílkovinných frakcí  $\beta$ -CN a  $\beta$ -LgB rozdělené podle měsíců budou s 95% pravděpodobností stejné nebo velmi blízké.

Pro bílkovinné frakce  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA (odpovídajících normálnímu rozložení) bylo třeba k ověření hypotézy H1 použít test ANOVA.

Nulová hypotéza byla zamítnuta ( $P < 0,05$ ). Průměrné hodnoty pro bílkovinné frakce  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA jsou s 95% pravděpodobností v různých měsících vždy rozdílné.

Z toho vyplynulo, že hypotéza H1 "Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce se liší během laktace" se:

- Nepotvrdila pro bílkovinné frakce  $\beta$ -CN a  $\beta$ -LgB.
- Potvrdila pro bílkovinné frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LgA,  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA.

Více viz. Příloha č. 2.

### 5.1.2 *Důkaz hypotézy H2: Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce různých plemen je odlišné*

H2: Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce různých plemen je odlišné.

Pro potvrzení či zamítnutí nulové hypotézy, že mediány hodnot jednotlivých bílkovinných frakcí  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LgA a  $\beta$ -LgB všech plemen budou stejné, byl použit neparametrický test Kruskal-Wallis (stejně jako u důkazu hypotézy H1, protože tyto frakce neodpovídají normálnímu rozložení (příloha č. 1)).

Nulová hypotéza byla zamítnuta pro frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -LgA a  $\beta$ -LgB ( $P < 0,05$ ). Mediány hodnot procentuálního zastoupení bílkovinných frakcí  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -LgA a  $\beta$ -LgB rozdělené podle měsíců budou s 95% pravděpodobností vždy rozdílné.

Nulová hypotéza se potvrdila pro bílkovinné frakce  $\kappa$ -CN a  $\beta$ -CN, ( $P > 0,05$ ). Mediány hodnot procentuálního zastoupení bílkovinných frakcí  $\kappa$ -CN a  $\beta$ -CN rozdělené podle měsíců budou s 95% pravděpodobností stejné nebo velmi blízké.

Pro hodnoty bílkovinných frakcí  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA (odpovídajících normálnímu rozložení) bylo třeba k ověření hypotézy H2 použít test ANOVA.

Nulovou hypotéza byla zamítnuta pro frakci  $\alpha_{s1}$ -CN ( $P < 0,05$ ). Průměrný obsah frakce  $\alpha_{s1}$ -CN v mléce jednotlivých plemen bude s 95% pravděpodobností vždy rozdílný.

Nulová hypotéza se potvrdila pro frakci  $\alpha$ LA ( $P > 0,05$ ). Průměrný obsah frakce  $\alpha$ LA u jednotlivých plemen bude s 95% pravděpodobností stejný nebo podobný.

Z toho vyplynulo, že hypotéza H2 "Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce různých plemen může být odlišné" se:

- Nepotvrdila pro bílkovinné frakce  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -CN a  $\alpha$ LA.
- Potvrdila pro bílkovinné frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -LgA,  $\beta$ -LgB a  $\alpha_{s1}$ -CN.

Více viz. Příloha č.3.

## 6 Diskuze

Celkový obsah bílkovin v ovčím mléce se pohyboval v intervalu 1,95 – 8,25 g/100 ml mléka. Nejnižší celkový obsah bílkovin ( $1,95 \pm 0,07$  g/100 ml) byl obsažen ve vzorku odebraném v červenci na farmě F3. Aganga et al. (2002) ve své studii uvádí celkový obsah bílkovin v ovčím mléce v rozmezí 4,27 – 7,19 g/100 g. Rozdíl mezi výsledky od Aganga et al. a výsledky této studie může být způsoben tím, že výzkum byl prováděn na jiném plemenu ovcí, žijících v jiném podnebí. Dále Dragounová et al. (2005) ve své práci uvádí obsah bílkovin v ovčím mléce v rozmezí 3,32 – 5,82 %. Podobný průměrný obsah bílkovin v ovčím mléce (5,9 %), udává ve své práci také Pavič et al. (2002). Klimešová et al. (2015) zjistili průměrně vyšší obsah, a to 6,84 %. V této studii se zjištěné hodnoty obsahu bílkovin v mléce pohybují v intervalu hodnot udávaných v jiných studiích.

Nejvyšší celkový obsah bílkovin ( $8,25 \pm 0,63$  g/ 100 ml) byl stanoven v bazénovém vzorku mléka plemene ovce OVF v červnu. V bazénových vzorcích ovčího mléka dalších plemen, odebraných v různých fázích laktace, se celkový obsah bílkovin nacházel v intervalu 5,38 – 6,88 g/100 ml mléka. Což je v dobré shodě s literárními údaji (Pavič et al., 2002; Klimešová et al., 2015). Zároveň vzorky z farem F1 a F4 (plemena OVF a OR) obsahovaly průměrně nejvíce bílkovin v měsíci červnu a na začátku a na konci laktace byl obsah nižší. V této práci je to dobře zřejmé u bazénových vzorků. Celkový obsah kaseinu se v mléce pohyboval mezi 2,66 – 7,6 g/100 ml. Pro srovnání Aganga et al. (2002) uvádí podobný rozsah obsahu kaseinu v ovčím mléce v intervalu 2,66 – 6,25 g/100 g.

Zastoupení všech kaseinových frakcí v bílkovinách ovčího mléka se pohybovalo v rozmezí 70,85 – 92,72 %. Nejvyšší průměrné zastoupení kaseinu v mléčných bílkovinách bylo  $92,72 \pm 1,57$  %, jednalo se o bazénový vzorek mléka plemene OL. Průměrné zastoupení kaseinu v bazénovém vzorku mléka plemene OVF bylo  $89 \pm 4,5$  %, v bazénovém vzorku mléka plemene OL bylo  $88 \pm 3,5$  %. V bazénovém vzorku plemene OL, odebraném v květnu na farmě F3 bylo procentuální zastoupení kaseinu  $90,35 \pm 2,8$  %. Borková a Snášelová (2005) ve své práci uvádějí průměrný obsah kaseinu 81,25 %, tedy o něco méně.

S výjimkou mléka plemene OR byl ze všech kaseinových bílkovin nejvíce zastoupen  $\beta$ -kasein. Procentuální zastoupení kaseinu, jednotlivých kaseinových frakcí a stejně tak celkový obsah bílkovin v ovčím mléce, vykazovalo určitou míru variability v průběhu laktačního období

u stejného plemene chovaném na různých farmách. Složení mléka bylo nejspíše ovlivněno individuálními podmínkami chovu na těchto farmách. Výsledky analýz vzorků mléka z farmy F1 na které je chováno plemeno OVF, ukazují, že z jednotlivých frakcí byl po celou dobu laktace nejvíce zastoupen  $\beta$ -CN následován  $\alpha_{s1}$ -CN. Vzorky mléka z farmy F2 a F3 vykazovaly stejný trend. Naopak tomu bylo na farmě F4 kde chovají plemeno ovce OR.

Mléko plemene OR vykazovalo nejvyšší zastoupení  $\alpha_{s1}$ -kaseinu  $46,38 \pm 0,71$  % a zároveň nejnižší zastoupení  $\beta$ -kaseinu  $37,27 \pm 0,88$  % (poměr  $\alpha_{s1}$ -kaseinu ku  $\beta$ -kaseinu 1,2:1). Zvýšený poměr  $\alpha_{s1}$ -kaseinu ku  $\beta$ -kaseinu způsobuje podle Formana et al. (1996) zhoršenou syřitelnost. Vzorky mléka plemene ovce OL měly poměr  $\alpha_{s1}$ -kaseinu ku  $\beta$ -kaseinu 1:1,6 a vzorky mléka plemene OVF 1:1,5, a proto je mléko těchto dvou plemen vhodnější pro výrobu sýrů.

V porovnání s mlékem plemene OR ve vzorcích mléka plemene OL byl  $\alpha_{s1}$ -kasein stanoven v rozsahu 26,51 – 37,36 % a v mléce plemene OVF 18,7 – 42,79 % v celkovém množství kaseinu. Nejnižší zastoupení  $\alpha_{s1}$ -kaseinu bylo stanoveno v dubnu (na začátku laktace) a nejvyšší v červnu. Nejvyšší zastoupení  $\beta$ -kaseinu  $65,71 \pm 3,57$  % bylo stanoveno na začátku laktace, nejnižší  $34,62 \pm 1,89$  % v červnu, obojí v mléce plemene OVF. Průměrné zastoupení  $\beta$ -kaseinu v mléce plemen OL ( $47,5 \pm 1,57$  %) a OVF ( $48,13 \pm 7,58$  %) bylo podobné, ale v mléce plemene OVF vzorky vykazovaly větší variabilitu v zastoupení  $\beta$ -kaseinu v průběhu laktace. Bramanti et al. (2003) uvádí průměrné zastoupení v  $\beta$ -kaseinu z celkového kaseinu v ovčím mléce 30 %, v mléce kravském 42 % a kozím 63 %. V této studii bylo tedy stanoveno v ovčím mléce vyšší zastoupení  $\beta$ -kaseinu, než uvádí Bramanti et al. (2003).

Zastoupení  $\alpha_{s2}$ -kaseinu nebylo vyšší než 16,66 %. Tato hodnota byla stanovena ve vzorku mléka plemene OVF v měsíci dubnu. V některých vzorcích ovčího mléka byl jeho obsah pod mezí detekce. Obsah  $\kappa$ -kaseinu se v kaseinových frakcích pohyboval mezi 9,13 – 24,05 % s průměrným obsahem  $14,81 \pm 4,38$  %.

Výsledky analýz vzorků mléka s různým počtem somatických buněk ukázaly, že v mléce z června byla syrovátková frakce ovčího mléka  $\beta$ -LgB pod hranicí stanovitelnosti a v měsíci srpnu tomu tak bylo u  $\beta$ -LgA. Průměrné zastoupení  $\beta$ -LgB bylo pouze  $15,91 \pm 6,9$  % a v některých vzorcích nebylo možné detekovat.

Obsah bílkovin, kaseinu a syrovátky v mléce odpovídá hodnotám pro ovčí mléko podle Borkové a Snášelové (2005), (bílkovina 4,6 g/100 g, kasein 3,9 g/100 g a syrovátka 0,7 g/100 g).

Výsledky analýz kaseinových bílkovin ukázaly změny jejich procentuálního zastoupení v závislosti na počtu somatických buněk. Ve vzorcích mléka z farmy F1 s hodnotou  $PSB > 1000 \times 10^3$ , bylo zastoupení  $\beta$ -CN vyšší a současně zastoupení  $\alpha_{s2}$ -CN s  $\beta$ -LgA nižší než ve vzorcích s nižším obsahem PSB. Nicméně mezi vzorky s  $PSB < 500 \times 10^3$  a  $500-1000 \times 10^3$  se nezdá, že by existovaly viditelné rozdíly v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí. Stejně tak nebyly viditelné významné rozdíly v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí ze vzorků mléka z farmy F3, kde byly k dispozici vzorky pouze s  $PSB < 500 \times 10^3$  a  $500-1000 \times 10^3$ . Největší průměrné zastoupení bílkovin bylo obsaženo ve vzorcích mléka s hodnotou  $PSB > 1000 \times 10^3$  (4,6 g/100 ml) a nejmenší ve vzorcích mléka s hodnotou  $PSB < 500 \times 10^3$  (4,2 g/100 ml). Což je opak toho, co tvrdí Seydlová a Dragounová (2017), podle kterých dochází s vysokou hodnotou PSB ke změně látkového složení, a to ke snížení obsahu tuku, bílkovin a laktózy. Současně stoupá obsah volných mastných kyselin a syrovátkových bílkovin. Podle výsledků v této studii není zřejmé, že by se vzrůstajícím PSB stoupalo procentuální zastoupení syrovátkových bílkovin. Ovce ztrácejí zhruba 0,18 kg mléka za jeden laktační den, pokud je průměrná hodnota PSB vyšší než  $500 \times 10^3$  v mililitru mléka (Seydlová a Dragounová, 2017).

