

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Zootechnických věd

Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

Diplomová práce

Asociační analýza vybraného lokusu ovlivňujícího technologickou jakost kravského mléka

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Autor diplomové práce: Bc. Petra Nováková

České Budějovice, 2017

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra NOVÁKOVÁ**
Osobní číslo: **Z15398**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Asociační analýza vybraného lokusu ovlivňujícího technologickou jakost kravského mléka**
Zadávající katedra: **Katedra zootechnických věd**

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

Běžnou součástí šlechtění hospodářských zvířat se stává využití molekulárně genetických metod. Dojený skot je v tomto ohledu prioritou. Provádí se genotypizace jednoduchých bodových polymorfismů na čípech, dále potom o genotypizace kandidátních lokusů, genů velkého účinku. Cílem těchto postupů je určit genotypovou hodnotu zvířete na genové úrovni, což umožňuje zpřesnit selekci a výrazně zkrátit generační interval. Diplomová práce se bude týkat genotypizace kandidátních lokusů.


Cílem diplomové práce je provést genotypizaci kandidátního lokusu s potenciálním vztahem k užitkovým vlastnostem dojeného skotu.

Zavedete metodiku pro laboratorní analýzu kandidátního lokusu. Provedete genotypizaci panelu krav. Výběr lokusu provede vedoucí práce v závislosti na aktuální potřebě tak, aby výsledky bylo možné použít pro zpracování komplexní analýzy. Provedete asociační analýzu vztahu genotypů resp. alel k vybraným ukazatelům kvality mléka. Datové soubory vyhodnotíte vhodnými statistickými metodami. Provedete interpretaci zjištěných výsledků.

Rozsah grafických prací: 4 tabulky, 2 grafy
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

Vlášková H., Trešlová H. (2008): Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Sborník textů. Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha.
Cecchinato A., Chessa S., Ribeca C., Cipolat-Gotet C., Bobbo T., Casellas J., Bittante G. (2015): Genetic variation and effects of candidate-gene polymorphisms on coagulation properties, curd firmness modeling and acidity in milk from Brown Swiss cows. *Animal*, 9, 1104-1112, DOI: 10.1017/S1751731115000440.
Mao Y. J., Zhu X. R., Xing S. Y., Zhang M. R., Zhang H. M., Wang X. L., Karrow N., Yang L. G., Yang Z. P. (2015): Polymorphisms in the promoter region of the bovine lactoferrin gene influence milk somatic cell score and milk production traits in Chinese Holstein cows. *Res. Vet. Sci.*, 103, 107-112, DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.09.021.

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.
Katedra zootechnických věd
Konzultant diplomové práce: Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.
Katedra zootechnických věd
Datum zadání diplomové práce: 29. března 2016
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2017


prof. Ing. Milošlav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA 
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1898, 370 06 České Budějovice

L.S.


doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 29. března 2016

Prohlášení

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

Datum:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda srdečně poděkovala panu prof. Ing. Čítkovi, CSc., za cenné rady a odborné konzultace při vypracovávání mé diplomové práce. Dále bych chtěla vřele poděkovat paní Ing. Hanusové Ph.D za odborné vedení při laboratorních metodách.

Abstrakt

Práce vznikla ke studiu vlivu mléčného proteinu betalaktoglobulinu na syřitelnost mléka. Na základě polymorfismů v β -laktoglobulinovém genu (*BLG*) byly stanoveny metodou PCR-RFLP genotypy *AA*, *AB* a *BB* u 730 dojnic. Výsledky analýzy genotypů ukazují, že ve zkoumané populaci jsou heterozygoti *AB* přibližně jedenáctkrát četnější než homozygoti *BB* a třicetkrát častější než homozygoti *AA*. Frekvence alely *A* byla 0,4732 a pro alelu *B* 0,5268. Celkem u 429 vzorků byl analyzován vliv genotypů *BLG* na znaky produkce mléka. Pouze u jedné skupiny dojnic z farmy Sedlec se podařilo nalézt statisticky průkazný vliv alely *B* na procentuální zastoupení bílkovin a na celkové množství bílkovin. Alela *B* byla spojena s nižšími hodnotami těchto parametrů. U žádného jiného měření nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ovlivněný genotypy či alelami genu *BLG*. V této práci bylo testování syřitelnosti metodou měřením času sýření a jogurtovým testem provedeno zatím u 51 vzorků. Výsledky ukazují, že genotypy *BLG* neměly statisticky významný vliv na čas sýření. Ve výsledcích jogurtového testu se projevil vliv genotypů, *p*-hodnota je nižší než zvolená hladina významnosti $\alpha = 0,05$. To by mohlo znamenat, že genotyp *AB* je spojen s vyšší kyselostí mléka. Avšak výsledky mohly být ovlivněny nižší četností souboru.

Klíčová slova: mléčný protein, genetický polymorfismus, betalaktoglobulin, *BLG*

Abstract

The aim of the thesis is to study the influence of the milk protein beta-lactoglobulin on the milk renneting properties. Based on the polymorphisms in β -lactoglobulin gene (*BLG*), the genotypes *AA*, *AB* and *BB* were defined by the method PCR-RFLP in the case of 730 dairy cows. The results of the genotypes analysis show that in the studied population the heterozygotes *AB* occur approximately eleven times more often than homozygotes *BB* and thirty times more often than homozygotes *AA*. The allele *A* frequency was 0.4732 and the allele *B* 0.5268. The genotype *BLG* influence on production traits of milk was analysed in the aggregate of 429 milk samples. The statistically demonstrative allele *B* influence on the percentage of proteins representation was found only in one group of dairy cattle from farm Sedlec. The alleles *BB* were associated with lower values of these parameters. The statistically significant difference influenced by the genotypes or the gene *BLG* alleles was not found in any other measurement. In the thesis the testing of milk renneting properties by the rennet coagulation time (RCT) and the determination of titratable acidity in milk was made on 51 samples. The results show that the *BLG* genotypes had no influence on the RCT. In the determination of titratable acidity in milk results the genotype influence appeared and the p-value is lower than the given significance level $\alpha = 0.05$. It could mean that the *AB* genotype is connected with the higher milk acidity. However, the results can be distorted by the low numbers of the population.

Key words: milk protein, genetic polymorphism, betalactoglobulin, *BLG*

Obsah

1

Úvod.....	10
2 Literární	
přehled.....	11
2.1 Bovinní	
genom.....	11
2.1.1 Lokusy kvantitativních znaků	12
2.1.2 Kandidátní geny	12
2.1.3 Genetické markery	13
2.1.4 Asociační analýza.....	14
2.2 Geny mléčných bílkovin.....	14
2.2.1 Polymorfismy mléčných bílkovin.....	16
2.3 Mléko.....	17
2.3.1 Spotřeba mléka a mléčných produktů	18
2.3.2 Základní složky mléka	20
2.4 Mléčné proteiny.....	21
2.4.1 Kaseinové proteiny	23
2.4.2 Syrovátkové proteiny	23
2.4.2.1 Betalaktoglobulin	24
2.5 Locus pro β -laktoglobulin.....	25
2.6 Technologické vlastnosti mléka.....	26
2.6.1 Syřitelnost mléka.....	27
2.6.1.1 Čas syření (RCT) a pevnost syřeniny (E ₃₀).....	28
2.6.1.2 Vliv plemene na ukazatele syřitelnosti.....	29
3 Materiál a metodika.....	31
3.1 Materiál.....	31
3.2 Laboratorní metody.....	31
3.2.1 Izolace DNA z mléka	31
3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	31
3.2.3 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP).....	32
3.2.4 Testování syřitelnosti	33
3.2.5 Statistické vyhodnocení	33
4. Výsledky a diskuze.....	34

4.1 Výsledky genotypizace.....	34
4.2 Alelické a genotypové frekvence.....	34
4.3 Vliv genotypů β -laktoglobulinu na produkci a složení mléka.....	36
4.4 Vliv genotypu β -laktoglobulinu na syřitelnost mléka.....	40
5. Závěr.....	41
6. Seznam zkratk.....	43
7. Použitá literatura.....	44

1 Úvod

Mléko je jedním z nejdůležitějších živočišných produktů. Pro lidskou populaci má mléko i mléčné produkty význam jako jedna ze základních potravin. Se zvyšující se celosvětovou spotřebou kravského mléka k technologickému zpracování a k produkci sýrů je třeba hledat možnosti selekce skotu na složení mléka vhodného k vysoké sýrařské produkci.

Mléčné proteiny jsou široce zkoumány z důvodu jejich vztahu se složením, nutričními i technologickými vlastnostmi mléka. Byly objeveny a zkoumány polymorfismy mléčných proteinů ovlivňující jejich složení i množství. To jsou zásadní faktory pro výtěžnost a kvalitu mléčných či sýrařských produktů. Geny kódující kaseinové a syrovátkové proteiny poléhají mendelistické dědičnosti. Proto lze selektovat krávy s požadovanými variantami proteinů. Polymorfismy mléčných proteinů mohou být jedním z možných kritérií selekčních programů na změnu mléka příznivou pro složení mléka a technologické zpracování. V několika studiích bylo dokázáno, že obzvláště genotypy podmiňující produkci κ -kaseinu a β -laktoglobulinu mají signifikantní efekt na složení mléčných proteinů.

V této práci je zkoumána možnost využití vlivu proteinu betalaktoglobulinu (BLG) na syřitelnost mléka. Parametry syřitelnost jsou vysoce ovlivněné genetickými polymorfismy mléčných proteinů a zároveň jejich složením.

2 Literární přehled

2.1 Bovinní genom

Bovinní genom je významný zejména s ohledem na unikátní biologii přežvýkavců, evoluční pozici skotu ve vztahu k dalším přežvýkavcům a důležitost přežvýkavců v lidské výživě jako zdroje bílkovin.

Domestikace skotu začala přibližně před 8 000 – 10 000 lety na Blízkém východě a početní růst chovaného skotu zrcadlil expanzi lidské populace. Během let domestikace a šlechtění se lidem podařilo z různých sociálních, ekonomických a náboženských důvodů vyšlechtit přes 800 plemen skotu. Ty představují důležité kulturní dědictví i vzácný zdroj pro vědecké studie (Tellam, 2009). Je zajímavé, že jak byl boviní genom přetvářen lidskou selekcí, byl zároveň v reakci na domestikaci přežvýkavců přizpůsoben i lidský genom na toleranci laktózy (Tishkoff, 2007).

Itoh *et al.* (2003) uvádí, že boviní genom obsahuje 29 párů autozomů a jeden pár gonozomů. Bovinní genom začal být podrobně studován v 70. letech 20. století řadou projektů, jejichž cílem bylo odhalit organizaci chromozomů, objevit mikrosatelity, mapovat genom a sestavit fyzické a vazebné genomové mapy (Larkin, 2011). První vzorek, ze kterého byla získána DNA pro sekvenování boviního genomu, odebrali vědci z krávy plemene Hereford L1 Dominette 01449 (Zhu, 2007).

Výsledky mezinárodního šestiletého projektu sekvenování boviního genomu uvádí velikost genomu 2,87 Gb. Bovinní genom obsahuje více než 22 000 genů, z nichž 1 400 genů je společných pro všechny druhy savců (Elsik, 2009). Data ze sekvenování a mapování genomu dala vzniknout databázím jako například Bovine Genome database (BGD), která pod sebou shromažďuje navigační nástroje a vyhledávače jako například BovineMine, JBrowse/WebApollo, BLAST (Elsik, 2015). Podrobné informace o boviním genomu, genech a jejich bílkovinných produktech lze nalézt v GenBank. Následné mapování s vysokým rozlišením a funkční analýza genomu vedly k objevu lokusů kvantitativních znaků (QTL) stejně jako genů řídících genetická onemocnění skotu.

Zkoumání boviního genomu je vedeno především snahou porozumět genetické povaze kvantitativních znaků a onemocnění, která zasahují do ekonomicky významných vlastností, jako je množství mléka či kvalita masa (Larkin, 2011).

Plemena skotu mají velkou fenotypovou rozmanitost, kterou lze využívat ke zlepšování specifických vlastností důležitých z hlediska produkce a zpracování mléka (Ortega, 2010).