Také Fetrow et al. (1991) prokázali, že při stoupajícím PSB klesá dojivost a tím i produkce mléka. Doubravsky (1992) uvádí pozitivní vztah mezi hodnotou PSB v mléce a jednotlivými složkami mléka. Dále prokázal, že při poklesu dojivosti narůstá koncentrace tuku a eventuálně také bílkovin.

Nejnižší zastoupení  $\beta$ -LgB obsahoval bazénový vzorek mléka ze září plemene OL ( $2,96 \pm 2,61$  %) a nejvyšší bazénový vzorek plemene OVF z dubna ( $26,21 \pm 2,86$ ). Svanborg et al. (2015) uvádí, že hlavní proteiny syrovátky, které jsou nejdůležitější pro funkční vlastnosti ve většině potravinářských aplikací, patří  $\beta$ -LG a  $\alpha$ -LA. Na jejich funkční vlastnosti má vliv zejména tepelné zpracování. Nejvyšší procentuální zastoupení  $\beta$ -LgA ( $63,75 \pm 1,26$  %) a zároveň nejnižší  $\alpha$ -LA ( $26,48 \pm 1,37$  %) bylo ve vzorku mléka plemene OVF z dubna. Vzorky mléka plemene OVF obsahovaly průměrně více  $\beta$ -LgA ( $40,28 \pm 17,57$  %) než mléko plemene OL ( $34,73 \pm 15,53$  %). Průměrné zastoupení  $\beta$ -LgA v mléce bylo  $38,56 \pm 17,78$  %. Průměrné zastoupení  $\alpha$ -LA v syrovátkových frakcích mléka se pohybovalo v rozmezí 26,48 – 87,1 %. Nejvyšší zastoupení  $\alpha$ -LA bylo stanoveno ve vzorku mléka plemene OVF v měsíci srpen ( $87,1 \pm 11,92$  %).



V této studii bylo na základě statistického vyhodnocení prokázáno, že průměrné hodnoty zastoupení bílkovinných frakcí  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LgA a  $\alpha$ LA jsou s 95% pravděpodobností v různých měsících vždy rozdílné. Naopak pro bílkovinné frakce  $\beta$ -CN a  $\beta$ -LgB se nepotvrdilo, že by se jejich průměrné zastoupení statisticky lišilo v různém období laktace (hypotéza H1).

Předpoklad, že zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce různých plemen může být odlišné, se potvrdil pro bílkovinné frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -LgA,  $\beta$ -LgB a  $\alpha_{s1}$ -CN. Ovšem pro bílkovinných frakce  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -CN a  $\alpha$ LA se tento předpoklad nepotvrdil (hypotéza H2).

V porovnání s výsledky práce Opravilové (2017), která se zabývala složením bílkovin v kozím mléce, ovčí mléko obsahovalo až o 6 g/100 ml více bílkovin oproti vzorkům kozího mléka, ve kterém byl stanoven nejvyšší obsah bílkovin  $2,27 \pm 0,36$  g/100 ml. Nejvyšší průměrné procentuální zastoupení kaseinů ve vzorcích ovčího mléka ( $92,72 \pm 1,57$  %) oproti mléku kozímu ( $76,43 \pm 12,12$  %) bylo rovněž vyšší. Ve vzorcích kozího mléka byl až na výjimky z jednotlivých frakcí kaseinu nejvíce zastoupen  $\beta$ -kasein, stejně tak tomu bylo ve vzorcích mléka ovčího až na vzorky mléka plemene OR. Jak mléko ovčí, tak i kozí vykazovalo určitou míru variability v obsahu jednotlivých kaseinových frakcí a stejně tak celkového obsahu bílkovin v průběhu laktačního období u stejného plemene chovaném na různých farmách. Oproti vzorkům mléka ovčího se neprokázal statisticky významný rozdíl mezi průměrným množstvím kaseinových bílkovin v závislosti na období laktace. Stejně jako v mléce ovčím se v mléce kozím prokázal statisticky významný rozdíl v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí mezi různými plemeny.

Na rozdíl od nejčastěji konzumovaného mléka kravského, ve kterém je průměrný obsah bílkovin 3,2 g/100 g, kaseinu 2,6 g/100 g a syrovátky 0,6 g/100 g (Velíšek, 2012), bylo v této studii v ovčím mléce, průměrné zastoupení bílkovin, kaseinu a syrovátky mírně vyšší. Co se týče jednotlivých frakcí, tak  $\alpha_{s1}$ -kasein je v mléce kravském zastoupen více (37 %) než v mléce ovčím (31 %), stejně tak  $\alpha_{s2}$ -kasein (7 % v mléce kravském oproti 5 % v ovčím mléce).  $\beta$ -kasein se v mléce ovčím (48 %) vyskytuje z většího podílu než v kravském (42 %), stejně tak  $\kappa$ -kasein (mléko ovčí 15 %, kravské 9 %). Podle Bramanti et al. (2012) tomu bylo u  $\alpha_{s2}$ -kaseinu a  $\beta$ -kaseinu naopak.

Podle Law (1995) je zastoupení  $\beta$ -laktoglobulinu v syrovátce je v kravském mléce (59,3 %) oproti mléku ovčímu (61,1 %) mírně vyšší. V této studii výsledky analyzovaných vzorků ukázaly, že podíl  $\beta$ -laktoglobulinu byl ještě o něco nižší a to 47,4 %.

Výsledky je třeba považovat vzhledem k malému počtu vzorků za orientační. K serióznímu hodnocení vlivu fáze laktace, plemene ovce a počtu somatických buněk na zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v ovčím mléce je třeba analyzovat větší soubor vzorků ovčího mléka. Dále je žádoucí pokračovat v optimalizaci metody pro stanovování syrovátkových bílkovin a zabývat se studiem dalších vlivů, které mohou působit na složení mléka.

## 7 Závěr

- Celkový obsah bílkovin v ovčím mléce se pohyboval v intervalu 1,95 – 8,25 g/100 ml mléka.
- Nejvyšší celkový obsah bílkovin ( $8,25 \pm 0,63$  g/100 ml) byl stanoven v bazénovém vzorku mléka plemene ovce východofríské chované na farmě F1 v červnu.
- Nejvyšší průměrné zastoupení kaseinu v mléčných bílkovinách bylo  $92,72 \pm 1,57$  %, jednalo se o bazénový vzorek mléka plemene Lacaune.
- S výjimkou vzorků mléka plemene ovce Romanovské byl ve vzorcích ze všech kaseinových bílkovin nejvíce zastoupen  $\beta$ -kasein.
- Pro výrobu sýrů byl poměr  $\alpha_{s1}$ -kaseinu ku  $\beta$ -kaseinu vhodnější v mléce ovce plemene Lacaune a východofríské.
- Zastoupení bílkovinných frakcí  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LgA,  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA v ovčím mléce se mění podle období laktace.
- Zastoupení bílkovinných frakcí  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -LgA,  $\beta$ -LgB a  $\alpha_{s1}$ -CN v ovčím mléce se pro různá plemena liší.
- Procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí se měnilo v závislosti na počtu somatických buněk ve vzorcích ovčího mléka. Ve vzorcích mléka s vyšší hodnotou PSB, bylo zastoupení  $\beta$ -CN vyšší a současně zastoupení  $\alpha_{s2}$ -CN s  $\beta$ -LgA nižší než ve vzorcích s nižším obsahem PSB.
- Změny v procentuálním zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí lze uplatnit v potravinářském průmyslu při zpracování mléka na sýry.

Tato studie byla podpořena grantem projektu NAZV QJ1510137 Ministerstva zemědělství České republiky

## 8 Seznam použité literatury

Aganga A.A., Amarteifio J.O., Nikile N. (2002): Effect of stage of lactation on nutrient composition of Tswana sheep and goat's milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 533–543.

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.

Borková M., Snášelová J. 2005. Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. *Czech Journal of Food Science*. 23. 41–50.

Bramanti, E., Sortino, CH., Onor, M., Beni, F., Raspi, G. (2003). Separation and determination of denatured  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. *Journal of Chromatography*. 994(1-2). 59–74.

Dostálová, J. 2016. Mléko a mléčné výrobky ve výživě. Sborník prezentací, XXXII. Mezinárodní kongres SKVIMP. 61-64. ISBN 978-80-7177-954-4.

Doubravsky, P. 1992. Making use of the somatic cell concentration in the milk for improving the udder health. *Agris* [online]. 1992 [cit. 2018-03-14]. Dostupné z <http://eds.b.ebscohost.com.infozdroje.czu.cz>

Dragounová, H., Hejtmánková, A., Kouřimská, L. 2005. Ovčí mléko a jeho význam v lidské výživě. *Agris* [online]. 2005 [cit. 2018-03-14]. Dostupné z [http://www.agris.cz/Content/files/main\\_files/75/153130/32\\_05.pdf](http://www.agris.cz/Content/files/main_files/75/153130/32_05.pdf).

Fetrow, J., Mann, D., Butcher, K., McDaniel, B. 1991. Production losses from mastitis: carryover from the previous lactation. *Journal of dairy science*. 74(3). 833-839.

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., 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.

Giambra, I. J., Brandt, H., Erhardt, G. 2014. Milk protein variants are highly associated with milk performance traits in East Friesian Dairy and Lacaune sheep. 121(2-3). 382-394.

Hejtmánková, A., Pivec, V., Trnková, E., Dragounová, H. 2012. Differences in the Composition of Totala 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.

Jansová, B., Hejtmánková A., Dragounová, H. 2007. Obsah a složení syrovátkových bílkovin kozího a ovčího mléka. In: Celostátní přehlídka sýrů 2007: výsledky přehlídek a sborník přednášek semináře „Mléko a sýry“. Praha: Vysoká škola chemicko technologická v Praze. s. 139-143. ISBN 978-80-7080-661-6.

Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M. 2012. Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin. Key Publishing. Ostrava. p. 588. ISBN: 978-80-7418-145-0

Klimešová, M., Oto Hanuš, K., Bogdanovičová, I. N., Nejeschlebová, L., Kopecký, J., Kalhotka, L. 2015. Evaluation of compositional, hygienic, physical and technological parameters of raw sheep and goat's milk and their comparison with cow's milk. Mlékářské listy, 152. 16-19.

McSweeney, P. L. H. (ed.), Alichanides, E., Ardo, Y., Banks, J. M., Beresford, T., Donnelly, C.W., Dustrerhoft, E.-M., van den Berg, G., Farkye, N. Y., Frolich-Wyder, M. T., Bachmann, H. P., Gobbetti, 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.

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.

- Moioli, B., Pila, F., Tripaldi, C. 1998. Detection of milk protein gene polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: A review. *Small Ruminant Research*. 27(3). 185-195.
- 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. Dostupné z <<http://www.dairyscience.info/newcalculators/yield-01.asp>>
- Opravilová, J. (2017). Změny v obsahu bílkovinných frakcí kozího mléka v průběhu laktace. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 70 s.
- Pavič V., Antunac N., Mioč B., Ivankovič A., Havranek J. L. 2002. Influence of stage of lactation on the chemical composition and physical properties of sheep milk. *Czech Journal of Animal Science*, 47 (2). 80-84.
- 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.
- Selvaggi, M., Laudadio, V., Dario, C., Tufarelli, V. 2014. Investigating the genetic polymorphism of sheep milk proteins: a useful tool for dairy production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94(15). 3090-3099.
- Seydlová, R., Dragounová, H. 2017. Faktory ovlivňující počet somatických buněk v mléce malých přežvýkavců, ovcí a koz. *Náš chov*. 77 (12). 45-47.
- Stádník, L., Toušová, R., Viedemann, F., Louda, F. 2000. Možnosti snížení obsahu somatických buněk v mléce dojnic homeopatiky. *Agris* [online]. 18. května 2000 [cit. 2018-03-14]. Dostupné z <http://www.agris.cz/clanek/109753>.
- St-Gelais, D., Haché, S. 2005. Effect of  $\beta$ -casein Concentration in Cheese Milk on Rennet Coagulation properties, Cheese Composition and Cheese Ripening. *Food Research International*. 38 (5). 523-531.