Arias *et al.* (2009) ve své práci uvedl mapu vazby genů bovinního skotu s vysokou hustotou, která kombinuje vazbovou mapu založenou na mikrosatelitech se jednobodovými mutacemi (SNP), nalezenými pomocí čipu. Na této mapě se nachází celkový počet markerů 6 924 a z toho je 6 634 SNP. Výsledky z této mapy mohou napomoci výzkumu vztahů mezi fyzickými vzdálenostmi, vazebnou nerovnováhou a vzdáleností na genetické mapě. To by zlepšilo určování kauzálních vztahů mezi variantami genomu a znaky produkce u zvířat.

2.1.1 Lokusy kvantitativních znak

Lokus kvantitativních znaků (QTL) je oblast chromozomu, která obsahuje geny ve vazbě ovlivňující kvantitativní znak (Erickson, 2004). Pokud tyto znaky odpovídají za ekonomicky významné produkční vlastnosti, říkáme těmto QTL ekonomicky významné lokusy (ETL). Analýza QTL umožňuje vědcům v různých oborech spojit určité složité fenotypy se specifickými oblastmi chromozomů. Cílem tohoto procesu je identifikovat akci, interakci, číslo a přesnou polohu těchto regionů. Geny ležící v QTL oblasti jsou často ovlivněny vnějším prostředím, jejich heritabilita se pohybuje od 0,05 až 0,5. Přesný počet, polohu ani účinek QTL není prozatím znám (Roff, 2007).

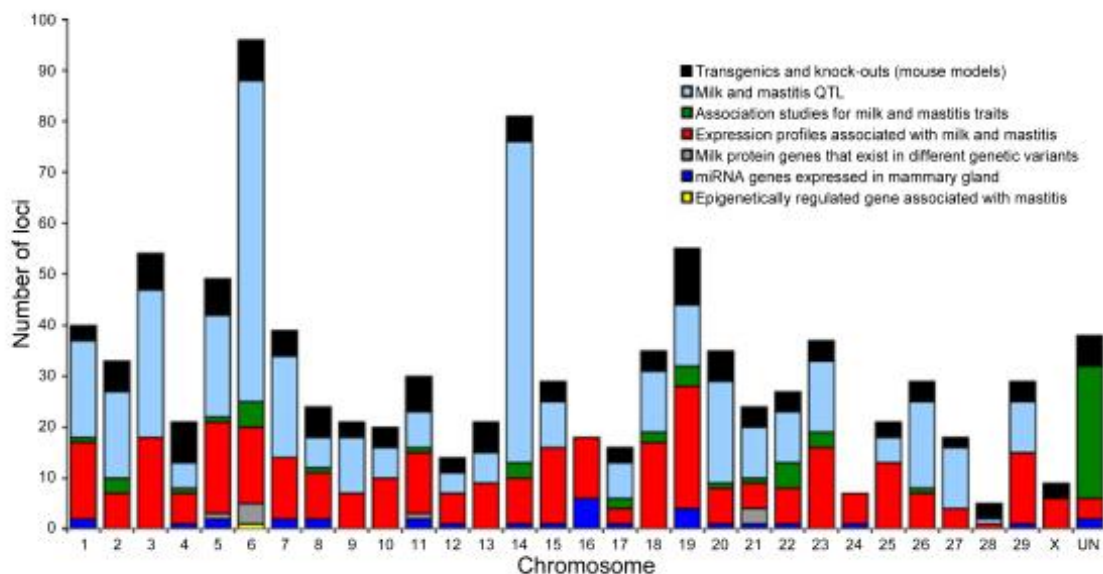
2.1.2 Kandidátní geny

Kandidátní geny mají výrazný vliv na určitou zkoumanou vlastnost či znak, ovlivňují výsledný fenotyp a podílejí se na fenotypové variabilitě. Nacházejí se v QTL oblastech a slouží k lepšímu pochopení funkce genů. Kandidátní geny se zkoumají metodami sekvenování, pokud je při něj nalezena mutace či polymorfismus, provede se asociační analýza. Ta určí, zda má zkoumaný gen vliv na znak (Berg, 2006). Vhodné kandidátní geny jsou obecně vybrány na základě známého biologického, fyziologického nebo funkčního významu pro daný znak. Genomové asociační studie a mapování QTL zkoumají běžné variace v celém

genomu a jako takové mohou detekovat novou oblast zájmu, která je v potenciálním kandidátském genu nebo v jeho blízkosti (Zhu, 2007).

Existuje databáze bovinních kandidátních genů pro produkci mléka a zánět mléčné žlázy, která má za účel poskytovat integrovaný výzkumný nástroj. Zahrnuje různé typy informací a podporuje genetický výzkum laktace, zdraví a vývoj mléčné žlázy. Databáze obsahuje 943 genů a genetických markerů, které se podílejí na vývoji a funkci mléčné žlázy, což představuje kandidáty na další funkční studie. Pro identifikaci kandidátských lokusů byly využity údaje ze sedmi různých výzkumných přístupů. Bylo navrženo 44 genů zjištěných několika nezávislými analýzami jako nejslibnější kandidáti a byly dále analyzovány *in silico* pro hladiny exprese mléčné žlázy, genetickou variabilitu a vrcholné biologické funkce ve funkčních sítích (Ogorevc, 2009).

Obr.1 Přehled počtů kandidátních genů a genetických markerů pro vývoj mléčné žlázy, znaky mléčné produkce a rezistence vůči zánětu mléčné žlázy nalezené na chromozomech bovinního genomu



2.1.3 Genetické markery

Genetický marker je definován jako specifický gen, krátký úsek DNA nebo polymorfismus, který je snadno identifikovatelný. Marker kóduje detekovatelnou

vlastnost s neznámou funkcí a se známým umístěním na chromozomu. Tento gen či úsek může být použit ke studiu rodiny a populace, identifikace buněk, druhů nebo jedinců. Výhodou markerů je jejich velké množství, vysoká informativnost a detekce z nepatrného množství tkáně. (Davey, 2011).

Genetické markery mohou být použity ke studiu vztahu mezi zděděným onemocněním a jeho genetickou příčinou (například určitou mutací genu, který vede k defektnímu proteinu). Je známo, že kousky DNA, které leží blízko sebe na chromozómu, mají tendenci být děděny společně. Tato vlastnost umožňuje použití genetického markeru k přesnému určení dědičného vzoru genu (Zhu, 2007).

2.1.4 Asociační analýza

Asociační analýza slouží k testování vazeb mezi genetickou variabilitou a daným znakem. Jedná se tedy o asociaci mezi konkrétní alelou, genotypem, či haplotypem a fenotypovým znakem. Při analýze dochází k porovnání relativního zastoupení polymorfismu mezi několika skupinami (Bell, 2004). Dále se provádějí ještě vazebné studie, při kterých se sbírají data od velkého počtu příbuzných jedinců, o nichž se předpokládá, že mají odlišnost v určitém genu či jeho polymorfismech. Tyto polymorfismy ovlivňují vznik daného znaku a následnou analýzu přenosu v příbuzenských liniích (Teplan, 2006).

2.2 Geny mléčných bílkovin

Nejvýznamnější vztah k parametrům mléčné užitkovosti a kvality mléka mají mléčné bílkoviny a jejich genetické založení. Bílkoviny mléka syntetizuje, až na sérový albumin a imunoglobuliny, mléčná žláza. Jsou jedinečné a mají zastoupení všech esenciálních aminokyselin (Samková, 2012). V mléce se vyskytuje několik desítek mléčných proteinů, většinu z nich kóduje pouze šest strukturních genů. Jedná se o čtyři geny *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* a *CSN3* mapované na šestém chromozomu, které kódují příslušné bílkoviny α 1-CN, β -CN, α 2-CN, and κ -CN. Další dva geny *LAA* a *BLG* umístěné na chromozomech 5 a 1 kódují dva hlavní syrovátkové proteiny α -laktalbumin (α -LA) a β -laktoglobulin (β -LG). U mléčných proteinů skotu byla objevena rozsáhlá genetická variabilita. Důsledek účinků variant mléčných genů představují rozdíly ve vlastnostech mléka, zvláště v jeho složení (Caroli, 2009). Geny mléčných bílkovin jsou vysoce polymorfní, obsahují neobvykle velké množství

polymorfismů (Huang, 2012).

Caroli *et al.*, 2009 zveřejnil objevené varianty mléčných proteinů. Popsáno bylo doposud devět variant α_{s1} -CN (A, B, C, D, E, F, G, H, I), čtyři varianty α_{s2} -CN (A, B, C, D), 12 variant β -CN (A^1 , A^2 , A^3 , B, C, D, E, F, G, H^1 , H^2 , I), 14 variant κ -CN (A, A^1 , B, B^2 , C, D, E, F^1 , F^2 , G^1 , G^2 , H, I, J), 11 variant β -LG (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W) a tři varianty α -LA (A, B, C).

Variabilní efekt genů na mléčnou produkci a složení mléka byl sledován už v mnoha studiích (Hastings *et al.*, 2006; Comin *et al.*, 2008; Signorelli *et al.*, 2009; Krasnopiorova *et al.*, 2012). Ve skutečnosti geny většinou nefungují samostatně, ale mají úzké vazby a interakce s mnoha dalšími geny v genomu. Některé z těchto genů jsou zapojeny do regulace exprese. Zejména jsou to geny kvantitativních znaků. Tím pádem efekt genů závisí na genetické struktuře. Hlavním příčinou kolísání efektu genů zapříčiňuje především aditivní a dominantní efekt genů. Navíc fyzické vazby genů umístěných na stejném či jiném chromozomu vedou k odlišným expresím. Vazebná nerovnováha (LD) genů nastává, když je nalezena asociace alely na jednom lokusu se specifickou alelou na druhém lokusu. LD typicky odkazuje na vztahy mezi dvěma alelami na stejném chromozomu, avšak asociovány mohou být i alely na dvou lokusech různých chromozomů. Proto by měla být LD analyzována mezi všemi geny bez ohledu na jejich umístění. Negativní a pozitivní účinky genů záleží tedy na jejich vlastnostech a genotypu (Heidari, 2009).

Předchozí teorie o vzájemném působení genů a jejich exprese ve vztahu k mléčné produkci se potvrdila ve studii Heidari *et al.* (2009). Zde byl mimo jiné podrobně hodnocen společný efekt genotypu genu pro betalaktoglobulin (*BLG*) a genu růstového hormonu (*GHI*). Jako nejvíce přínosná se ukázala být kombinace genotypů AAVV. Tyto genotypy měly nejvyšší účinek na produkci mléka a mírný efekt na mléčný protein. Ze studie vyplývá, že by se genotypy AAVV genů *BLG* a *GHI* mohly stát nejvhodnější variantou pro šlechtitelský program s cílem zlepšení mléčné produkce a mléčného proteinu. Avšak hladina tuku je u těchto genotypů snižena.

Pokud se zaměříme na kompozici genotypů genů *BLG* a *GHI*, hlavní jeho efekt může být způsoben produktem *GHI*, růstovým hormonem. Předpokládá se, že tento polypeptid má za následek vzrůst sekrece hormonů a zvyšuje odklon živin z tělních zásob do mléčné žlázy (Heidari, 2009). Takovýto proces by mohl stimulovat

mléčnou produkci a množství aminokyselin vstupujících do proteosyntézy. To vede ke zvýšené tvorbě proteinu betalaktoglobulinu. Ačkoli role genu *BLG* zůstává stále nejasná, některé předešlé studie (Doosti *et al.*, 2011; Heidari *et al.*, 2009) objevily průkazný efekt genu na množství betalaktoglobulinu v mléce. Díky tomu, že mají oba geny účinek na stejnou vlastnost, dochází k interakci (Moole, 2015).