STOB klub. Složení a vhodnost mléka a mléčných výrobků pro lidskou výživu. 2012. [cit. 2017-09-14]. Dostupné z <http://www.stobklub.cz/clanek/slozeni-a-vhodnost-mleka-a-mlecnych-vyrobku-pro-lidskou-vyzivu/>.

Svačina, Š., Müllerová, D., Bretšnajdrová, A. 2013. Dietologie pro lékaře, farmaceuty, zdravotní sestry a nutriční terapeutky. Triton. Prague. ISBN: 978-80-7387-699-9

Svanborg, S., Johansen, A. G., Abrahamsen, R. K., Siv B., Skeie, S. B. 2015. The composition and functional properties of whey protein concentrates produced from buttermilk are comparable with those of whey protein concentrates produced from skimmed milk. *Journal of dairy science*, 98(9), 5829-5840.

Štolc, L., Ježková, A., Dřevo, V., Nohejlová, L. 1999. Význam ovčího mléka a možnosti jeho využití v ČR [online]. *Agris*. 20. května 1999 [cit. 2018-03-14]. Dostupné z <http://www.agris.cz/clanek/111241/vyznam-ovciho-mleka-a-moznosti-jeho-vyuziti-v-cr>.

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.

Trujillo, A.J., Casals, I., Guamis, B. 2000. Analysis of major bovine milk proteins by reversedphase high-performance liquid chromatography and flow injection analysis with electrospray ionization mass spektrometry. *Journal of chromatography A*. 870. p. 371-380.

Van den Berg, M. G., 1993a. Genetic Polymorphism of  $\kappa$ -kasein and  $\beta$ -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. 2012. *Chemie potravin: technologie potravin*. Key Publishing. Ostrava. p. 331. ISBN: 80-86659-01-1.

Velíšek, J., Hajšlová, J. 2009. *Chemie potravin I. OSSIS*. Tábor. 602 s. ISBN: 978-80-8665915-2.

Zlatohlávek, L. 2016. Klinická dietologie a výživa. Current Media Czechia. Prague. ISBN: 978-80-88129-03-5.



## 9 Přílohy

### Příloha 1: Test normality rozložení

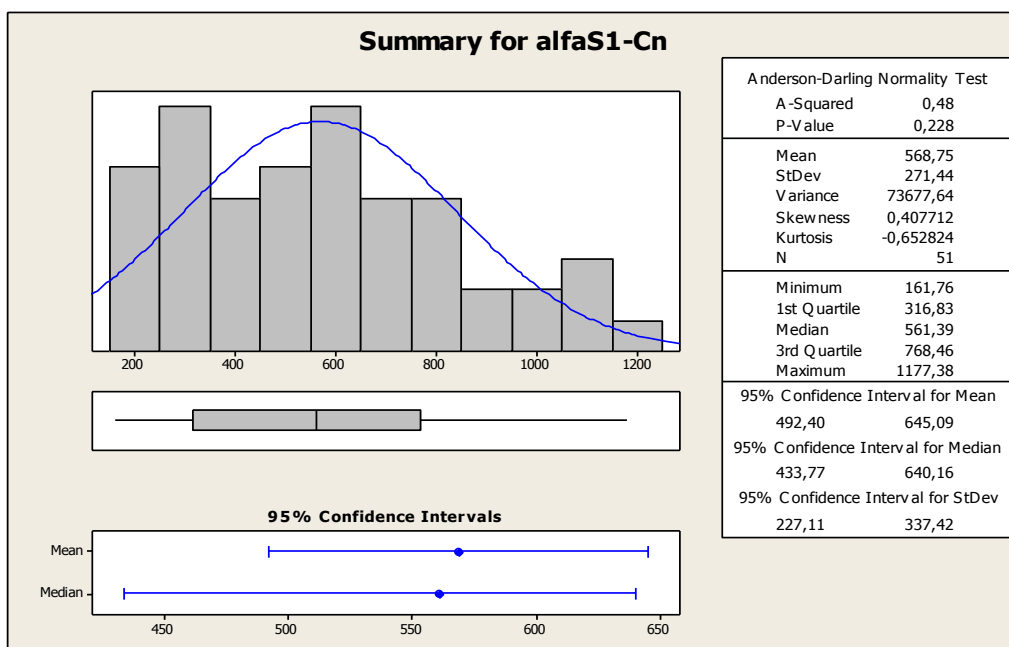
Pro zjištění normality rozložení jednotlivých hodnot bílkovinných frakcí byl proveden test. Viz obrázky níže nazvané „Summary...“

Závěr:

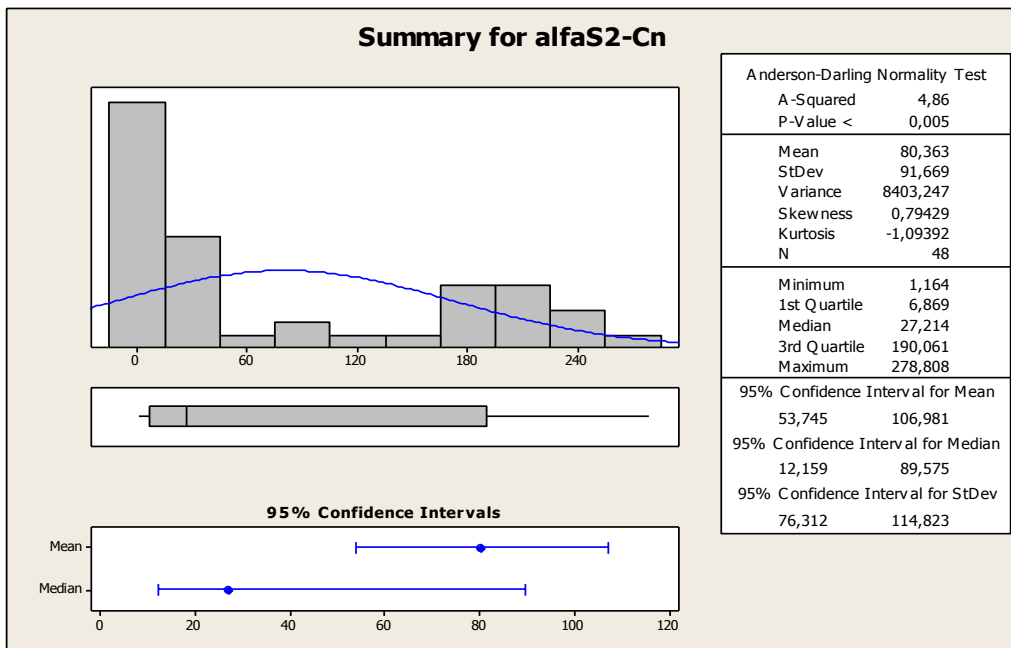
Normálnímu rozložení odpovídaly hodnoty bílkovinných frakcí  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha_{LA}$  ( $P > 0,05$ ).

Frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LgA a  $\beta$ -LgB nemají normální rozložení ( $P < 0,05$ ).

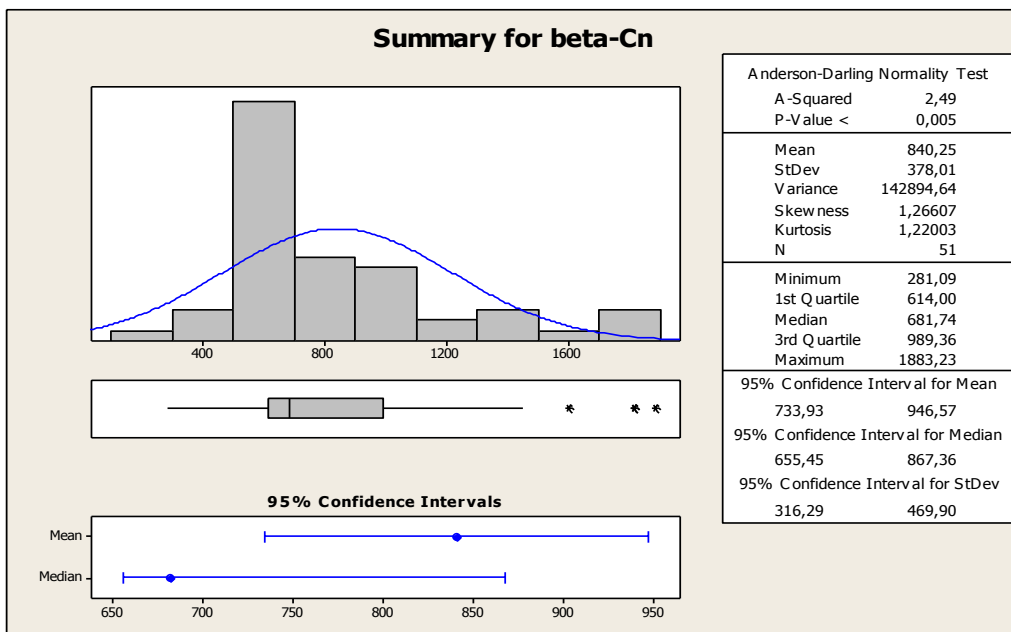
Graf 12: Test na normalitu rozložení alfaS1-CN



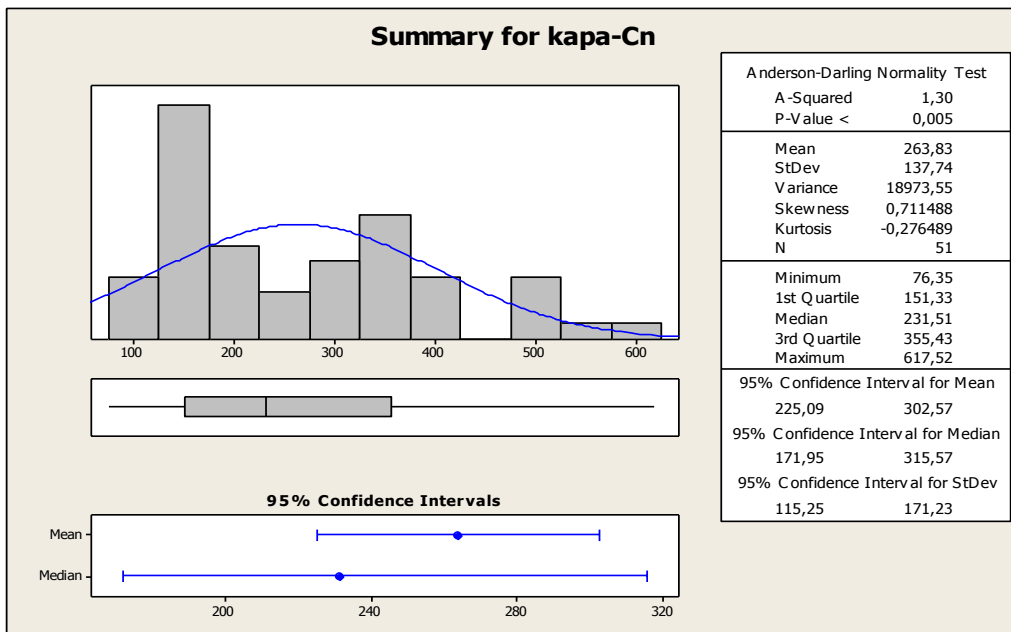
Graf 13: Test na normalitu rozložení alfaS2-CN