2.2.1 Polymorfismy mléčných bílkovin

Genové polymorfismy lze charakterizovat jako existenci dvou či více alternativních nukleotidů v dané poloze v genomu populace. Jsou výsledkem jednonukleotidového polymorfismu (SNP) nebo nukleotidové delece či inserce (Caroli, 2009). Jednotlivé nukleotidové substituce mohou změnit kvantitativní rozdíly genové exprese a produktu. Polymorfismy v kódující části genu mají za následek posun či delecí aminokyselin v polypeptidovém řetězci a změny výsledné proteinové struktury. U polymorfismů v nekódujících regionech genů mléčných bílkovin se předpokládá vliv na transkripci těchto genů. Polymorfismy genů mléčných proteinů ovlivňují jak rozdíly v expresi jednotlivých genů, tak i fyzikálně-chemické vlastnosti proteinů, což se projevuje zvláště při technologickém zpracování mléka (Hallén, 2008). Polymorfismy tedy vytváří různé varianty proteinů, které mají následně vliv na produkční vlastnosti, nejvíce pak na vlastnosti týkající se výroby sýra (Caroli, 2009). Podle studií Bonfatti *et al.* v rocích 2010 a 2011 polymorfismy, složení mléčných proteinů a relativní zastoupení frakcí mléčných proteinů ovlivňují syřitelnost mléka a produkci sýra. Polymorfismus, který je SNP a je detekován na úrovni nukleotidů, by mohl být využíván, pokud je spojen s některými ekonomicky významnými znaky produkce. Použití SNP jako detekovatelných molekulárních markerů, pokud se osvědčí, je slibnou alternativou ke stávajícím metodám selekce na produkční vlastnosti. Účinnost selekce však závisí na alelických frekvencích u plemen a na účinku těchto polymorfismů na vybrané znaky (Karimi, 2009).

Některé polymorfismy mléčných proteinů jsou spojovány s příznivými změnami produkčních vlastností, složení mléka či technologických vlastností mléka. Geny mléčných bílkovin se dají úspěšně použít jako genetické markery při selekci mléčného skotu (Doosti, 2011). Například lokus *BLG* má podle výzkumu Badola *et al.* (2003) významný vliv na výtěžek sýra, vyšší produkce sýra byla

zaznamenána u heterozygotů tohoto genu. Ve většině výzkumů se k určení genotypů využívá polyakrylamidové elektroforézy, polymerázové řetězová reakce (PCR) a polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP).

Nepřímou selekcí by se daly zlepšit vlastnosti mléka důležité pro sýrařství, a to upřednostněním určitých alel v místech mléčných proteinů, které jsou spojeny s lepší syřitelností mléka (Ikonen, 2000). Například že α s1-kasein významně ovlivňuje celkový obsah proteinů, zatímco genotypy κ -kaseinu mají vliv na obsah kaseinových proteinů, obsah celkových bílkovin, stejně jako na pevnost sýřeniny. Dále bylo zjištěno, že genotypy β -kaseinu jsou spojeny s výtěžkem tuku, procentuálním zastoupením tuku a bílkovin a pevností tvarohu (Cassandro, 2007).

2.3 Mléko

Mléko je bílá průsvitná tekutina vylučovaná z mléčné žlázy samic savců, primárně určená k výživě mláďat. Obsahuje téměř všechny nezbytné složky pro udržení života (Belitz, 2004).

Po celém světě je pro lidskou spotřebu využíváno mléko z nejrůznějších zdrojů například kozí, ovčí, buvolí, velbloudí, kobyli a mléko od dalších savců, ale komerční produkci dominuje mléko kravské. V roce 2011 patřilo 85 % celosvětové produkce mléka právě mléku kravskému (Gerosa, 2012).

Mléko tvoří vysoce hodnotnou složku lidské výživy jako jedna z nejlépe vyvážených potravin. Díky velice širokému spektru mléčných produktů zaujímá výjimečné místo mezi potravinářskými produkty (Samková, 2012).

Mléko a produkty z něj mají svůj velký a nepopiratelný význam ve výživě člověka. Jedná se o velice dobře vyváženou potravinu, výborný zdroj vápníku. Je dobře stravitelné a slouží i jako velmi dobrý substrát pro kulturní mikroorganismy (Belitz, 2004). Technologie zpracování mléka nabízí široké spektrum možností a nepřeborné množství výsledných potravin.

Tvorba mléka probíhá nepřetržitě v mléčné žláze, konkrétně v sekrečních buňkách mléčného parenchymu. Látky jsou přiváděny z krve a pro vytvoření jednoho litru mléka musí mléčnou žlázou projít přes 500 litrů krve (Tančin, 2013).

Faktory působící na mléčnou užitkovost a složení mléčných složek se liší tím, zda jsou podmíněné dědičným založením či prostředím. Tyto faktory se navzájem

kombinují a ovlivňují užitečnost každého zvířete. Mezi vlivy geneticky podmíněné řadíme druh zvířete, plemennou příslušnost a individuální genetické založení dojnice. Vlivy prostředí mají významné zastoupení při vlivu na produkci a složení mléka a je třeba jim přisuzovat velký důraz. Řadí se mezi ně výživa, sezónnost, zdravotní stav dojnice, typ chovu, chovatelská péče, věk při prvním otelení, věk a pořadí laktace, stádium laktace a další (Chandan, 2007).

2.3.1 Spotřeba mléka a mléčných produktů

Produkce mléka i objem mléka použitého pro mléčnou výrobu celosvětově stoupá. Pro představu, spotřeba mléka pro technologické zpracování tvořila v roce 2012 přibližně 405 mil tun z celkové produkce mléka 637 mil tun, jak je uvedeno v tabulce 1. Tento růst vede ke zvýšení důrazu na kvalitu příslušných technologických vlastností mléka používaného pro mléčnou výrobu (Cecchinato, 2015).

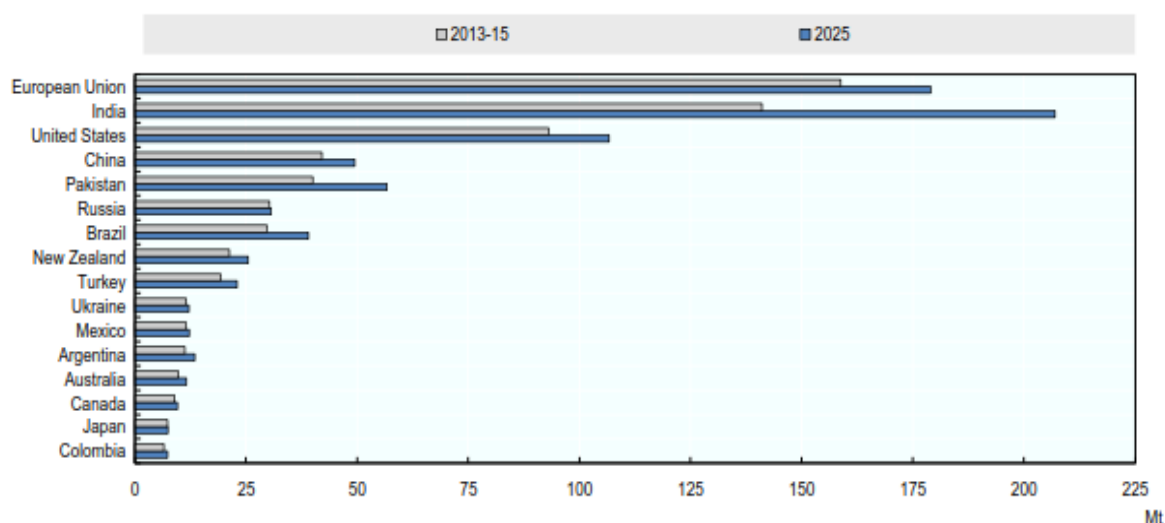
Tab. 1 Spotřeba mléka pro technologické zpracování v roce 2012 (zdroj Bull. IDF 470/2013)

Oblast	Objem zpracovaného mléka (mil. tun)	Roční růst 2012:2011 (%)
EU	140,3	+0,6
USA	90,4	+2,1
Čína	27,9	+1,8
Brazílie	23,0	+2,5
Nový Zéland	20,5	+8,5
Rusko	18,8	+5,9

Odhad předpokládaného zvýšení celosvětové produkce mléka do roku 2025 se pohybuje kolem 23 %, což by znamenalo nárůst produkce o 117 mil tun oproti průměru roků 2013-2015 viz obrázek 1. Většina tohoto růstu přibližně 73 % se očekává z rozvojových zemí, zejména Indii a Pákistánu (OECD/FAO, 2016).

Zpracování mléka na čtyři hlavní mléčné výrobky máslo, sýr, sušené mléko (WMP) a odtučněné sušené mléko (SMP) se na světové úrovni zvyšuje poměrně podobně jako výroba mléka. Sušená mléka mají nejvyšší růst, překonávají růst světové produkce mléka, který činí zvýšení o 1,8 % z celkové produkce ročně. Zatímco SMP má roční růst o 2,0 % a WMP o 2,1 % ročně. Produkční růst másla a sýrů je pomalejší, 1,7% a 1,4% ročně. Údaje jsem spočteny za roky 2013-2015.

Obr. 1 Spotřeba mléka v hlavních světových zemích (zdroj: OECD/FAO (2016), “OECD-FAO Agricultural Outlook”, OECD Agriculture statistics (database))



Nárůst produkce a spotřeby mléka s omezenou možností zvětšováním stád je podmíněn zlepšováním kvality genetického základu skotu. Pomoci může objevení genů ovlivňující vyšší produkci či lepší výtěžnost sýra a jejich použití k selekci.

2.3.2 Základní složky mléka

Chemické složení mléka a jeho chemicko-fyzické vlastnosti ovlivňují kvalitu mléka a jeho vlastnosti při technologickém zpracování. Kvalita mléka má tedy přímý vliv na kvalitu produktů z něj (Chandan, 2007). Proto je na složení a kvalitu mléka brán velký zřetel, přímo v dojných chovech i při výkupu mléka a před technologickým zpracováním.

Mléko je koloidní roztok globulí mléčného tuku a vody, která obsahuje rozpuštěné sacharidy, proteiny a minerály. Obsah vody se pohybuje podle druhu a původu mléka v širokých mezích. Kravské mléko obvykle obsahuje 87-91 % vody a 8,5-9 % tukuprosté sušiny (Velíšek, 2009).

Veškeré mléčné složky mají za hlavní funkci podporovat růst a vývin mláďat. Proto jsou ve složení mléka důležité energetické živiny, esenciální mastné kyseliny, vitamíny, stopové prvky a biosyntéza neesenciálních aminokyselin (Fox, 1995). Průměrný procentuální obsah složek kravského mléka je uveden v tabulce 2.

Tab. 2 Průměrný obsah živin v kravském mléce (Velíšek, 2009)

Mléčná složka	Obsah v %
Proteiny celkem	3,2
Kaseiny	2,6
Proteiny syrovátky	0,6
Tuky	3,9
Sacharidy	4,6
Minerální látky	0,7

Základní složky mléka se dělí na dvě hlavní kategorie. Tu první tvoří původní složky, kde se mezi hlavní uvádí voda, laktóza, tuk a bílkoviny. Tyto složky jsou zastoupeny ve větším množství a mají hlavní vliv na kvalitu a vlastnosti mléka. Tabulka 3 ukazuje rozdíly v obsahu původních složek mléka různých druhů zvířat a člověka. Mezi vedlejší původní složky patří vitamíny, minerální látky, hormony, enzymy, somatické buňky a plyny. Nepůvodní složky mléka zastupují rezidua veterinárních léčiv, insekticidy, herbicidy, fungicidy, těžké kovy či dezinfekční prostředky. Tyto látky mohou negativně ovlivňovat kvalitu mléka a ohrozit zdravotní nezávadnost mléka a tím ohrozit zdraví lidí. Proto se obsah nepůvodních složek v mléce sleduje při pravidelných odběrech a kontrolách (McCance, 2008).

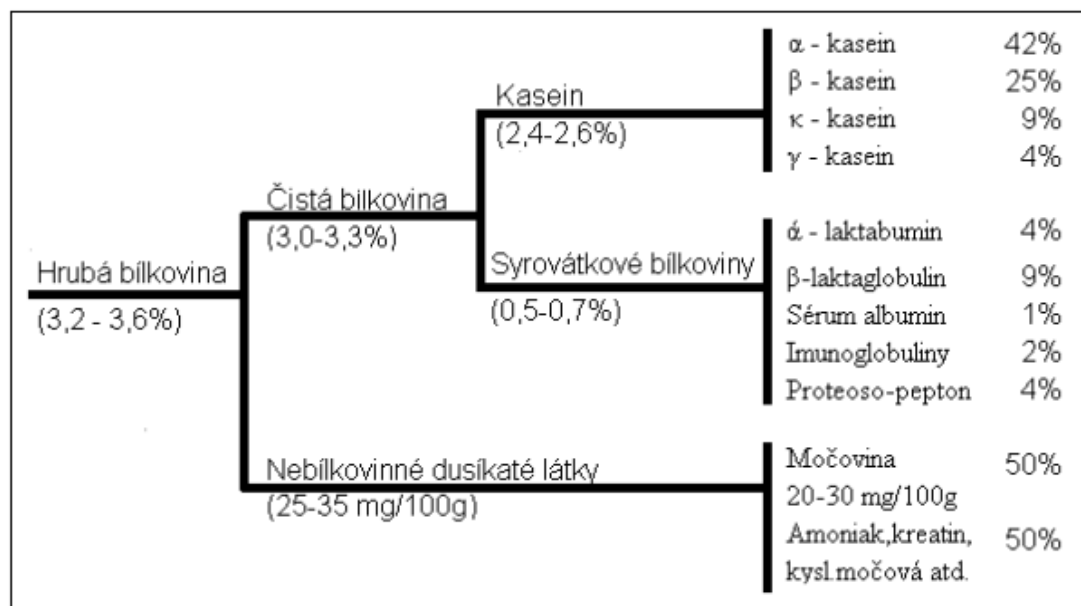
Tab. 3 Průměrný obsah hlavních původních složek v procentech v mléce savců
(zdroj:Savci upol.cz, 2002)

	voda	tuk	bílkoviny	cukr	popeloviny
skot	87,5	3,8	3,3	4,7	0,8
koza	86,8	4,25	3,8	4,6	0,8
ovce	80	8,9	5,9	4,5	0,9
prase	81	6,2	5,9	4,5	1,1
kůň	88,9	1,9	2,5	6,2	0,5
člověk	87	4,3	1,4	4,5	0,2

2.4 Mléčné proteiny

Složitý mléčný komplex dusíkatých látek tvoří proteiny mléka, proteiny obalů tukových kuliček, minoritní bílkoviny, enzymy a nebílkovinné dusíkaté látky. Jejich rozdělení a procentuální zastoupení je uvedeno v tabulce 4.

Tab. 4 Rozdělení a zastoupení základních dusíkatých látek (Ingr, 2001)



V mléce se vyskytují stovky proteinů, naprostá většina z nich pouze ve stopovém množství (Chandan, 2007). Složení a množství proteinové frakce se liší s ohledem na plemeno, fázi laktace, pořadí laktace, roční období, výživu a zdraví a individuálním genetickým založením genů. Genetické varianty mléčných proteinů se řadí mezi faktory ovlivňující technologické vlastnosti kravského mléka a vykazují mendelistickou dědičnost. Lze tedy uvažovat o zlepšení koagulačních vlastností přímou selekcí na vhodné genetické varianty mléčných proteinů (Hallén, 2008).

Dusíkaté látky v mléce zásadně řídí fyzikální a chemické vlastnosti mléka. Některé dusíkaté látky jako například imunoglobuliny, laktoferin, enzymy a jiné mají kromě nutriční hodnoty vysoce významné biologické funkce (Gajdůšek, 2003).

Mléčné proteiny jsou směsí dvou hlavních typů, a to kaseinových a syrovátkových neboli sérových proteinů. Kaseinové proteiny jsou v celkovém obsahu zastoupeny přibližně z 80 % a syrovátkové ze zbývajících 20 % (Velíšek, 2009). Tato klasifikace na dvě velké složky proteinů vychází z kyselého srážení mléka. Syrovátkové bílkoviny jsou klasifikovány jako rozpustné i při pH 4,6, zatímco kaseinové se při stejné hodnotě pH sráží (Chandan, 2007). Mléko přežvýkavců obsahuje více než 75 % kaseinových bílkovin a je označováno jako kaseinové. Oproti tomu monogastři mají obsah kaseinových bílkovin menší a jejich mléko je albuminové (Gajdůšek, 2003).

2.4.1 Kaseinové proteiny

Kaseinovou část mléčných bílkovin tvoří heterogenní směs několika fosfoproteinů a jeden glykoprotein (Nentwich, 2004). Mezi fosfoproteiny se řadí α_{s1} -kasein a α_{s2} -kasein, oba tyto proteiny se vyskytují ve čtyřech genetických variantách. Dále mezi fosfoproteiny řadíme β -kasein a produkt jeho degradace γ -kasein, podle odštěpeného zbytku rozpoznáváme γ_1 - , γ_2 - a γ_3 -kasein (Velíšek, 2009). Technologicky významná vlastnost fosfoproteinů je rozpustnost v roztoku vápenatých solí (Kadlec, 2002).

Glykoprotein κ -kasein se v kravském mléce nachází ve dvou genetických variantách (Velíšek, 2009). Podíl α_{s1} -kaseinu, α_{s2} -kaseinu, β -kaseinu a κ -kaseinu v procentech uvádí Nentwich *et al.* (2004) jako 45 %, 10 %, 34 % a 11 %.

Kaseiny se v mléce nevyskytují ve formě monomerů, ale v kaseinových komplexech a micelách, tj. kulových částicích o velikosti 50-300 nm (Velíšek, 2009). Řadí se mezi důležité bílkoviny a má významnou technologickou i výživnou funkci. Peptidy odvozené od kaseinů a obohacené o fosforečnou skupinu přenáší minerální látky a zabraňují vysrážení iontů vápníku (Ferraretto, 2003).

2.4.2 Syrovátkové proteiny

Syrovátková proteinová frakce představuje v kravském mléce stejně jako v mléce ostatních přežvýkavců 17-20 % z čistých bílkovin mléka. V mléce se vyskytují ve formě koloidního roztoku a tvoří bílkoviny syrovátky, která zůstane po vysrážení kaseinu při pH 4,6 (Gajdůšek, 2003). Jsou termolabilní, při tepelném ošetření nad 60 - 70 °C, na rozdíl od kaseinu, denaturují. Nedochozí ale k jejich vysrážení, spojují se s κ -kaseinem a mění vlastnosti micel (Kadlec, 2002). Syrovátkové bílkoviny jsou nutričně důležitější a mají vyšší obsah vitamínů a minerálů než kasein (Hoffman, 2004).

Přibližně 50 % syrovátkových proteinů tvoří globulární protein β -laktoglobulin, který bude podrobně popsán v kapitole 2.4.2.1. Dalším významným proteinem syrovátky je α -laktoglobulin. Jeho obsah je 25 až 30 % syrovátky a jako součást některých enzymů má důležitou biologickou funkci. Je nezbytný pro syntézu laktózy a jeho sekvence je kromě aktivního centra stejná jako u lysozomu (Gajdůšek, 2003). Existuje ve dvou genetických variantách (Velíšek, 2009) a je stejně jako β -laktoglobulin syntetizován v mléčné žláze. Obsah α -laktalbuminu výrazně stoupá

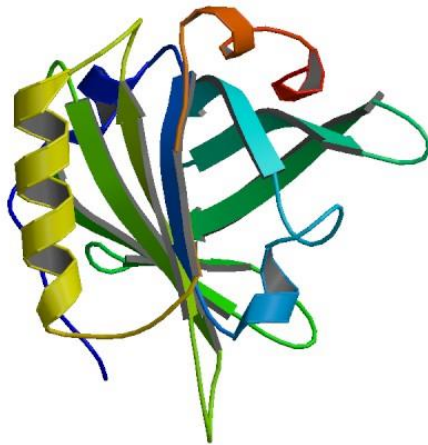
u monogastrických zvířat (Gajdůšek, 2003).

Menší zastoupení mají v syrovátce významné proteiny imunoglobuliny a serum albumin s účinkem protilátek. Imunoglobuliny jsou vysokomolekulární globulární glykoproteiny s vysokým biologickým významem. Jejich funkce, syntéza a heterogenita je mezi mléčnými bílkovinami ojedinělá. V kravském mléce jsou obsaženy imunoglobuliny IgG₁, IgM, IgG₂ a IgA. Kromě funkce protilátek, imunoglobuliny zajišťují přenos imunity z matky na mládě (Marshall, 2004). Serum albumin je heterogenní bílkovina a jeho hladina se zvyšuje při zánětech mléčné žlázy (Gajdůšek, 2003).

2.4.2.1 Betalaktoglobulin

Betalaktoglobulin (BLG) je hlavní syrovátkovou bílkovinou v mléce přežvýkavců a je přítomen také v mléce mnoha jiných druhů. Chybí například u lidí a hlodavců (Elmaci, 2006). Tvoří přibližně 50 - 60 % z celkového množství syrovátkových bílkovin (Doosti, 2011). Syntetizuje se v mléčné žláze (Gajdůšek, 2003). Jedná se o jednoduchý globulární protein složený ze dvou podjednotek o 162 aminokyselinách a hmotnosti 18 kDa (Kontopidis, 2004). Nevratně denaturuje při zahřátí, v přítomnosti vysokých koncentracích vápenatých iontů a v prostředí s pH vyšším než 8,6 (Velíšek, 2009). Jeho struktura je znázorněna na obr. 1. Doposud nebyla u tohoto proteinu objevena jeho specifická funkce. Má schopnost vázat různé hydrofobní molekuly. Uvažuje se o jeho roli při metabolismu fosfátů v mléčné žláze a transportu retinolu a mastných kyselin ve střevě (Doosti, 2011).

Obr. 2 Struktura nevazebného proteinu Betalaktoglobulin (Loch, 2010, zdroj: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3NPO>)



Při studiu genetického založení betalaktoglobulinu bylo objeveno několik genetických variant *BLG* (Caroli, 2009), které kódují různé proteiny betalaktoglobulinu a jeho obsah v mléce. U skotu jsou nejčastější a nejvíce zkoumané alelické varianty *A* a *B*, ty se spojují s kvalitou a produkcí mléka (Doosti, 2011). Množství betalaktoglobulinu v mléce koreluje s množstvím kaseinu. Vysoká hodnota kaseinu se pojí s nízkým množstvím betalaktoglobulinu (Ganai, 2009). U betalaktoglobulinu varianty *B* bylo popsáno vysoce pozitivní spojení s množstvím kaseinu a negativní asociace s koncentrací betalaktoglobulinu v mléce (Hallén, 2008). Množství proteinu v mléce závisí na rozdílné expresi odlišných variant genu. Odlišné exprese variant mohou být způsobeny polymorfismy v oblasti regulace genu, které jsou ve vazebné nerovnováze s polymorfismy *BLG*, variantami *A* a *B* (Ganai, 2009).

2.5 Lokus pro β -laktoglobulin

Lokus, u něhož se předpokládá, že kóduje β -laktoglobulin, se nachází na 11. chromozomu bovinního genomu. Tento lokus se označuje *BLG*. Má vliv na produkci a kvalitu mléka. Heritabilita obsahu betalaktoglobulinu v mléce, který je závislý do značné míry na efektu *BLG* genotypu, se pohybuje kolem hodnoty 0,37 (Bonfatti, 2008). V roce 1955 byl objeven první polymorfismus tohoto genu. Doposud je jich známo 15 (Matějíček, 2007). Polymorfismy mohou být využívány

pro zlepšení odhadů plemenné hodnoty. Nejběžnější alelické varianty bývají *BLG-A* a *BLG-B*, způsobené bodovou mutací v exonu IV genu (Rachagani, 2006). Odlíší se od sebe dvěma substitucemi aminokyselin (Asp64Gly a Val118Ala). Alela *B* je především nadřazená pro kvalitu mléka u jednotlivých plemen skotu, zatímco alela *A* ovlivňuje produkční parametry (Doosti, 2011). Varianta *A* způsobuje vyšší obsah betalaktoglobulinu v kravském mléku než varianta *B*, jak bylo potvrzeno ve studiích Halléna *et al.* (2009); Heck *et al.* (2009). Heck *et al.* (2009) uvádí, že genotyp *BLG* ovlivňuje 90 % genetické variability relativní koncentrace betalaktoglobulinu. Již Lum *et al.* (1997) objevil, že promotor alely *A* má vyšší afinitu k transkripčním faktorům, proto je u homozygotního skotu přibližně 1,5x vyšší exprese *BLG-A*.