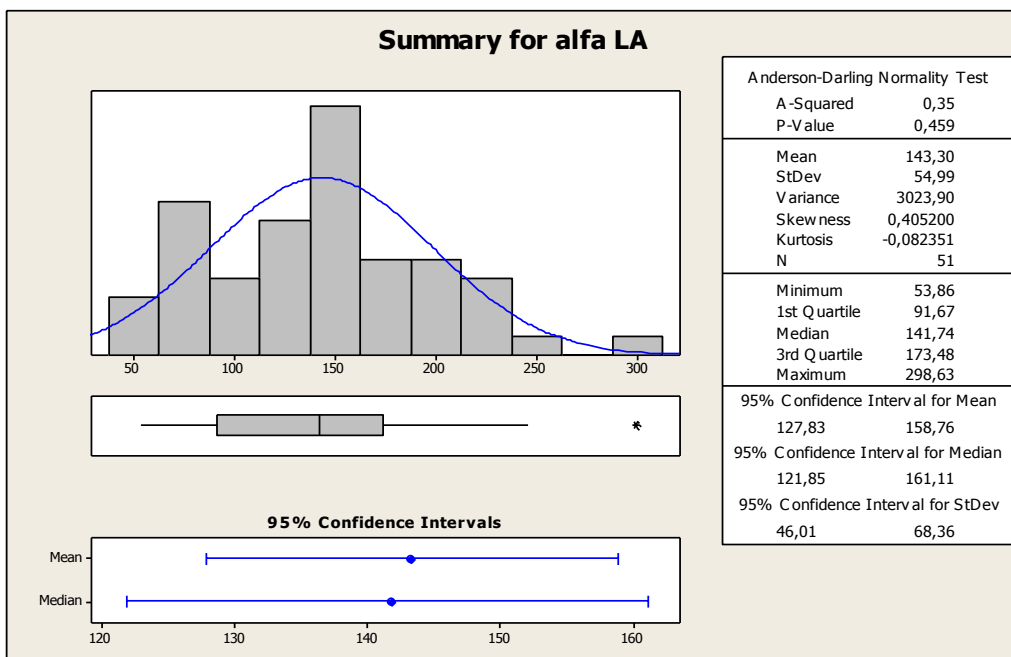
Graf 14: Test na normalitu rozložení beta-CN



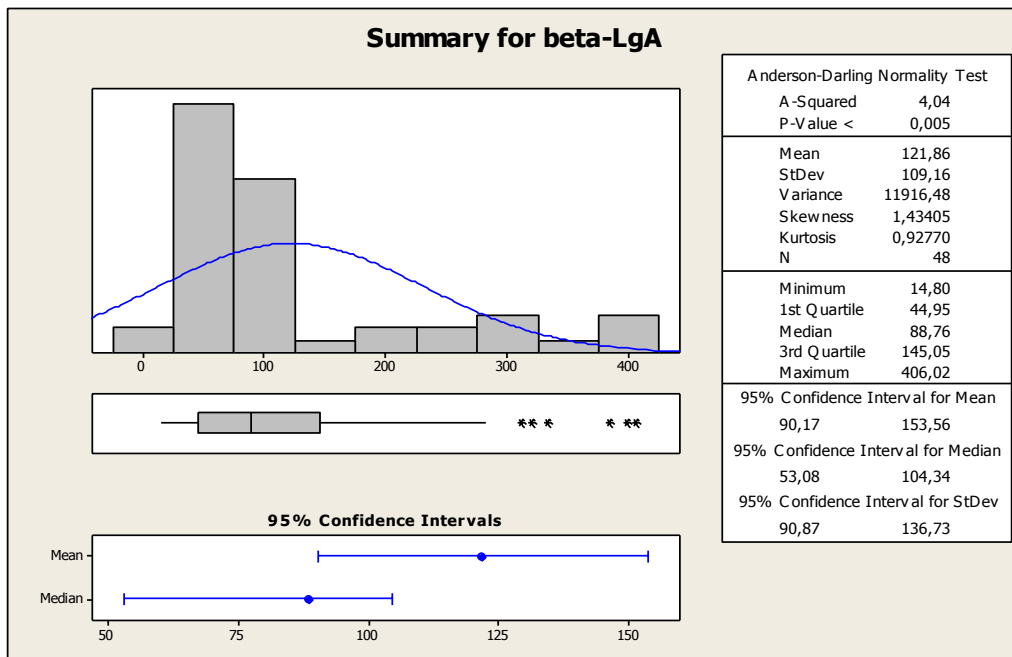
Graf 15: Test na normalitu rozložení kapa-CN



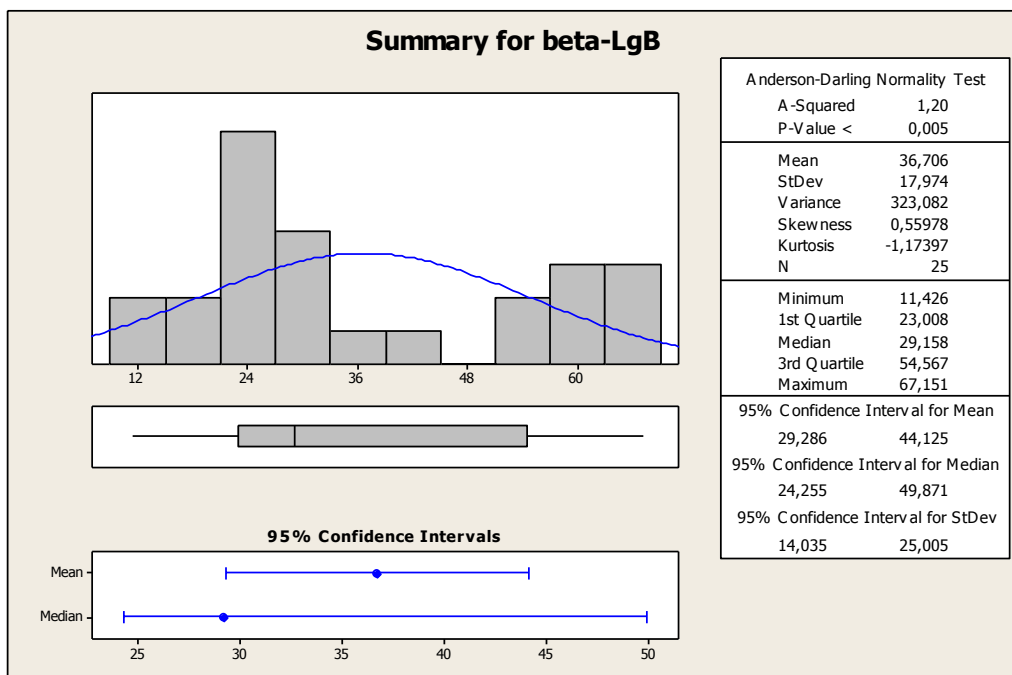
Graf 16: Test na normalitu rozložení alfa LA



Graf 17: Test na normalitu rozložení beta-LgA



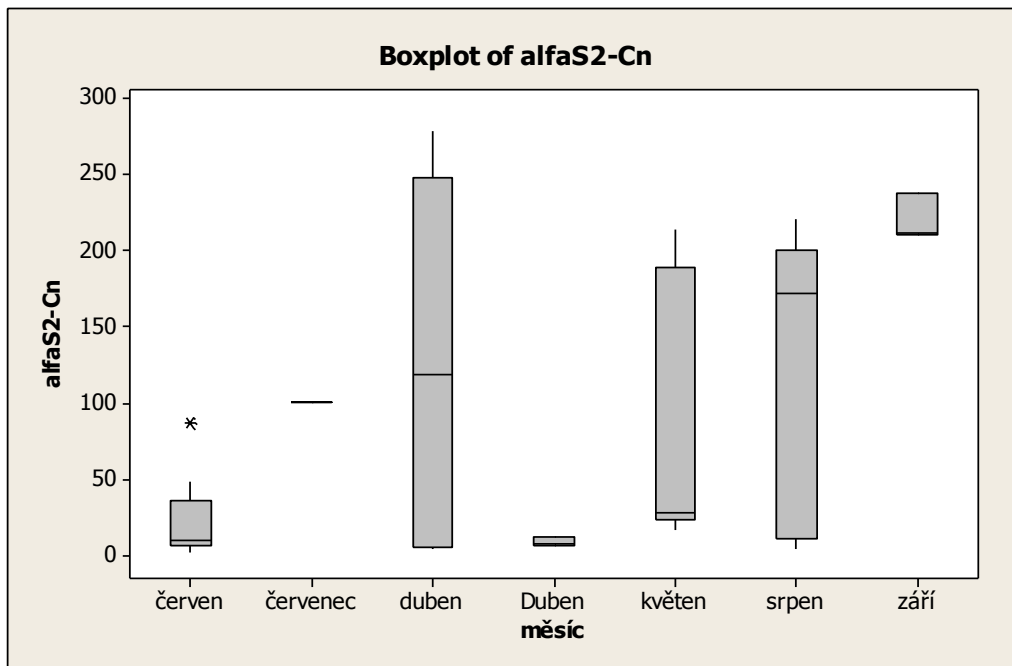
Graf 18: Test na normalitu rozložení beta-LgB



### Descriptive Statistics: alfaS2-Cn

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
alfaS2-Cn	červen	19,92	23,43	1,16	5,76	8,91	87,03	29,83
	červenec	99,718	*	99,718	*	99,718	99,718	*
	duben	127,0	134,6	3,4	4,7	118,9	278,8	242,6
	Duben	8,28	2,88	6,39	6,39	6,86	11,60	5,21
	květen	84,5	82,7	15,9	22,9	27,4	213,5	165,6
	srpen	127,6	92,3	3,8	10,8	172,1	220,5	189,8
	září	219,60	15,10	210,20	210,20	211,59	237,02	26,83

Graf 19: Descriptive Statistics: alfaS2-CN



### Kruskal-Wallis Test: alfaS2-Cn versus měsíc

48 cases were used  
3 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on alfaS2-Cn

měsíc	N	Median	Ave Rank	Z
červen	16	8,905	16,1	-2,95
červenec	1	99,718	32,0	0,54
duben	6	118,890	26,7	0,41
Duben	3	6,859	13,0	-1,47
květen	10	27,392	29,1	1,17
srpen	9	172,115	29,7	1,23
září	3	211,590	43,3	2,41
Overall	48		24,5	

H = 16,00 DF = 6 **P = 0,014**

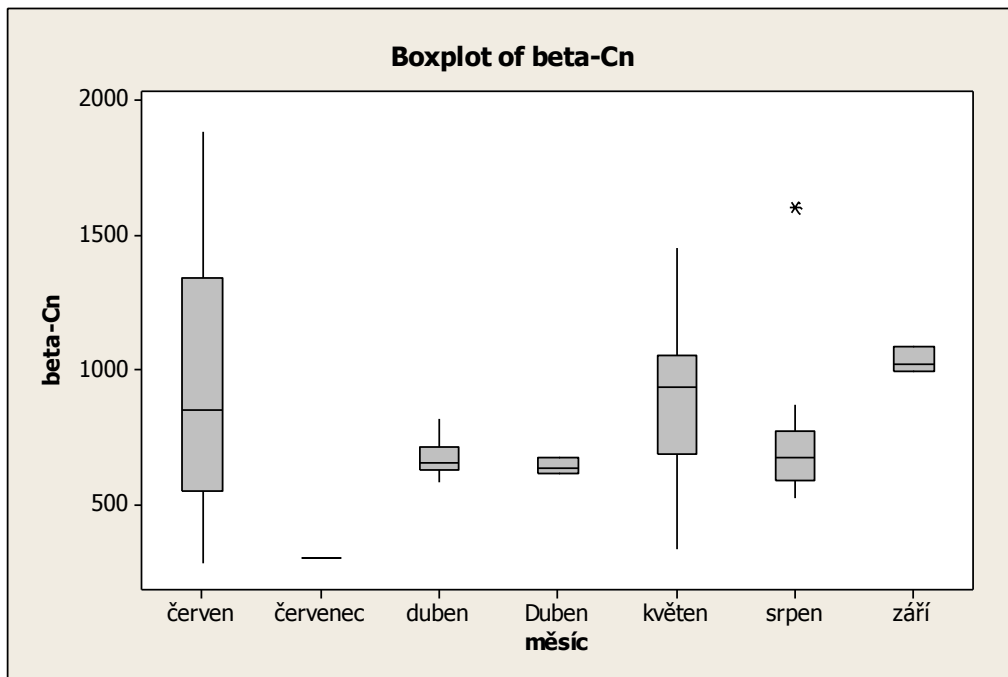
H = 16,00 DF = 6 P = 0,014 (adjusted for ties)

\* NOTE \* One or more small samples

### Descriptive Statistics: beta-Cn

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
beta-Cn	červen	976	529	281	552	851	1883	791
	červenec	302,21	*	302,21	*	302,21	302,21	*
	duben	673,5	69,3	583,5	628,6	655,5	820,0	86,3
	Duben	642,3	30,9	614,0	614,0	637,7	675,2	61,2
	květen	897,0	311,2	335,8	686,4	937,7	1448,3	364,3
	srpen	763	330	523	591	676	1603	184
	září	1034,9	48,8	992,9	992,9	1023,4	1088,5	95,6

Graf 20: Descriptive Statistics: beta-CN



### Kruskal-Wallis Test: beta-CN versus měsíc

Kruskal-Wallis Test on beta-CN

měsíc	N	Median	Ave Rank	Z
červen	16	850,9	27,3	0,41
červenec	1	302,2	2,0	-1,63
duben	9	655,5	20,7	-1,19
Duben	3	637,7	17,0	-1,08
květen	10	937,7	32,5	1,54
srpen	9	675,7	22,6	-0,77
září	3	1023,4	41,0	1,80
Overall	51		26,0	

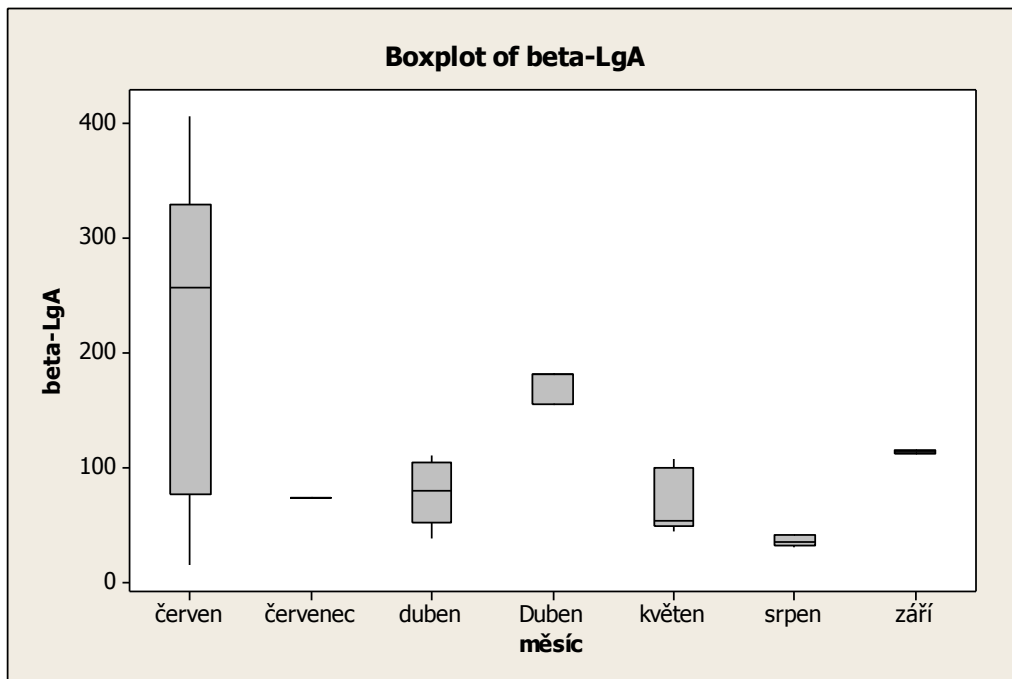
H = 10,43 DF = 6 **P = 0,108**

\* NOTE \* One or more small samples

### Descriptive Statistics: beta-LgA

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
beta-LgA	červen	209,5	146,3	14,8	76,9	257,0	406,0	253,0
	červenec	73,002	*	73,002	*	73,002	73,002	*
	duben	77,41	26,95	38,33	51,62	79,94	110,45	52,09
	Duben	172,15	14,66	155,23	155,23	180,60	180,63	25,40
	květen	65,81	25,45	44,10	48,82	52,85	106,71	49,82
	srpen	35,62	4,33	30,34	31,57	35,06	41,37	8,72
	září	112,96	1,81	110,96	110,96	113,41	114,51	3,54

Graf 21: Descriptive Statistics: beta-LgA



### Kruskal-Wallis Test: beta-LgA versus měsíc

48 cases were used  
3 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on beta-LgA

měsíc	N	Median	Ave Rank	Z
červen	16	256,98	31,2	2,35
červenec	1	73,00	21,5	-0,22
duben	9	79,94	22,3	-0,52
Duben	3	180,60	38,0	1,72
květen	10	52,85	19,4	-1,29
srpen	6	35,06	6,8	-3,30
září	3	113,41	35,0	1,34
Overall	48		24,5	

H = 19,31 DF = 6 **P = 0,004**

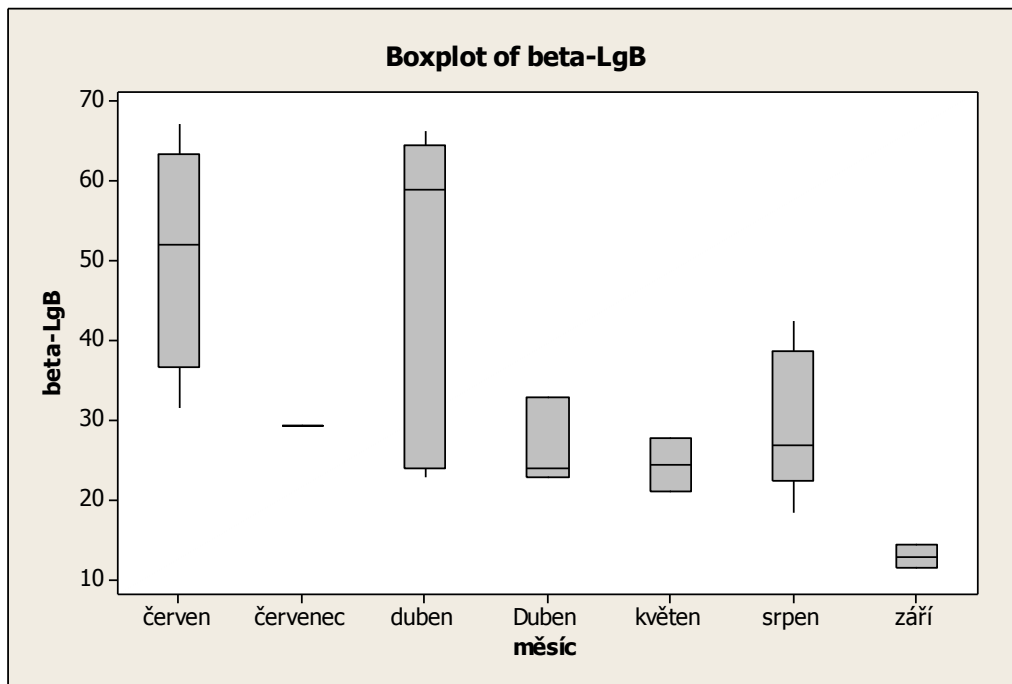
H = 19,31 DF = 6 P = 0,004 (adjusted for ties)

\* NOTE \* One or more small samples

### Descriptive Statistics: beta-LgB

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
beta-LgB	červen	50,62	14,60	31,56	36,61	51,89	67,15	26,77
	červenec	29,158	*	29,158	*	29,158	29,158	*
	duben	47,94	20,16	22,73	23,84	58,96	66,31	40,54
	Duben	26,48	5,46	22,74	22,74	23,94	32,74	10,01
	květen	24,33	4,81	20,93	*	24,33	27,73	*
	srpen	29,73	9,19	18,26	22,27	26,77	42,28	16,39
	září	12,85	2,02	11,43	*	12,85	14,28	*

Graf 22: Descriptive Statistics: beta-LgB



### Příloha 2: Důkaz hypotézy H1

H1: Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce se liší během laktace.

Pro hodnoty frakcí  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LgA a  $\beta$ -LgB, které neodpovídají normálnímu roložení (příloha č. 1) byl pro důkaz hypotézy použit neparametrický test dle metody Kruskal-Wallis, jako potvrzení či zamítnutí nulové hypotézy, že mediány hodnot procentuálního zastoupení jednotlivých frakcí budou během různých období laktace stejné.

### Kruskal-Wallis Test: beta-LgB versus měsíc

25 cases were used  
26 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on beta-LgB

měsíc	N	Median	Ave Rank	Z
červen	4	51,89	19,0	1,78
červenec	1	29,16	13,0	0,00
duben	8	58,96	16,4	1,57
Duben	3	23,94	9,7	-0,84
květen	2	24,33	8,0	-1,00
srpen	5	26,77	11,4	-0,54
září	2	12,85	1,5	-2,30
Overall	25		13,0	

H = 11,00 DF = 6 **P = 0,088**

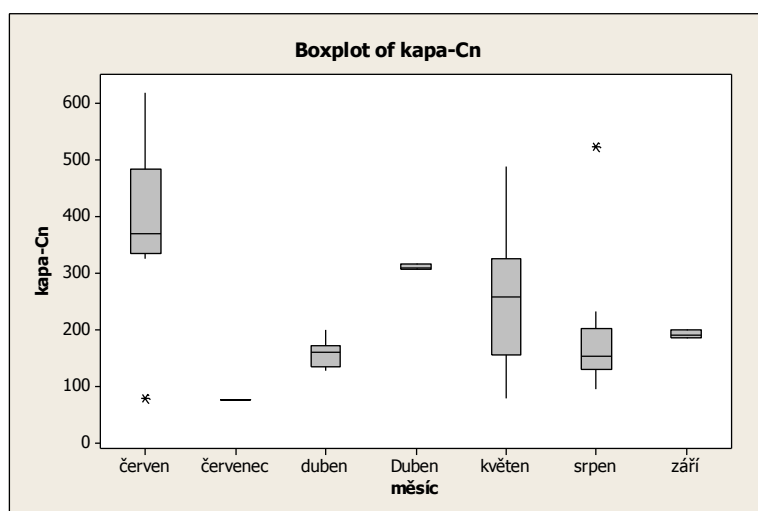
\* NOTE \* One or more small samples



## Descriptive Statistics: kapa-Cn

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
kapa-Cn	červen	386,4	122,4	77,6	333,6	368,2	617,5	149,1
	červenec	76,354	*	76,354	*	76,354	76,354	*
	duben	155,49	23,30	126,44	133,31	158,23	199,06	36,42
	Duben	309,70	5,10	306,47	306,47	307,05	315,58	9,11
	květen	257,0	122,6	77,5	154,6	257,9	487,7	170,8
	srpen	191,7	129,3	93,6	128,9	151,3	521,4	72,8
	září	191,25	7,31	184,43	184,43	190,34	198,97	14,54

Graf 23: H1 Descriptive Statistics: kapa-CN



## Kruskal-Wallis Test: kapa-Cn versus měsíc

Kruskal-Wallis Test on kapa-Cn

měsíc	N	Median	Ave Rank	Z
červen	16	368,21	39,3	4,30
červenec	1	76,35	1,0	-1,70
duben	9	158,23	14,1	-2,66
Duben	3	307,05	32,0	0,72
květen	10	257,86	25,8	-0,05
srpen	9	151,33	16,7	-2,06
září	3	190,34	22,0	-0,48
Overall	51		26,0	

H = 25,56 DF = 6 **P = 0,000**

H = 25,56 DF = 6 P = 0,000 (adjusted for ties)