Informace o genotypu betalaktoglobulinu se u býků považuje za potenciaální marker pro mléčnou produkci (Sitkowska, 2009). Ve studii Doosti (2011) vybraná populace krav, zjištěná jako homozygoti *BB*, produkovala mléko s vysokým obsahem bílkovin a tuků, vhodnější pro sýrařské zpracování, zatímco homozygot *AA* produkoval mléko s nižším obsahem tuku. Huang *et al.* (2012) studoval SNP ovlivňující na chromozomu BTA11 uvnitř nebo v blízkosti *BLG*. U osmi z těchto SNP našel asociaci s koncentrací betalaktoglobulinu v mléce. Tyto jednotlivé významné SNP vysvětlovaly 65,1 % fenotypových variací betalaktoglobulinu. Zejména SNP BTA11.107169806 uvnitř *BLG* objasňovalo většinu těchto variací. Výsledky studie jasně naznačují existenci důležitých QTL pro zastoupení proteinů v mléce.

2.6 Technologické vlastnosti mléka

Technologické vlastnosti mléka určují vhodnost surového mléka pro zpracování na mléčné výrobky, také míru produkce a kvalitu zpracovaných výrobků. U syrového mléka se vyskytuje celá řada faktorů, které mohou technologické vlastnosti ovlivnit pozitivně i negativně. Pokud je mléko dále skladováno, přidávají se další faktory. Nejvýznamnější technologické vlastnosti mléka jsou tepelná stabilita, syřitelnost, kysací schopnost a kyselost (Samková, 2012). Jako důležité ukazatele technologické kvality mléka se udávají zejména tuk, laktóza, počet somatických buněk, tukuprostá sušina, kasein, alkoholová stabilita, titrační kyselost, kyselost (pH), syřitelnost, koagulace a pevnost sýřeniny, kysací schopnost, tepelná stabilita.

Při výrobě sýrů se pozornost zaměřuje hlavně na syřitelnost. Je zpravidla více ukazatelů syřitelnosti, z nichž je důležitý čas enzymatické koagulace mléčných bílkovin a stanovení pevnosti sýřeniny. Dále se jedná o objem syrovátky vypuzené v procesu sýření díky syneresy, což je vylučování kapaliny ze sýřeniny a stahování sýřeniny (kontrakce) při němž je syrovátka vylučována (Sojková, 2011).

2.6.1 Syřitelnost mléka

Syřitelnost je zásadní schopnost mléčných bílkovin, umožňující vlivem syřidla a kyselého prostředí vznik pevné hmoty. Je důležitá pro výrobu, kvalitu i množství produkovaného sýra (Samková, 2012). Jako syřitelnost se označuje schopnost mléka srážet se vlivem syřidla a vytvářet sýřeninu požadovaných vlastností. Proces sýření mléka probíhá ve dvou fázích. V první fázi je limitně proteolyzován κ – kasein. V druhé fázi sýření jsou za přítomnosti vápenných iontů koagulovány frakce kaseinu (Gajdůšek, 2003). Souhrnně je syřitelnost nejčastěji definována dvěma hlavními ukazateli, a to časem sýření (RCT – čas potřebný ke koagulaci mléka se syřidlem) a stanovením pevnosti sýřeniny (E_{30}). Vzniklá sýřenina se po procesu sýření může dále hodnotit a posuzovat. Měří se objem syrovátky a adspekci a palpací se posuzuje její kvalita (Samková, 2012).

Syřitelnost mléka je komplexní proces s ne zcela známým detailním průběhem. Ovlivňuje ho mnoho faktorů. Nejzřetelnější jsou pH mléka a teplota při sýření, obsah a formy vápníku a fosforu, obsah kaseinu a zastoupení jeho frakcí, pořadí laktace, roční období, plemeno a genetické polymorfismy mléčných proteinů (Vallas, 2010). Faktory jsou navzájem propojeny a ovlivňují se pozitivně či negativně. Rozdílné účinky na proces sýření má především faktor mléčných proteinů, jejich varianty, množství a složení (Hallén, 2008). Kromě toho, několik studií ukázalo na souvislost mezi ukazateli syřitelnosti a produkcí mléka a jeho složením (Ikonen, 2004; Cassandro, 2008). Negativní ovlivnění procesu sýření a výsledné sýřeniny s sebou nese špatná výživa, metabolické poruchy či záněty mléčné žlázy a zejména také nevhodná teplota a doba skladování mléka (Gajdůšek, 2003). Vhodnost mléka pro výrobu sýrů je tradičně vyhodnocována časem sýření, časem potřebného k vytvoření sýřeniny, pevností sýřeniny, elasticitou, propustností, stažitelností, synerezí. Dalším důležitým faktorem při tvorbě sýra je kyselost mléka. Vysoké pH je spojováno s delším časem sýření a nižší pevností sýřeniny (De Marchi,

2007). Hodnocení syřitelnosti má velký význam pro posouzení vhodnosti syrového mléka k sýrařské produkci. Vyjadřuje technologické vlastnosti mléka při výrobě fermentovaných mléčných výrobků (Samková, 2012).

V posledních letech se díky genomové hojnosti a flexibilitě typizace používaly SNP k určení genetického pozadí základních kvantitativních znaků. Vědci tak mohou identifikovat SNP, které mají vazbu na kvalitu mléka a ukazateli syřitelnosti. Ty pak lze začlenit do selekčních programů (Cechinato, 2015).

2.6.1.1 Čas sýření (RTC) a pevnost sýřeniny (E₃₀)

Čas sýření (RTC) se označuje jako doba v minutách od přidání syřidla k mléku do začátku koagulace neboli srážení mléčných bílkovin (Cassandro, 2007). Pevnost sýřeniny po enzymatickém sýření se hodnotí v mm 30 minut po začátku koagulace (Bittante, 2011). Tyto dvě vlastnosti jsou velmi důležité pro sýření a úzce spolu souvisejí. Kratší čas potřebný ke koagulaci mléka se syřidlem je výhodný, protože poskytuje více času pro vytváření pevné sýřeniny (Vallas, 2010). Tvorba sýřeniny během srážení pozitivně koreluje s mírou produkce sýra. Čím lepší jsou vlastnosti syřitelnosti tím je výroba sýra efektivnější.

Ve studii Vallas *et al.* (2010) byly odhadnuty heritability pro RTC 0,28 a 0,41 pro E₃₀. Jejich vzájemná genetická korelace byla určena jako zanedbatelná, vzhledem k odlišnému genetickému založení obou vlastností. Jiné studie uvádějí lehce vyšší heritabilitu, a to 0,22 – 0,62 pro RCT a 0,40 – 0,57 pro E₃₀. Odhady opakovatelnosti se pohybovaly v rozmezí od 0,57 do 0,71. Tyto zjištěné hodnoty heritability ukazují, že je možné ukazatele syřitelnosti zlepšit přímou selekcí (Ikonen, 2000). Efekty *CSN2-CSN3* haplotypu a *BLG* genotypu představují 27 % a 21 % genetické variance RTC a E₃₀ (Bonfatti, 2008). Ikonen (2000) sledoval vliv polymorfismů mléčných proteinů na kvalitu ukazatelů syřitelnosti, genotypy κ -kaseinu s alelou *B* se pojily s nejlepšími hodnotami ukazatelů syřitelnosti a genotypy s alelou *E* s těmi nejhoršími. Genotypy β -kaseinu neměly v testech syřitelnosti žádný průkazný vliv. U β -laktoglobulinu byla alela *B* spojena s vysokým obsahem kaseinových bílkovin, avšak efekt na syřitelnost se ukázal být zanedbatelný.

Genetická korelace ukazatelů syřitelnosti a produkce mléka se podle Ikonen *et al.* (2004) ukázala jako velmi malá. V důsledku toho přímá selekce na ukazatele selekce nemusí mít vliv na výtěžek mlék nebo na výtěžek tuků či bílkovin. I když je

prokázáno, že obsah celkových proteinů a kaseinových proteinů má příznivý fenotypový účinek na syřitelnost mléka (Van Den Berg, 1992; Ikonen, 2000) odhadnul tuto genetickou asociaci jako neprůkaznou.

2.6.1.2 Vliv plemene na ukazatele syřitelnosti

Plemeno je důležitým zdrojem variability kvality mléka a ukazatelů syřitelnosti (Cassandro, 2007). Studie De Marchi *et al.* (2007) uvádí, že holštýnský skot, nejvíce rozšířené plemeno pro mléčnou produkci, dosahuje pouze lepší střední kvalitu mléka pro sýrařství. Zatímco dojnice jiných plemen produkovaly mléko s výrazně lepšími ukazateli syřitelnosti. Rendena, málo rozšířené alpské plemeno, mělo v testech syřitelnosti nejlepší výsledky. Dokázalo se tím, že hrozící riziko vymírání primitivnějších málo početných plemen skotu a snižování biodiverzity může způsobit i ztráty ekonomicky cenných genetických znaků. Hodnoty plemena Rendena pro RCT byly 13,5 min a pro a_{30} 27,0 mm. Nejhorší výsledky v tomto testu mělo Holštýnsko-fríské plemeno s hodnotami 18,0 min RCT a 17,5 mm a_{30} . Dále byla testu podrobena plemena Brown swiss, Simentál a Tyrolský šedý skot, jejich výsledky vykazovaly střední kvalitu ukazatelů syřitelnosti. Ke stejným závěrům došel i Bittante *et al.* (2011). Je velmi důležité zachování krajových plemen a jejich případné využití ke zvýšení kvality mléka pro sýrařský průmysl. Nižší produkci mléka u krajových plemen by kompenzovala jejich charakteristická odolnost, plodnost, dlouhověkost a přizpůsobivost. Proto by se mělo bránit ohrožení těchto genetických zdrojů a zvažovat jejich využití ve šlechtění (Cassandro, 2007).

Obrázek 4 nabízí k porovnání rozpětí relativních frekvencí alel a genotypů *BLG* u různých plemen skotu. Vyplývá z něj, že ačkoli je u jednotlivých plemen relativní frekvence dosti odlišné, v průměru je čtenější alela *B* před alelou *A*, z genotypů jsou čtenější genotypy *AB* a *BB* před genotypem *AA*.

Obr. 4 Alelické a genotypové frekvence BLG u různých plemen skotu (zdroj: Heidari, 2009)

Breeds	Allele Frequency		Genotype Frequency			Reference
	A	B	AA	AB	BB	
Holstein	0.529	0.471	0.257	0.544	0.198	Current study
	0.270	0.730	0.060	0.525	0.414	Celik, (2003)
	0.516	0.484	-	-	-	Kaygisiz and Douan, (1999)
	0.420	0.580	-	-	-	Sabour <i>et al.</i> (1993)
	0.498	0.502	-	-	-	Lunden <i>et al.</i> (1997)
	0.520	0.480	0.284	0.471	0.245	Tsiaras <i>et al.</i> (2005)
	0.231	0.769	0.037	0.387	0.576	Lin and Mcallister, (1986)
	0.387	0.613	-	-	-	Ng-Kawi-Hang and Kim, (1984)
	0.520	0.480	-	-	-	Ron <i>et al.</i> (1994)
Brown Swiss	0.440	0.560	0.172	0.289	0.537	Celik, (2003)
Sahiwal	0.170	0.830	0.031	0.276	0.693	Rachagani <i>et al.</i> (2006)
Tharparkar	0.390	0.610	0.023	0.733	0.244	Rachagani <i>et al.</i> (2006)
Guernsey	0.210	0.790	-	-	-	Eenennaam and Medrano,(1991)
Milking Shorthorn	0.310	0.690	-	-	-	Eenennaam and Medrano,(1991)
Red-sindhi	0.250	0.750	-	-	-	Meignanalakshmi <i>et al.</i> (2001)
Ayrshire	0.158	0.842	0.190	0.279	0.702	Lin and Mcallister, (1986)

3 Materiál a metodika

3.1 Materiál

Vzorky mléka pro určení genotypu krav byly odebírány na zemědělských podnicích Týnice, Pražák, Chyšná, Munice, Sedlec v letech 2015-2016. Celkem bylo odebráno 730 vzorků od dojnic plemen český strakatý skot a holštýnský skot. Odběr mléka probíhal individuálně před dojením. Vzorky byly skladovány v alikvotních množstvích při -20 °C.

U dojnic byly zaznamenány údaje o otci, plemenu a data z první laktace – délka laktace (dny), procentuální obsah tuku a bílkovin a množství obsah tuku a bílkovin v kilogramech. Tato data byla využita při statistickém zpracování vlivu genotypů.

3.2 Laboratorní metody

3.2.1 Izolace DNA z mléka

Izolace DNA ze vzorků mléka probíhala s využitím automatického analyzátoru a komerčního kitu od firmy MagCore. Kit byl určen pro izolaci z krve, kvalita a množství izolované DNA byla ověřena spektrometricky.

3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Úsek DNA, který obsahuje sekvenci genu pro betalaktoglobulin v odebraných vzorcích mléka, byl amplifikován metodou polymerázové řetězové reakce. Reakční směs obsahovala složení podle tabulky 5.

Sekvence primerů byly následující:

Primer BLG1 5' - TGT GCT GGA CAC CGA CTA CAA AAA -3'

Primer BLG2 5' - GCT CCC GGT ATA TGA CCA CCC TCT -3'

Reakční směs bez DNA a Taq polymerázy byla namíchána a rozdělena po 27 µl do zkumavek označených čísly zkoumaných vzorků. Do každé zkumavky jsme následně přidali příslušnou DNA a vložili jsme zkumavky do termocyklu. Na něm jsme nastavili předem připravený program pro betalaktoglobulin a spustili jsme

úvodní denaturaci probíhající 2 minuty při 94°C. Poté jsme ke vzorkům přidali Taq polymerázu. Jednotlivé cykly PCR se skládaly z denaturace trvající 60 s při 94 °C, annealingu trvajícím 60 s při 54 °C a elongací trvající také 60 s při 72,5 °C. Cykly se opakovaly 35x. Následovala vizualizace elektroforézou na 2,5% agarózovém gelu. Délka vzniklého PCR fragmentu činila 247 bp.

Tab. 5 Složení reakční směsi pro PCR

Komponent	množství
Pufr	3 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTP's	3 µl
primer B-LG 1	1,5 µl
primer B-LG 2	1,5 µl
DNA	2 µl
Taq polymeráza	3 µl
H ₂ O	14 µl
celkové množství	30 µl

3.2.3 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Genotypizace vzorků probíhala pomocí metody RFLP. K 15 µl PCR produktu se přidalo 1,7 µl pufru a 1 µl restrikčního enzymu *HaeIII*, který štěpí řetězec DNA v cílové frekvenci GG↓CC. Vzorky s restrikčním enzymem jsme uložili přes noc do inkubátoru při teplotě 37°C. Výsledek RFLP byl vizualizován elektroforézou na 3% agarózovém gelu.

3.2.4 Testování syřitelnosti

U vybraných dojnic z farem Chyšná a Sedlec se testoval efekt genotypu β -laktoglobulinu syřitelnosti pomocí stanovení času sýření. Tato zkouška slouží obvykle k hodnocení vhodnosti mléka pro výrobu sýrů. Probíhá měřením času potřebného ke koagulaci 100 ml syrového mléka, a to po přidavku syřidla o známé koagulační síle, při teplotě 35 °C. Doba srážení by měla být 5–7 minut. Dále byl proveden jogurtový test podle Soxhlet-Henkela k určení kysací schopnosti mléka.

3.2.5 Statistické vyhodnocení

U získaných výsledků byly spočteny genotypové a alelické frekvence. Statisticky se vyhodnotilo, zda mají odlišné genotypy různý vliv na některé parametry mléka zjištěné za první laktaci, a to množství nadojeného mléka v kilogramech, procentuální obsah tuku a bílkovin z celkového složení mléka, množství tuku a bílkovin v kilogramech. Také se zjišťoval vliv genotypů na uvedené ukazatel syřitelnosti RCT. K vyhodnocení bylo použito programu Statistika.

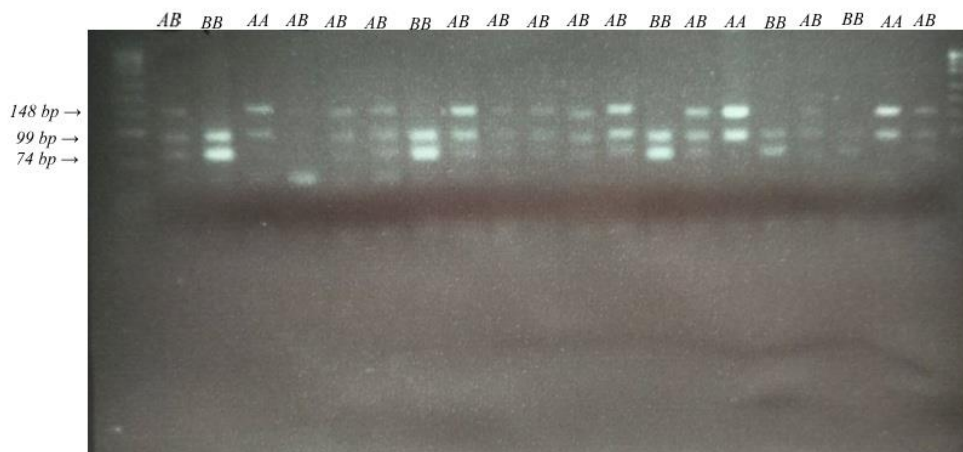
4. Výsledky a diskuze

4.1 Výsledky genotypizace

Genotypizace 730 vzorků probíhala za pomoci metody PCR-RFLP. Délka fragmentu amplifikovaného v polymerázové řetězové reakci byla 247 bp. Restrikční endonukleáza *Hae*III štěpila amplifikovanou DNA na fragmenty, u alely *A* byla délka fragmentů 148 bp a 99 bp. Alela *B* měla fragmenty dlouhé 99, 74 a 74 bp.

Při vizualizaci výsledku RFLP na gelu měl genotyp *AA* fragmenty o délce 148 bp a 99 bp. Genotyp *AB* měl fragmenty délek 148 bp, 99 bp a 74 bp. U genotypu *BB* byly na gelu fragmenty o délce 99 bp a 74 bp.

Obr. 3 Vizualizace genotypizace metodou RFLP



4.2 Alelické a genotypové frekvence

Polymorfní varianty proteinu betalaktoglobulinu byly stanoveny metodou PCR-RFLP celkem u 730 vzorků DNA. Výsledné relativní frekvence genotypů uvedené v tabulce 6 činily 0,0233 pro genotyp *AA*, 0,9 pro *AB* a 0,0767 pro *BB*. Hodnota Chi-kvadrát testu (χ^2) byla vyšší než kritická hodnota, což ukazuje, že genotypová distribuce genu β -laktoglobulinu u zkoumané populace se významně odchylovala od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Frekvence alel byla vyšší pro alelu *B* v neprospěch alely *A*. To se shoduje s výsledky prací Ikonen (2000) i dalšími. Například Hallén *et al.* (2009) uvádí ve zkoumané populaci holštýnského skotu

relativní frekvenci alel pro *A* 0,36 a pro *B* 0,64. Pro srovnání relativních frekvencí genotypů s jinými studiemi např. Moole *et al.* (2015) uvádí relativní frekvence genotypů výrazně odlišné 0,175 pro *AA*, 0,535 pro *AB* a 0,289 pro *BB*. Sitkowska *et al.* (2009) uvádí podobné frekvence alel, 0,48 pro *A* a 0,52 pro *B*. Frekvence genotypů jsou v tomto případě podobné studii Moole *et al.* (2015), a to u genotypu *AA* frekvence 0,226, u genotypu *AB* 0,5032 a u genotypu *BB* 0,2710. Obě studie jsou od této práce rozdílné především větším počtem dojnic s genotypem *AA* i *BB*, kdežto tato práce má hlavně genotypů *AA* výrazně méně. Odlišné výsledky mohl ovlivnit efekt rozdílných plemen zařazených do zkoumání. Litwińczuk *et al.* (2006) poukazují na rozmanitost frekvence výskytu alel *A* a *B* genu *BLG* v závislosti na plemeni skotu a opírají se o citace dalších autorů.

Tab. 6 Alelické a genotypové frekvence všech odebraných vzorků

	genotypy			alely	
	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
Absolutní frekvence	17	657	56	691	769
Relativní frekvence	0,0233	0,9	0,0767	0,4732	0,5268
Relativní očekávané frekvence	0,2239	0,4986	0,2775	-	-
χ^2	64,838**				

Tab. 7 Alelické a genotypové frekvence vzorků z farem Chyšná a Sedlec

	genotypy			alely	
	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
Absolutní frekvence	2	411	16	415	443
Relativní frekvence	0,0046	0,96	0,0373	0,4837	0,5163
Relativní očekávané frekvence	0,2339	0,4998	0,2666	-	-
χ^2	84,79**				

4.3 Vliv genotypů β -laktoglobulinu na produkci a složení mléka

Stanovení vlivu genotypů probíhalo zatím u 429 vzorků odebraných na farmách Sedlec a Chyšná. U ostatních vzorků bude vliv genotypů stanoven později v rámci probíhajícího výzkumu. Hodnotil se vliv genotypů na ukazatele v první laktaci, a to celkovou produkcí mléka v kg, procentuální zastoupení tuku a bílkovin v celkovém složení a celkový výnos tuku a bílkovin v kg. Tabulka 8 znázorňuje průměr, směrodatnou odchylku a p-hodnotu naměřených u jednotlivých genotypů pro udané parametry mléka. Žádný z genotypů neměl p-hodnotu menší, než jaká byla určená hladina významnosti $\alpha = 0,05$. To znamená, že genotypy nijak statisticky významně neovlivnily produkci mléka, ani jeho složení v první laktaci. Ani mezi alelami *A* a *B* nebyl nalezen žádný statisticky průkazný rozdíl. Okolnost, že nebyl nalezen žádný prokazatelný vliv může být i způsobena malým počtem vzorků, nedostatečným počtem jednotlivých genotypů či silnou genetickou nerovnováhou. Frekvence alel a genotypů z farem Sedlec a Chyšná nalezneme v tabulce 7. Velký rozdíl je především mezi očekávanou relativní frekvencí genotypů a skutečnou frekvencí.

Tab. 8 Užitkovost krav v závislosti na genotypu *LGB* na farmách Chyšná a Sedlec

Genotypy ¹	<i>AA</i>		<i>AB</i>		<i>BB</i>	
n	2		411		16	
	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x
M kg	10360	1605,132	8771,255	2121,217	7899,313	1756,781
T %	4,03	0,099	4,1011	0,3058	4,008	0,3096
T kg	372	53,033	357,8345	87,3948	317,9375	83,0875
B %	3,66	0,361	3,4405	0,2262	3,4412	0,1758
B kg	338	16,971	298,2774	59,8236	270,3125	53,25

¹rozdíly mezi genotypy nebyly statisticky významné

Výsledky efektu genotypu na produkční vlastnosti mléka zjištěné v této práci souhlasí se studií Sitkowska *et al.* (2009). V ní byly hodnoceny dojnice v laktaci

s nejvyšší produkcí mléka a genotyp *AA* měl nejvyšší produkci mléka, tuku i bílkovin. Ve zkoumané populaci homozygotní krávy *BB* produkovaly o 453 kg méně mléka a o 9 kg méně tuku a bílkovin než homozygoti *BB*. produkce mléka, tuku a bílkovin pro heterozygotní krávy byl 7618 kg, 347 kg a 251 kg. Odlišné výsledky efektů genotypů *BLG* uvádí ve své studii Doosti *et al.* (2011). Jeho vybraná populace krav homozygotů *BB* produkovala mléko s vysokým obsahem bílkovin a tuků, vhodnější pro sýrařské zpracování, zatímco homozygot *AA* produkoval mléko s nižším obsahem tuku. Studie Heidari *et al.* (2009) porovnávala genotypy ve vztahu k produkci mléka. V jeho srovnání produkce mléka za laktaci u jednotlivých genotypů *BLG* se ukázalo, že krávy s *AA* genotypem produkují více mléka než zvířata s genotypem *BB*, přestože rozdíl mezi genotypy byl statisticky nevýznamný. Tuto skutečnost potvrzují i jiné výzkumy (Ikonen, 1999; Bovenhuis, 1992; Aleandri, 1990; NgKwai-Hang, 1990).