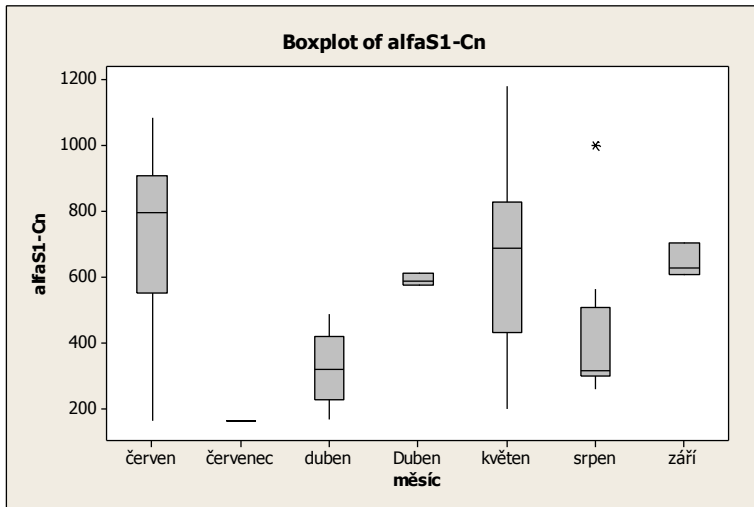
\* NOTE \* One or more small samples

## Descriptive Statistics: alfaS1-Cn

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
alfaS1-Cn	červen	740,5	249,7	162,6	550,8	793,2	1084,0	353,7
	červenec	161,76	*	161,76	*	161,76	161,76	*
	duben	315,6	106,7	166,2	224,5	316,8	484,5	192,0
	Duben	589,28	17,09	574,04	574,04	586,04	607,76	33,71
	květen	654,5	288,6	198,9	430,8	683,9	1177,4	393,5
	srpen	434,4	232,8	256,7	296,2	313,1	997,3	210,7

září 644,3 51,0 605,5 605,5 625,4 702,0 96,5

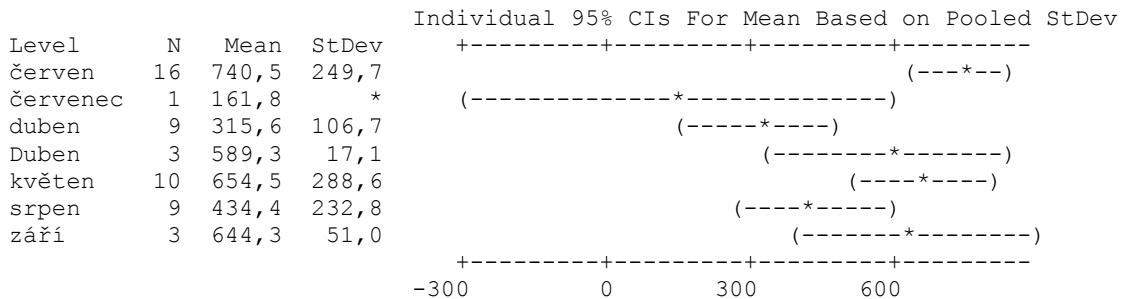
Graf 24: H1 Descriptive Statistics: alfaS1-CN



### One-way ANOVA: alfaS1-Cn versus měsíc

Source	DF	SS	MS	F	P
měsíc	6	1468683	244780	4,86	<b>0,001</b>
Error	44	2215199	50345		
Total	50	3683882			

S = 224,4 R-Sq = 39,87% R-Sq(adj) = 31,67%

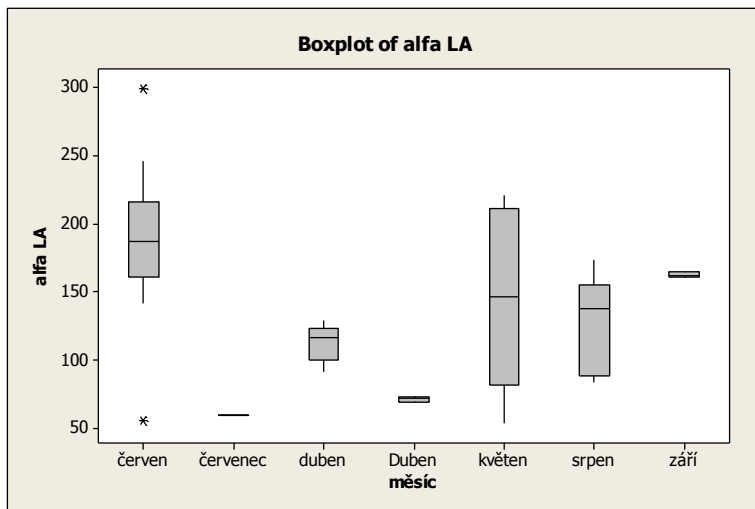


Pooled StDev = 224,4

### Descriptive Statistics: alfa LA

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
alfa LA	červen	186,3	52,9	55,6	160,5	187,1	298,6	55,1
	červenec	59,780	*	59,780	*	59,780	59,780	*
	duben	113,25	12,90	91,67	100,34	116,68	129,43	22,78
	Duben	71,31	1,88	69,14	69,14	72,25	72,53	3,39
	květen	139,3	62,6	53,9	81,5	146,4	220,9	129,7
	srpen	128,1	33,5	83,9	88,1	137,7	173,5	67,2
	září	162,74	1,82	161,23	161,23	162,22	164,77	3,53

Graf 25: H1 Descriptive Statistics: alfa LA



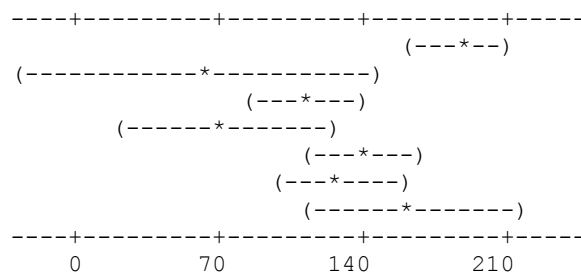
### One-way ANOVA: alfa LA versus měsíc

Source	DF	SS	MS	F	P
měsíc	6	63594	10599	5,32	0,000
Error	44	87601	1991		
Total	50	151195			

S = 44,62 R-Sq = 42,06% R-Sq(adj) = 34,16%

Level	N	Mean	StDev
červen	16	186,29	52,89
červenec	1	59,78	*
duben	9	113,25	12,90
Duben	3	71,31	1,88
květen	10	139,34	62,63
srpen	9	128,10	33,54
září	3	162,74	1,82

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev



Pooled StDev = 44,62

Pro hodnoty frakcí  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA, které odpovídají normálnímu rozložení, byl k důkazu hypotézy použit statistický test ANOVA pro porovnání průměrů hodnot procentuálního zastoupení frakcí. Jako potvrzení či zamítnutí nulové hypotézy, že průměry procentuálního zastoupení hodnot jednotlivých frakcí budou během různých období laktace stejné.

Nulová hypotéza byla zamítnuta pro frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN a  $\beta$ -LgA ( $P < 0,05$ ). Mediány hodnot procentuálního zastoupení bílkovinných frakcí  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN a  $\beta$ -LgA rozdělené podle měsíců budou s 95% pravděpodobností vždy rozdílné.

Nulová hypotéza se potvrdila pro frakce  $\beta$ -CN,  $\beta$ -LgB ( $P > 0,05$ ). Mediány hodnot procentuálního zastoupení bílkovinných frakcí  $\beta$ -CN,  $\beta$ -LgB rozdělené podle měsíců budou s 95% pravděpodobností stejné nebo velmi blízké.

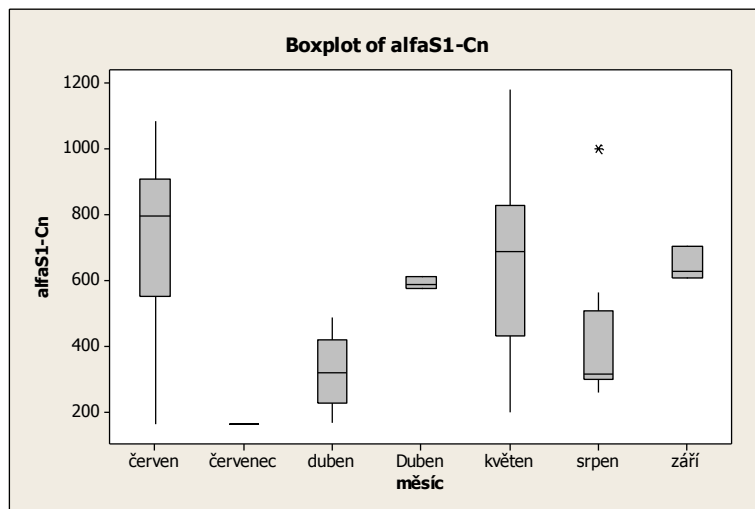
Pro hodnoty bílkovinných frakcí  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA (odpovídajících normálnímu rozložení) bylo třeba k ověření hypotézy  $H_1$  použít test ANOVA.

Nulová hypotéza byla zamítnuta ( $P < 0,05$ ). Průměrné hodnoty pro bílkovinné frakce  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA jsou s 95% pravděpodobností v různých měsících vždy rozdílné.

### Descriptive Statistics: alfaS1-Cn

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
alfaS1-Cn	červen	740,5	249,7	162,6	550,8	793,2	1084,0	353,7
	červenec	161,76	*	161,76	*	161,76	161,76	*
	duben	315,6	106,7	166,2	224,5	316,8	484,5	192,0
	Duben	589,28	17,09	574,04	574,04	586,04	607,76	33,71
	květen	654,5	288,6	198,9	430,8	683,9	1177,4	393,5
	srpen	434,4	232,8	256,7	296,2	313,1	997,3	210,7
	září	644,3	51,0	605,5	605,5	625,4	702,0	96,5

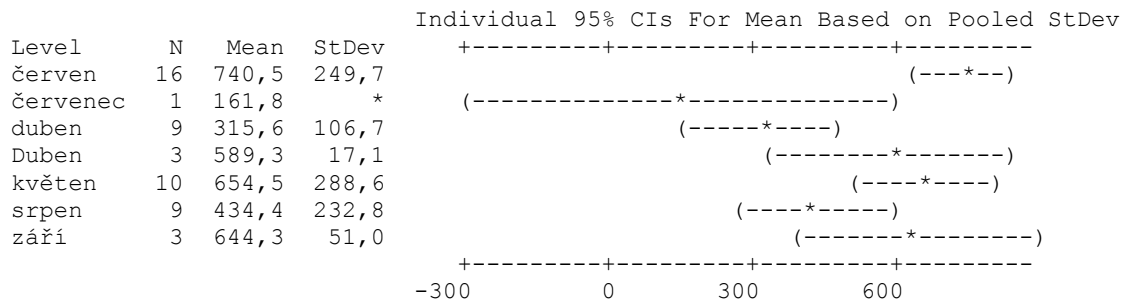
Graf 26:  $H_1$  Descriptive Statistics: alfaS1-Cn



### One-way ANOVA: alfaS1-Cn versus měsíc

Source	DF	SS	MS	F	P
měsíc	6	1468683	244780	4,86	<b>0,001</b>
Error	44	2215199	50345		
Total	50	3683882			

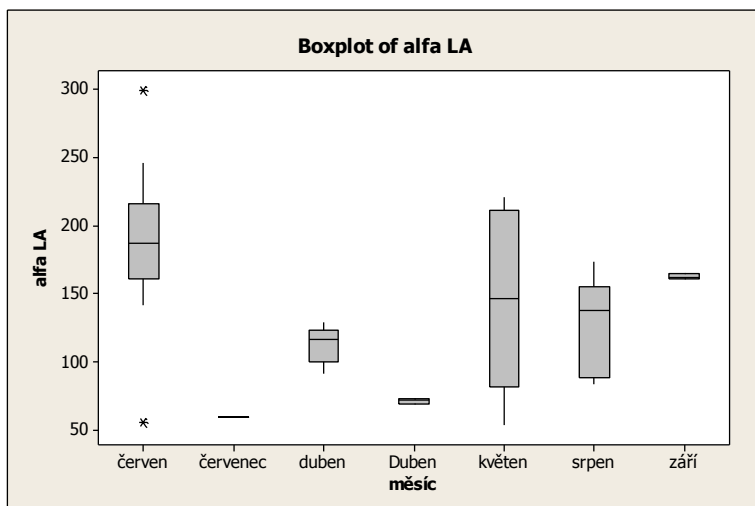
S = 224,4    R-Sq = 39,87%    R-Sq(adj) = 31,67%