Tsirias *et al.* (2005) zjišťoval také vliv genotypů *BLG* na produkční znaky mléka. Jeho výsledky ukazují pozitivní vliv genotypu *AB* na celkovou produkci na prvních dvou laktacích dojnic holštýnského skotu. Celkovou produkci tuku měly nejvyšší dojnice s genotypem *BB* a *AB* v neprospěch genotypu *AA*. Zajímavé je, že ve studii Tsirias *et al.* (2005) nebyl zjištěn statisticky významný efekt genotypů na obsah bílkovin, ačkoli ostatní studie tento efekt uvádějí.

Bohužel se v této práci neprojevil statisticky průkazný rozdíl mezi genotypy ani alelami celkové zkoumané populace, který by podpořil již provedené podobné studie, které uvádí efekt genotypů na jednotlivé užitkové parametry mléka. Předkládaná práce je součástí výzkumného úkolu, který bude dále zpracováván a hodnocen. Do statistických analýz budou zařazeny další efekty, ovlivňující užitkové ukazatele produkce mléka, obsah tuku a bílkovin v procentech, produkce tuku a bílkovin v kilogramech. V rozsáhlejší statistickém vyhodnocení bude možné posoudit analyzované efekty komplexně.

Vliv genotypů byl zjištěn rovněž pro každou farmu zvlášť, výsledky jsou zobrazeny tabulce 9 a 10. Genotypy dojnic z farmy Chyšné nevykazovaly žádné vlivy na užitkové parametry dojnic. Hodnoty genotypů z farmy Sedlec také nejsou statisticky významně rozdílné, ale výsledky párového testu provedeného mezi jednotlivými alelami naznačují statisticky prokazatelný efekt alel na procentuální zastoupení bílkovin a produkci bílkovin v kg, hodnoty jsou uvedeny v tabulce 9.

Rozdíl mezi efekty na jednotlivých farmách může být zapříčiněn odlišnými plemeny. Na farmě Chyšná byly vzorky odebrány z populace holštýnského plemena skotu, zatímco na farmě Sedlec se výzkum prováděl na českém strakatém skotu. Srovnání průměrných produkčních vlastností mezi farmami Sedlec a Chyšná vykazuje lepší hodnoty produkce mléka, procentuálního obsahu tuku, produkce tuku a produkce bílkovin pro dojnice holštýnského plemene na farmě Chyšná. Dojnice českého strakatého skotu na farmě Sedlec měly lepší produkční hodnoty pro procentuální zastoupení bílkovin v mléku.

Tab. 9 Užitek krav v závislosti na genotypu *LGB* na farmě Sedlec

Genotypy ¹	AA		AB		BB	
n	1		187		11	
	\bar{x}	s _x	\bar{x}	s _x	\bar{x}	s _x
M kg	9225	-	6919,7	1187,125	6906,09	952,9341
T %	4,03	-	4,08	0,2639	3,92	0,2753
T kg	372	-	280,24	51,6702	269,81	32,5387
B %	3,66	-	3,62 ^a	0,1512	3,5 ^b	0,1492
B kg	338	-	249,71 ^a	40,6177	241,72 ^b	32,1499

¹rozdíly mezi genotypy nebyly statisticky významné

^{a,b} rozdíly významné na hladině $P < 0,05$ v párovém testu

Tab. 10 Užitekčnost krav v závislosti na genotypu *LGB* na farmě Chyšná

Genotypy ¹	AA		AB		BB	
n	1		224		5	
	\bar{x}	s _x	\bar{x}	s _x	\bar{x}	s _x
M kg	11495		10304,35	1362,021	10084,4	788,8167
T %	3,89		4,12	0,3364	4,2	0,3252
T kg	447		421,97	51,4102	423,8	53,5276
B %	3,15		3,29	0,1656	3,3	0,1612
B kg	362		338,42	40,1373	333,2	29,3036

¹rozdíly mezi genotypy nebyly statisticky významné

Ikonen (2000) uvádí jasný efekt alel genu *BLG* na parametry mléčné produkce dojníc na první laktaci. Alela *A* byla spojena s vyšší produkcí mléka i množstvím bílkovin, zatímco alela *B* znamenala vyšší obsah tuku. To se částečně shoduje s výsledky z farmy Sedlec. Ostatní rozdíly genotypů nemusely být průkazně zachyceny z důvodu malé populace či nerovnoměrné populace.

Při statistickém zpracování jednotlivých alel se ukázal statisticky významný rozdíl efektu alel na produkční vlastnosti produkce mléka v kg, produkci tuku v kg a produkci bílkovin v kg naměřené na farmách Sedlec a Chyšná za první laktaci dojníc. U těchto produkčních vlastností naměřených na první laktaci byla p-hodnota výrazně nižší než daná hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Tyto výsledky by mohly znamenat pozitivní efekt alely *A* na celkovou produkci mléka, tuku a bílkovin. Částečně by to toto tvrzení shodovalo se studií Ikonen (2000), zmíněnou výše. Ovšem Ikonen (2000) uvádí zvýšenou produkci tuku způsobenou alelou *B*. Tento rozdíl může být způsoben efekty odlišných plemen v jednotlivých studiích či rozdílné absolutní frekvence alel.

4.4 Vliv genotypu β -laktoglobulinu na syřitelnost mléka

Celkem u 51 vzorků z farem Sedlec a Chyšná byla stanovena syřitelnost mléka pomocí měření času syření. Jako doplňkový test bylo provedeno stanovení kysací schopnosti mléka jogurtovým testem. Naměřené výsledky uvádí tabulka 11. Ve vybraných vzorcích k hodnocení syřitelnosti nebyl zastoupen genotyp AA. Výsledky ukazují, že genotypy *BLG* neměly žádný statistický významný vliv na čas syření. Ve výsledcích jogurtového testu se projevil vliv genotypů, p-hodnota je nižší než daná hladina významnosti $\alpha = 0,05$. To by mohlo znamenat, že genotyp *AB* je spojen s vyšší kyselostí mléka. Avšak výsledky mohla zkreslit nižší četnost souboru. Při zjišťování vlivu alel *A* a *B* na čas syření nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

Tab.11 Technologické vlastnosti mléka na farmách Sedlec a Chyšná
genotypy *AB* *BB*

genotypy	<i>AB</i>		<i>BB</i>	
	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x
n	48		3	
čas syření (min)	8,3	2,8382	7,43	3,4258
jogurt. test (°SH)	15,5717 ^a	3,5018	11,4167 ^b	0,7753

^{a,b} rozdíly významné na hladině $P < 0,05$

Syrovátkové bílkoviny se přímo nezapojují do procesu koagulace mléka. Proto lze čekat jejich nízký vliv na ukazatele syřitelnosti v porovnání s kaseinovými proteiny (Bonfatti, 2010). Ikonen *et al.* (1999) se shoduje s Bonfattim *et al.* (2010) v tom, že se alela *BLG B* pojí s vyšším RCT. Příčiny nepříznivého účinku alely *B* na RCT zatím nejsou známy. Ovšem jiné studie (Pagnacco, 1987; Ikonen, 1997) nezaznamenaly žádný efekt genotypů *BLG* na RCT. A Ikonen (2000) uvádí, že pro *BLG* byla alela *B* asociována s vyšším obsahem kaseinových bílkovin, ale efekt na syřitelnost se ukázal jako zanedbatelný. Tyto nekonzistentní výsledky může vysvětlovat vliv *B* alely *BLG* na celkový obsah kaseinových proteinů. Pro vzájemný

efekt genotypů *BLG* neexistovaly žádné významné odchylky heterozygotních genotypů od průměrných homozygotních genotypů (Bonfatti, 2010).

5. Závěr

Cílem práce bylo genotypizovat vybranou populaci dojnic pro polymorfismy genu *BLG* metodou PCR-RFLP. Dále byly posuzovány možné asociace mezi genotypy *AA*, *AB* a *BB* tohoto genu a vybranými parametry mléka nadojeného za první laktaci. Zjišťován byl rovněž vliv jednotlivých genotypů na čas sýření jako hodnocení vhodnosti mléka pro sýrařské zpracování.

U jedné vybrané skupiny dojnic plemene český strakatý skot z farmy Sedlec byl párovým testem zjištěn statisticky průkazný efekt alel na procentuální zastoupení bílkovin a produkci bílkovin v kg. U žádného jiného měření nebyl zjištěn statistická významný rozdíl ovlivněný genotypy či alelami genu *BLG*.

Výsledky práce mohli být v porovnání s ostatními studiemi zkresleny četností souboru, vybraného k testování, odlišným plemenem, genetickým vlivem otce na jednotlivé dojnice či odlišnými selekčními metodami. Práce byla součástí probíhajícího rozsáhlejšího výzkumu, jehož výsledky budou dále zpracovávány a hodnoceny se zařazením dalších efektů, ovlivňujících sledované užitkové vlastnosti.

Celosvětové studie ukazují, že polymorfismy mléčných proteinů je možné využít ke zlepšení technologických vlastností mléka včetně sýření. V případě proteinu betalaktoglobulinu bude ještě nutné zjistit jeho přesnou biologickou funkci v organismu. Také je potřeba podrobněji prozkoumat vlivy polymorfismů genu *BLG*, aby mohl být účinně zařazen do selekčních programů a sloužit ke šlechtění skotu.

6. Seznam zkratek

BLG – beta-lactoglobuline

BTA – bovis taurus chromosome

BGD – bovine genome database

CN – casein

ETL – economic trait loci

GH1 – growth hormone 1

LD – linkage disequilibrium

PCR – polymerase chain reaction

QTL – quantitative traits locus

RTC – rennet coagulation time

RFLP – restriction fragment length polymorphism

SMP – skim milk powder

SNP – single nucleotide polymorphysm

WMP – whole milk powder

7. Použitá literatura

- Aleandri, R., Buttazzoni, L. G., Schneider, J. C., Caroli, A., & Davoli, R. (1990). The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *Journal of Dairy Science*, *73*(2), 241-255.
- Arias, J. A., Keehan, M., Fisher, P., Coppieters, W., & Spelman, R. (2009). A high density linkage map of the bovine genome. *BMC genetics*, *10*(1), 18.
- Badola, S., Bhattacharya, T. K., Biswas, T. K., Kumar, P., & Sharma, A. (2003). Association of beta-lactoglobulin polymorphism with milk production traits in cattle. *ASIAN AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES*, *16*(11), 1560-1564.
- Belitz, I. H. D., & Grosch, I. W. (2004). Milk and dairy products. In *Food chemistry* (pp. 505-550). Springer Berlin Heidelberg.
- Bell, Ch. G., Walley, A. J., Froguel, P. The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics*. 2005, Vol. 6: 221-234
- Berg, F. Genetic analysis of fat metabolism in domestic pigs and their wild ancestor. Acta Universitatis Upsaliensis, Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations. 2006, 164 p., ISBN 91-554-6623
- Bittante, G. (2011). Modeling rennet coagulation time and curd firmness of milk. *Journal of dairy science*, *94*(12), 5821-5832.
- Bonfatti, V., Grigoletto, L., Cecchinato, A., Gallo, L., & Carnier, P. (2008). Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *Journal of Chromatography A*, *1195*(1), 101-106.