## Descriptive Statistics: alfa LA

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
alfa LA	červen	186,3	52,9	55,6	160,5	187,1	298,6	55,1
	červenec	59,780	*	59,780	*	59,780	59,780	*
	duben	113,25	12,90	91,67	100,34	116,68	129,43	22,78
	Duben	71,31	1,88	69,14	69,14	72,25	72,53	3,39
	květen	139,3	62,6	53,9	81,5	146,4	220,9	129,7
	srpen	128,1	33,5	83,9	88,1	137,7	173,5	67,2
	září	162,74	1,82	161,23	161,23	162,22	164,77	3,53

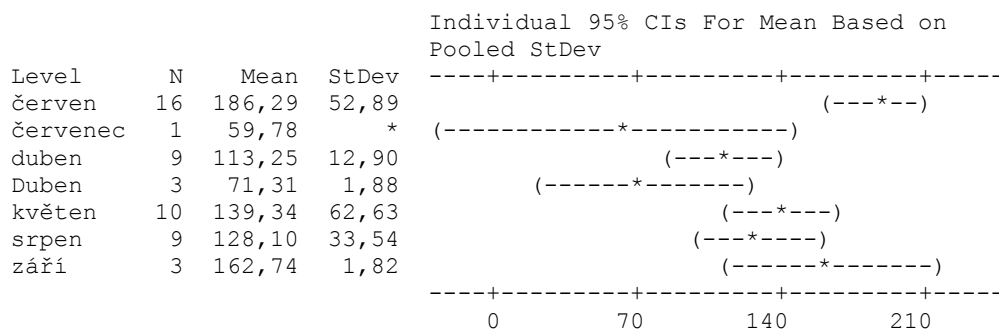
Graf 27: H1 Descriptive Statistics: alfa LA



## One-way ANOVA: alfa LA versus měsíc

Source	DF	SS	MS	F	P
měsíc	6	63594	10599	5,32	<b>0,000</b>
Error	44	87601	1991		
Total	50	151195			

S = 44,62    R-Sq = 42,06%    R-Sq(adj) = 34,16%



Pooled StDev = 44,62

Z toho vyplynulo, že hypotéza H1 “Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce se liší během laktace“ se:

- Nepotvrdila pro bílkovinné frakce  $\beta$ -CN a  $\beta$ -LgB, ale doporučuji ještě ověřit na větším vzorku hodnot
- Potvrdila pro bílkovinné frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LgA,  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA

### *Příloha 3: Důkaz hypotézy H2*

H2: Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce různých plemen je odlišné.

Pro potvrzení či zamítnutí nulové hypotézy, že mediány hodnot procentuálního zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LgA a  $\beta$ -LgB všech plemen budou stejné, byl použit neparametrický test Kruskal-Wallis (stejně jako u důkazu hypotézy H1, protože hodnoty těchto frakcí neodpovídají normálnímu rozložení (příloha č. 1)).

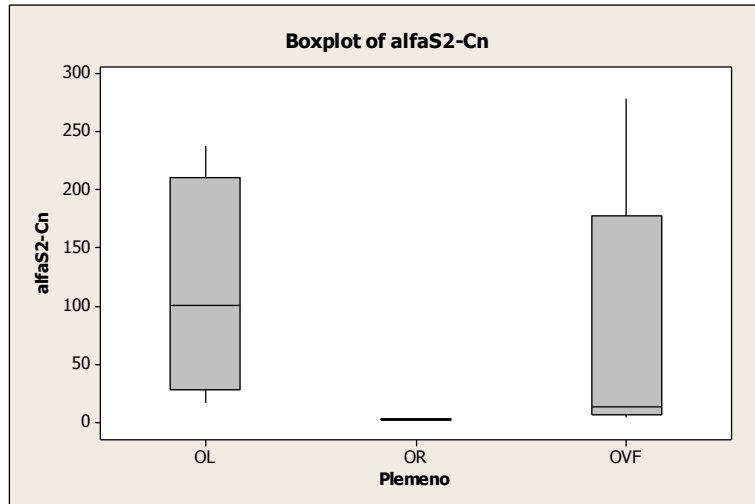
Nulová hypotéza byla zamítnuta pro frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -LgA a  $\beta$ -LgB ( $P < 0,05$ ). Mediány hodnot procentuálního zastoupení bílkovinných frakcí  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -LgA a  $\beta$ -LgB rozdělené podle měsíců budou s 95% pravděpodobností vždy rozdílné.

Nulová hypotéza se potvrdila pro frakce  $\kappa$ -CN a  $\beta$ -CN ( $P > 0,05$ ). Mediány hodnot procentuálního zastoupení bílkovinných frakcí  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -CN rozdělené podle plemen ovcí budou s 95% pravděpodobností stejné nebo velmi blízké.

## Descriptive Statistics: alfaS2-Cn

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
alfaS2-Cn	OL	112,7	86,7	15,9	27,1	99,7	237,0	183,1
	OR	1,715	0,702	1,164	1,164	1,475	2,505	1,341
	OVF	72,1	93,5	3,4	6,5	12,7	278,8	170,3

Graf 28: H2 Descriptive Statistics: alfaS2-CN



## Kruskal-Wallis Test: alfaS2-Cn versus Plemeno

48 cases were used  
3 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on alfaS2-Cn

Plemeno	N	Median	Ave Rank	Z
OL	15	99,718	32,3	2,59
OR	3	1,475	2,0	-2,87
OVF	30	12,732	22,9	-1,04
Overall	48		24,5	

H = 12,77 DF = 2 **P = 0,002**

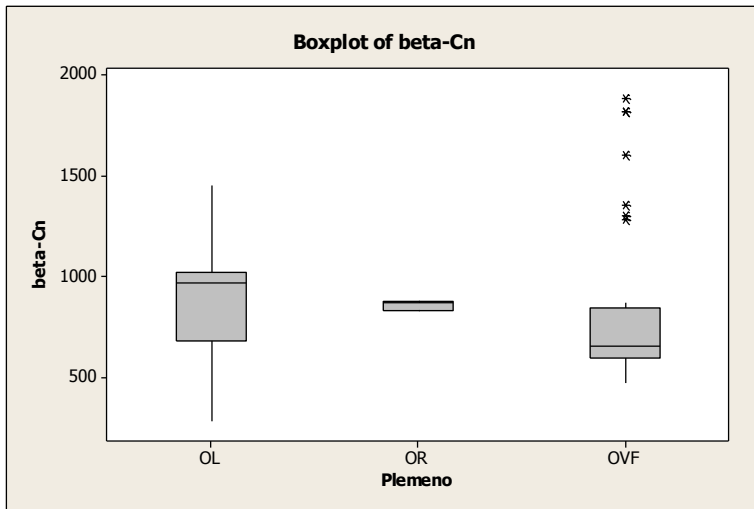
H = 12,77 DF = 2 P = 0,002 (adjusted for ties)

\* NOTE \* One or more small samples

## Descriptive Statistics: beta-Cn

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
beta-Cn	OL	843,9	340,6	281,1	680,4	968,8	1448,3	343,0
	OR	859,7	23,8	832,7	832,7	869,2	877,4	44,7
	OVF	836,8	415,2	470,7	595,2	655,9	1883,2	248,5

Graf 29: H2 Descriptive Statistics: beta-Cn



### Kruskal-Wallis Test: beta-Cn versus Plemeno

Kruskal-Wallis Test on beta-Cn

Plemeno	N	Median	Ave Rank	Z
OL	15	968,8	30,1	1,26
OR	3	869,2	33,7	0,92
OVF	33	655,9	23,5	-1,66
Overall	51		26,0	

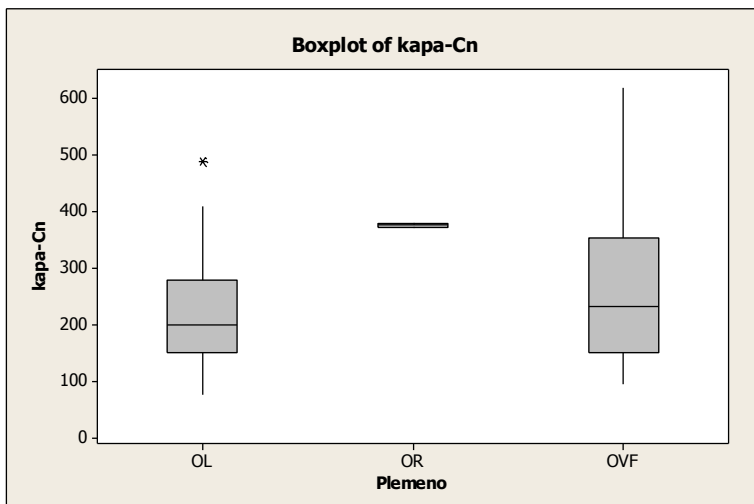
H = 2,89 DF = 2 **P = 0,236**

\* NOTE \* One or more small samples

### Descriptive Statistics: kapa-Cn

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
kapa-Cn	OL	219,8	117,2	76,4	149,6	199,0	487,7	127,1
	OR	375,54	3,32	371,91	371,91	376,31	378,42	6,51
	OVF	273,7	146,5	93,6	150,3	231,5	617,5	202,9

Graf 30: H2 Descriptive Statistics: kapa-CN





## Kruskal-Wallis Test: kapa-Cn versus Plemeno

Kruskal-Wallis Test on kapa-Cn

Plemeno	N	Median	Ave Rank	Z
OL	15	199,0	21,9	-1,28
OR	3	376,3	42,3	1,96
OVF	33	231,5	26,4	0,26
Overall	51		26,0	

H = 4,80 DF = 2 **P = 0,091**

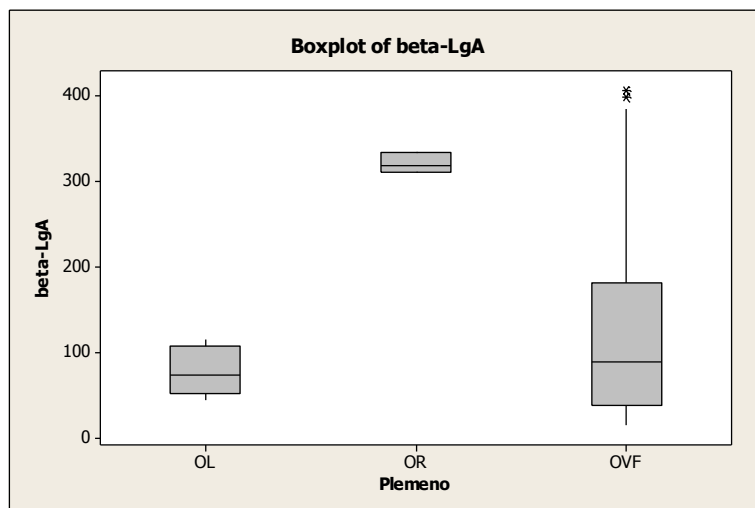
H = 4,80 DF = 2 P = 0,091 (adjusted for ties)

\* NOTE \* One or more small samples

## Descriptive Statistics: beta-LgA

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
beta-LgA	OL	76,20	28,02	44,10	51,47	73,00	114,51	55,24
	OR	321,04	11,61	310,51	310,51	319,11	333,49	22,98
	OVF	124,8	117,2	14,8	37,6	88,8	406,0	143,0

Graf 31: H2 Descriptive Statistics: beta-LgA



## Kruskal-Wallis Test: beta-LgA versus Plemeno

48 cases were used

3 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on beta-LgA

Plemeno	N	Median	Ave Rank	Z
OL	15	73,00	22,8	-0,57
OR	3	319,11	44,0	2,49
OVF	30	88,76	23,4	-0,70
Overall	48		24,5	