- Bonfatti, V., Di Martino, G., Cecchinato, A., Degano, L., & Carnier, P. (2010). Effects of β - κ -casein (CSN2-CSN3) haplotypes, β -lactoglobulin (BLG) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. *Journal of dairy science*, 93(8), 3809-3817.
- Bonfatti, V., Cecchinato, A., Gallo, L., Blasco, A., & Carnier, P. (2011). Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental cattle. *Journal of dairy science*, 94(10), 5183-5193.
- Bovenhuis H, Van Arendonk JAM, Korver S (1992). Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J Dairy Sci*. 75: 2549-2559.
- Caroli, A. M., Chessa, S., & Erhardt, G. J. (2009). Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of dairy science*, 92(11), 5335-5352.
- Cassandro, M., Dalvit, C., Zanetti, E., De Marchi, M., & Dal Zotto, R. (2007). Genetic aspects of milk coagulation properties in dairy cattle. *Poljoprivreda*, 13(1), 30-34.
- Cassandro, M., Comin, A., Ojala, M., Dal Zotto, R., De Marchi, M., Gallo, L., ... & Bittante, G. (2008). Genetic parameters of milk coagulation properties and their relationships with milk yield and quality traits in Italian Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 371-376.
- Cecchinato, A., Chessa, S., Ribeca, C., Cipolat-Gotet, C., Bobbo, T., Casellas, J., & Bittante, G. (2015). Genetic variation and effects of candidate-gene polymorphisms on coagulation properties, curd firmness modeling and acidity in milk from Brown Swiss cows. *animal*, 9(07), 1104-1112.

- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. O., Catchen, J. M., Blaxter, M. L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature*. 2011, Vol. 12: 499-510
- De Marchi, M., Dal Zotto, R., Cassandro, M., & Bittante, G. (2007). Milk coagulation ability of five dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 90(8), 3986-3992.
- Doosti, A., Arshi, A., Yaraghi, M., & Dayani-Nia, M. (2011). Comparative study of-lactoglobulin gene polymorphism in Holstein and Iranian native cattle. *Journal of Cell and Animal Biology*, 5(3), 53-55.
- Elmaci, C., Oner, Y., & Balcioglu, M. S. (2006). Genetic polymorphism of β -lactoglobulin gene in native Turkish sheep breeds. *Biochemical Genetics*, 44(7-8), 376-381.
- Elsik C. G., Tellam R. L., Worley K. C., Gibbs R. A., Muzny D. M., Weinstock G. M., et al. (2009). The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* 324 522–528.
10.1126/science.1169588
- Elsik CG, Unni DR, Diesh CM, Tayal A, Emery ML, Nguyen HN, Hagen DE. Bovine Genome Database: new tools for gleaning function from the *Bos taurus* genome. *Nucleic Acids Res*. 2015 Oct 19. pii: gkv1077. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26481361.
- Erickson, D. L., Fenster, C. B., Stenøien, H. K., & Price, D. (2004). Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process. *Molecular Ecology*, 13(9), 2505-2522.
- Ferraretto, A., Gravaghi, C., Fiorilli, A., & Tettamanti, G. (2003). Casein-derived bioactive phosphopeptides: role of phosphorylation and primary structure in promoting calcium uptake by HT-29 tumor cells. *FEBS letters*, 551(1-3), 92-98.

- FOX, Patrick F.; McSweeney, Paul LH. Dairy chemistry and biochemistry. 1998.
- Gajdušek, Stanislav. *Laktologie*. Brno: MZLU, 2003. ISBN 80-7157-657-3.
- Ganai, N. A., Bovenhuis, H., Van Arendonk, J. A. M., & Visker, M. H. P. W. (2009). Novel polymorphisms in the bovine β -lactoglobulin gene and their effects on β -lactoglobulin protein concentration in milk. *Animal genetics*, 40(2), 127-133.
- Gerosa, Stefano, and Jakob Skoet. "Milk availability: trends in production and demand and medium-term outlook." *Food and Agriculture Organization of the United Nations 12-01* (2012): 1-38.
- Hallén, E., Wedholm, A., Andrén, A., & Lundén, A. (2008). Effect of β -casein, κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. *Journal of Animal Breeding and genetics*, 125(2), 119-129.
- Hastings, N., Donn, S., Derecka, K., Flint, A. P., & Woolliams, J. A. (2006). Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. *Animal genetics*, 37(6), 583-585.
- Heck, J. M. L., Schennink, A., Van Valenberg, H. J. F., Bovenhuis, H., Visker, M. H. P. W., Van Arendonk, J. A. M., & Van Hooijdonk, A. C. M. (2009). Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *Journal of dairy science*, 92(3), 1192-1202.
- Heidari, M., & Zerehdaran, S. (2009). Association of Genetic Variants of β -Lactoglobulin Gene with Milk Production in a Herd and a Superior Family of Holstein Cattle. *Iranian Journal of Biotechnology*, 7(4), 254-257.
- Hoffman, J. R., & Falvo, M. J. (2004). Protein-Which is best. *Journal of Sports Science and Medicine*, 3(3), 118-130.

- Huang, W., Peñagaricano, F., Ahmad, K. R., Lucey, J. A., Weigel, K. A., & Khatib, H. (2012). Association between milk protein gene variants and protein composition traits in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 95(1), 440-449.
- Chandan, R. C. (2007) Milk Composition, Physical and Processing Characteristics, in Handbook of Food Products Manufacturing (ed Y. H. Hui), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470113554.ch64
- Ingr, Ivo. 2001. Zpracování zemědělských produktů. 2., nezměn. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 249 s. ISBN 80-715-7520-8
- Ikonen, T., M. Ojala, and E. L. Syväoja. (1997). Effects of composite casein and β -lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model. *Agric. Food Sci. Finl.* 6:283–294.
- Ikonen, T., Ojala, M., & Eeva-Liisa, S. (1997). Effects of composite casein and beta-lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model.
- Ikonen, T., M. Ojala, and O. Ruottinen. (1999). Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *J. Dairy Sci.* 82:1026–1033
- Ikonen, T. (2000). *Possibilities of genetic improvement of milk coagulation properties of dairy cows*. University of Helsinki.
- Ikonen, T., Morri, S., Tyrisevä, A. M., Ruottinen, O., & Ojala, M. (2004). Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content, and pH of milk. *Journal of dairy science*, 87(2), 458-467.
- Itoh, T., Takasuga, A., Watanabe, T. and Sugimoto, Y. (2003), Mapping of 1400 expressed sequence tags in the bovine genome using a somatic cell hybrid

panel. *Animal Genetics*, 34: 362–370. doi:10.1046/j.1365-2052.2003.01014.x

Kadlec, Pavel. *Technologie potravin I*. Praha: VŠCHT, 2002. ISBN 80-7080-509-9.

Karimi, K., Beigi Nassiri, M. T., Mirzadeh, K., Ashayerizadeh, A., Roushanfekr, H., & Fayyazi, J. (2009). Polymorphism of the B-lactoglobulin gene and its association with milk production traits in Iranian Najdi cattle. *Iranian Journal of Biotechnology*, 7(2), 82-85.

Kontopidis, G., Holt, C., & Sawyer, L. (2004). Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *Journal of dairy science*, 87(4), 785-796. (a)

Larkin, D. M. (2011). Status of the cattle genome map. *Cytogenetic and genome research*, 134(1), 1-8.

Litwińczuk A., Barłowska J., Król J., Litwińczuk Z., (2006), Białka polimorficzne mleka jako markery cech użytkowych bydła mlecznego i mięsnego. *Med. Wet.*, 62, 1, 6–10.

Lum, L. S., Dovč, P., & Medrano, J. F. (1997). Polymorphisms of bovine β -lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. *Journal of Dairy Science*, 80(7), 1389-1397.

Marshall, N. D. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9(2), 136-156.

Matějček, A., Matějčková, J., Němcová, E., Jandurová, O. M., Štípková, M., Bouška, J., & Frelich, J. (2007). Joint effects of CSN3 and LGB genotypes and their relation to breeding values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech J. Anim. Sci.*, 52(4), 83-87.

- McCance a Widdowson's: *The Composition of Foods*, 6. Summary edition, Royal Society of Chemistry Cambridge a Food Standard Agency, (2008), ISBN 978-0-85404-428-3
- Molee, A., Poompramun, C., & Mernkrathoke, P. (2015). Effect of casein genes- beta-LGB, DGAT1, GH, and LHR-on milk production and milk composition traits in crossbred Holsteins. *Genet. Mol. Res*, 14, 2561-2571.
- Nentwich, I., Szepfalusi, Z. S., Kunz, C., Spuerger, P., & Urbanek, R. (2004). Antigenicity for humans of cow milk caseins, casein hydrolysate and casein hydrolysate fractions. *Acta Veterinaria Brno*, 73(2), 291-298.
- Ng-Kwai-Hang KF, Monardes HG, Hayes JF (1990). Association between genetic of milk proteins and production traits during three lactations. *J Dairy Sci*. 73: 3414-3420.
- Ogorevc, J., Kunej, T., Razpet, A., & Dovc, P. (2009). Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal genetics*, 40(6), 832-851.
- OECD/FAO (2016), "Dairy and Dairy Products", in OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025, OECD Publishing, Paris. DOI: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-11-en
- Pagnacco, G., and A. Caroli. (1987). Effect of casein and β -lactoglobulin genotypes on renneting properties of milks. *J. Dairy Res*. 54(Suppl. 4):479-485
- Rachagani, S., Gupta, I. D., Gupta, N., & Gupta, S. C. (2006). Genotyping of β -Lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. *BMC genetics*, 7(1), 31.
- Roff, D. A. (2007). A centennial celebration for quantitative genetics. *Evolution*, 61(5), 1017-1032.

- Samková, Eva. *Mléko: produkce kvalita: Milk: production and quality : vědecká monografie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2012. ISBN 978-80-7394-383-7.
- SAVCI upol.cz, internetová encyklopedie savců [online]. 2002 [cit. 2010-08-15].
Mléko savců. Dostupné z WWW: <http://www.savci.upol.cz/teorie/mleko.htm>
- Signorelli, F., Orrù, L., Napolitano, F., De Matteis, G., Scatà, M. C., Catillo, G., ... & Moiola, B. (2009). Exploring polymorphisms and effects on milk traits of the DGAT1, SCD1 and GHR genes in four cattle breeds. *Livestock Science*, 125(1), 74-79.
- Sitkowska, B., Neja, W., Wisniewska, E., Mroczkowski, S., Sawa, A. (2009). Effect of the polymorphic composite forms of beta-lactoglobulin on the milk yield and chemical composition in maximum lactation. *Journal of Central European Agriculture*, 10(3), 251-254.
- Sojková, K., Hanuš, O., Dufek, A., Kopecký, J., & Jedelská, R. Srovnání nefelometricky a tradičně stanovené koagulace proteinů syrového kravského mléka jako technologické vlastnosti.
- Vallas, M., Bovenhuis, H., Kaart, T., Pärna, K., Kiiman, H., & Pärna, E. (2010). Genetic parameters for milk coagulation properties in Estonian Holstein cows. *Journal of dairy science*, 93(8), 3789-3796.
- Van Den Berg, G., J.T.M. Escher, P.J. DE Koning and H. Bovenhuis. 1992. Genetic polymorphism of κ -casein and β -lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. *Neth. Milk Dairy J.* 46:145-168.
- Velíšek, J., Hajšlová, J. (2009). *Chemie potravin (Rozšířené a přepracované 3. vydání)*. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-17-6
- Tančín, V. *Fyziologie reflexu ejekce mléka kráv*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2013. ISBN 978-80-552-1030-8.

- Tellam, R. L., Lemay, D. G., Van Tassell, C. P., Lewin, H. A., Worley, K. C., & Elsik, C. G. (2009). Unlocking the bovine genome. *BMC genomics*, *10*(1), 193.
- Teplan, V. a kol. Praktická neurologie. Grada Publishing a.s. 2006, 496 p. ISBN: 80-247-1122-2
- Tishkoff, S. A., Reed, F. A., Ranciaro, A., Voight, B. F., Babbitt, C. C., Silverman, J. S., ... & Ibrahim, M. (2007). Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature genetics*, *39*(1), 31-40.
- Tsiaras AM, Bargouli GG, Banos G, Boscós CM (2005). Effect of Kappa-casein and β -lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *J Dairy Sci.* 88: 327-334.
- Zhu, M., & Zhao, S. (2007). Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int J Biol Sci*, *3*(7), 420-427.