H = 6,23 DF = 2 **P = 0,044**

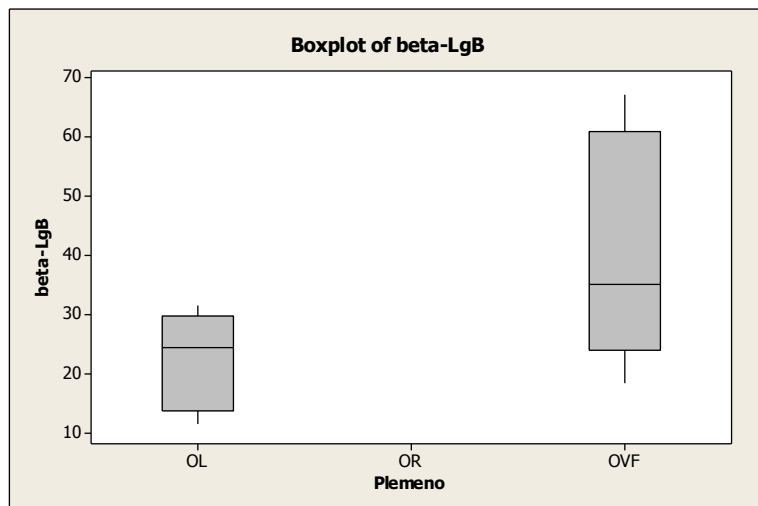
H = 6,23 DF = 2 P = 0,044 (adjusted for ties)

\* NOTE \* One or more small samples

## Descriptive Statistics: beta-LgB

Variable	měsíc	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
beta-LgB	OL	22,51	8,32	11,43	13,57	24,33	31,56	16,19
	OR	*	*	*	*	*	*	*
	OVF	41,19	17,98	18,26	23,94	35,05	67,15	36,88

Graf 32: H2 Descriptive Statistics: beta-LgB



## Kruskal-Wallis Test: beta-LgB versus Plemeno

25 cases were used  
26 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on beta-LgB

Plemeno	N	Median	Ave Rank	Z
OL	6	24,33	7,7	-2,04
OVF	19	35,05	14,7	2,04
Overall	25		13,0	

H = 4,15 DF = 1 **P = 0,042**

Pro hodnoty bílkovinných frakcí  $\alpha_{s1}$ -CN a  $\alpha$ LA (odpovídajících normálnímu rozložení) bylo třeba k ověření hypotézy H2 použít test ANOVA.

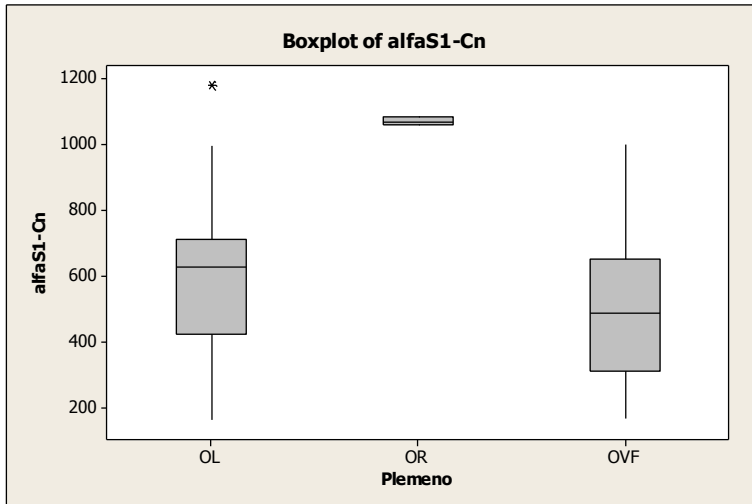
Nulovou hypotéza byla zamítnuta pro frakci  $\alpha_{s1}$ -CN ( $P < 0,05$ ). Průměrný obsah frakce  $\alpha_{s1}$ -CN v mléce jednotlivých plemen bude s 95% pravděpodobností vždy rozdílný.

Nulová hypotéza se potvrdila pro frakci  $\alpha$ LA ( $P > 0,05$ ). Průměrný obsah frakce  $\alpha$ LA v mléce jednotlivých plemen bude s 95% pravděpodobností stejný nebo podobný.

## Descriptive Statistics: alfaS1-Cn

Variable	Plemeno	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
alfaS1-Cn	OL	586,8	289,2	161,8	422,0	625,4	1177,4	289,2
	OR	1069,9	12,7	1059,5	1059,5	1066,1	1084,0	24,6
	OVF	515,0	227,7	166,2	311,0	484,5	997,3	337,0

Graf 33: H2 Descriptive Statistics: alfaS1-Cn



## One-way ANOVA: alfaS1-Cn versus Plemeno

Source	DF	SS	MS	F	P
Plemeno	2	853713	426857	7,24	0,002
Error	48	2830169	58962		
Total	50	3683882			

S = 242,8    R-Sq = 23,17%    R-Sq(adj) = 19,97%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
OL	15	586,8	289,2	(---*---)
OR	3	1069,9	12,7	(-----*-----)
OVF	33	515,0	227,7	(---*---)

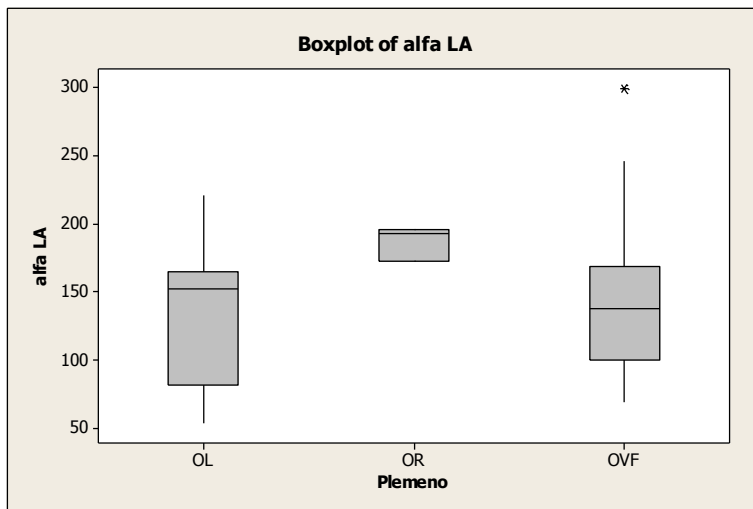
-----+-----+-----+-----+-----  
500            750            1000            1250

Pooled StDev = 242,8

## Descriptive Statistics: alfa LA

alfa LA	Plemeno	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Maximum	IQR
alfa LA	OL	133,1	59,6	53,9	81,4	151,7	220,9	83,4
	OR	186,68	12,72	172,12	172,12	192,29	195,64	23,52
	OVF	143,97	54,18	69,14	100,34	137,65	298,63	68,57

Graf 34: H2 Descriptive Statistics: alfa LA



### One-way ANOVA: alfa LA versus Plemeno

Source	DF	SS	MS	F	P
Plemeno	2	7210	3605	1,20	0,310
Error	48	143985	3000		
Total	50	151195			

S = 54,77    R-Sq = 4,77%    R-Sq(adj) = 0,80%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
OL	15	133,14	59,59	(-----*-----)
OR	3	186,68	12,72	(-----*-----)
OVF	33	143,97	54,18	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----  
120          160          200          240

Pooled StDev = 54,77

Z toho vyplynulo, že hypotéza H2 "Zastoupení bílkovinných frakcí v ovčím mléce různých plemen může být odlišné" se:

- Nepotvrdila pro bílkovinné frakce  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -CN a  $\alpha$ LA.
- Potvrdila pro bílkovinné frakce  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -LgA,  $\beta$ -LgB a  $\alpha_{s1}$ -CN.

## 10 Seznamy

### 10.1 Seznam zkratek

AMK- aminokyselina

CN- kasein

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

OL- ovce Lacaune

OR- ovce Romanovská

OVF- ovce východofříská

PSB- počet somatických buněk

Smoch- směrodatná výběrová odchylka

W- syrovátka

$\alpha$ -LA-  $\alpha$ -laktalbumin

$\beta$ -LgA-  $\beta$ -laktoglobulin A

$\beta$ -LgB-  $\beta$ -laktoglobulin B

### 10.2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Obsah živin v mléce (Velíšek, 2012)

Tabulka 2: Hlavní frakce kaseinu (Kadlec, 2012)

Tabulka 3: Bílkoviny mléčného séra (Kadlec, 2012)

Tabulka 4: Procentuální složení ovčího mléka (Roginski et al., 2003)

Tabulka 5: Podmínky gradientové eluce

Tabulka 6: Meze detekce a stanovitelnosti sledovaných analytů

Tabulka 7: Zastoupení bílkovin a bílkovinných frakcí v ovčím mléku

### 10.3 Seznam grafů

Graf 1: Celkový obsah bílkovin v mléce ( $\text{g}\cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ ) dle počtu somatických buněk, farma F1

Graf 2: Celkový obsah bílkovin v mléce ( $\text{g}\cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ ) dle počtu somatických buněk, farma F3

Graf 3: Celkový obsah bílkovin v mléce ( $\text{g}\cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ ) v bazénových vzorcích mléka

Graf 4: Zastoupení jednotlivých frakcí kaseinových bílkovin (%) v celkovém množství kaseinových bílkovin v bazénových vzorcích, dle farem a fáze laktace

Graf 5: Zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin (%) v celkovém množství syrovátkových bílkovin v bazénových vzorcích, dle farem a dle fáze laktace

Graf 6: Průměrné zastoupení jednotlivých frakcí kaseinových bílkovin (%) v bazénových vzorcích mléka, dle farem

Graf 7: Průměrné zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin (%) v bazénových vzorcích mléka, dle farem

Graf 8: Procentuálního zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí k počtu somatických buněk (F1)- % z celkového množství kaseinu

Graf 9: Zastoupení jednotlivých syrovátkových frakcí k počtu somatických buněk (F1)- % z celkového množství syrovátkových bílkovin

Graf 10: Zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí k počtu somatických buněk (F3)- % z celkového množství kaseinu

Graf 11: Zastoupení jednotlivých syrovátkových frakcí k počtu somatických buněk (F3)- % z celkového množství syrovátkových bílkovin

Graf 12: Test na normalitu rozložení alfaS1-CN

Graf 13: Test na normalitu rozložení alfaS2-CN

Graf 14: Test na normalitu rozložení beta-CN

Graf 15: Test na normalitu rozložení kapa-CN

Graf 16: Test na normalitu rozložení alfa LA

Graf 17: Test na normalitu rozložení beta-LgA

Graf 18: Test na normalitu rozložení beta-LgB

Graf 19: Descriptive Statistics: alfaS2-CN

Graf 20: Descriptive Statistics: beta-CN

Graf 21: Descriptive Statistics: beta-LgA

Graf 22: Descriptive Statistics: beta-LgB

Graf 23: H1 Descriptive Statistics: kapa-CN

Graf 24: H1 Descriptive Statistics: alfaS1-CN

Graf 25: H1 Descriptive Statistics: alfa LA

Graf 26: H1 Descriptive Statistics: alfaS1-CN

Graf 27: H1 Descriptive Statistics: alfa LA

Graf 28: H2 Descriptive Statistics: alfaS2-CN

Graf 29: H2 Descriptive Statistics: beta-CN

Graf 30: H2 Descriptive Statistics: kapa-CN

Graf 31: H2 Descriptive Statistics: beta-LgA

Graf 32: H2 Descriptive Statistics: beta-LgB

Graf 33: H2 Descriptive Statistics: alfaS1-CN

Graf 34: H2 Descriptive Statistics: alfa LA

#### *10.4 Seznam příloh*

Příloha 1: Test normality rozložení

Příloha 2: Důkaz hypotézy H1

Příloha 3: Důkaz hypotézy H2