

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Vliv genetické příslušnosti na složení a obsah bílkovin
v kozím mléce**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Magdaléna Bártová

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

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

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Vliv genetické příslušnosti na složení a obsah bílkovin v kozím mléce“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Aleně Hejtmánkové, CSc. za ochotný přístup, cenné rady a připomínky a za čas, který věnovala vedení mé diplomové práce. Velké poděkování patří také mé rodině za podporu po celou dobu studia.

Vliv genetické příslušnosti na složení a obsah bílkovin v kozím mléce

Souhrn

V teoretické části této diplomové práce byla vypracována literární rešerše shrnující současné poznatky o složení bílkovin v kozím mléce a o polymorfismu mléčných bílkovin. Jednotlivé genetické varianty mléčných bílkovin mají vztah ke složení mléka a tak i k vlastnostem výrobním a nutričním. Správná selekce mléčných koz na bázi plemene či složení mléka by mohla být využita za účelem vylepšení vlastností při produkci sýrů i pro snížení alergenicity mléka.

V praktické části byl hodnocen vliv fáze laktačního období a vliv rozdílných genotypů α 1-CN a κ -CN na celkový obsah bílkovin a na procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v kozím mléce. Dále byl hodnocen vliv těchto genotypů na syřitelnost mléka. V genetické výbavě jednotlivých zvířat, od kterých byly odebrány vzorky mléka, byly ve Výzkumném ústavu živočišné výroby zjištěny alely A, B a F pro α 1-CN a alely A, B, C a G pro κ -CN. K analýze byly použity vzorky mléka plemene koza bílá krátkosrstá. Vzorky byly odebrány v měsících květen, červen a červenec 2017. Metodou HPLC bylo stanoveno procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí ve vzorcích kozího mléka. Ve Výzkumném ústavu mlékárenském byl zároveň stanoven celkový obsah bílkovin v mléce metodou NIR a také syřitelnost mléka.

Byly pozorovány změny v obsahu bílkovin i v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v mléce v závislosti na fázi laktace. Celkový obsah bílkovin od května do července postupně klesal a je předpoklad, že ke konci laktace bude opět narůstat. Při hodnocení vlivu genotypu α 1-CN byly stanoveny rozdíly v obsahu bílkovin i v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí mezi genotypem FF a genotypy FA a FB. Celkový obsah bílkovin v mléce byl nejnižší u genotypu FF, který zahrnuje dvě slabé alely. Mezi genotypy FA a FB nebyly stanoveny statisticky významné rozdíly, jelikož oba genotypy zahrnují jednu alelu silnou a druhou slabou. Při hodnocení vlivu genotypu κ -CN byly také nalezeny některé rozdíly v obsahu bílkovin i v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí, konkrétně rozdíly v obsahu κ -CN a α -La. Vliv genotypů α 1-CN a κ -CN na syřitelnost mléka nebyl prokázán. Rozptyl hodnot syřitelnosti mléka byl velký a pravděpodobně převládá individualita jednotlivých zvířat nad genotypem.

Klíčová slova: kozí mléko, genotyp, kasein, syrovátkové bílkoviny, HPLC

Influence of genetic affiliation on the composition and protein content in the goat milk

Summary

In the theoretical part of this diploma thesis, the current state of knowledge of goat milk protein composition and polymorphism of its proteins is summarized. The individual genetic variants of milk proteins are related to the milk composition and thus to its production and nutritional properties. A correct selection of dairy goats based on breed or milk composition could be used to improve properties of cheese production as well as to decrease allergenicity of milk.

In the practical part, the influence of lactation period and the effect of various genotypes of α s1-CN and κ -CN on the total protein content and on the percentage representation of the individual protein fractions in goat milk were evaluated. Furthermore, the effect of these genotypes on rennetability of the milk was evaluated.

The samples were collected from Czech White Short-haired goats during May, June, and July 2017. In the individual animals the alleles A, B and F were determined for α s1-CN and alleles A, B, C and G for κ -CN at the Institute of Animal Science. The percentages of individual protein fractions were determined by the HPLC method. Furthermore, the total protein content in the milk was determined using the NIR method and also rennetability of the milk was determined at the Dairy Research Institute.

Differences in total protein content as well as differences in representation of the individual protein fractions in respect the lactation stage were found. The total protein content was gradually decreasing from May to July. It is assumed that it will increase again towards the end of the lactation. When assessing the effect of the α s1-CN genotype, differences in protein content were also determined as well as differences in the representation of individual protein fractions between genotype FF and genotypes FA and FB. The total protein content was lowest in milk samples collected from animals with FF genotype. This genotype includes two weak alleles. No statistically significant differences were found between genotypes FA and FB. Both include one strong and one weak allele. When assessing the effect of the κ -CN genotype, some differences in the protein content and in the representation of the individual protein fractions were also found. Namely, in the representation of fractions κ -CN and α -La. The effect of genotypes of α s1-CN and κ -CN on the milk's rennetability were not proven. The deviation of rennetability values was large. It is likely that the individuality of each animal has a stronger impact on rennetability than their genotype.

Keywords: goat milk, genotype, casein, whey proteins, HPLC

Obsah

1.	ÚVOD.....	1
2.	VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	2
3.	LITERÁRNÍ REŠERŠE	3
3.1.	Kozí mléko	3
3.2.	Bílkoviny	4
3.2.1.	Geny pro bílkoviny a polymorfismus.....	5
3.2.2.	Kaseiny	5
3.2.2.1.	α 1-kasein (α 1-CN)	6
3.2.2.2.	α 2- kasein (α 2-CN)	7
3.2.2.3.	β -kasein (β -CN).....	8
3.2.2.4.	κ -kasein (κ -CN)	9
3.2.3.	Syrovátkové bílkoviny (WP)	10
3.2.3.1.	β -laktoglobulin (β -Lg).....	11
3.2.3.2.	α -laktalbumin (α -La).....	11
3.2.3.3.	Sérový albumin.....	12
3.2.3.4.	Imunoglobuliny (Ig)	12
3.3.	Výroba a výtěžnost sýrů z kozího mléka	13
3.4.	Alergie na mléčné bílkoviny	14
3.5.	Plemeno koza bílá krátkosrstá	15
4.	MATERIÁL A METODIKA	17
4.1.	Vzorky mléka	17
4.2.	Chemikálie.....	18
4.3.	Pomůcky.....	18
4.4.	Přístroje	19
4.5.	Příprava vzorků mléka.....	19
4.6.	Chromatografické podmínky.....	19
4.7.	Statistické vyhodnocení	22
5.	VÝSLEDKY	23
5.1.	Vliv fáze laktace na obsah bílkovin v mléce	31
5.2.	Vliv genotypů α 1-CN a κ -CN na obsah bílkovin v mléce	34
5.3.	Vliv genotypů α 1-CN a κ -CN na syřitelnost mléka	42

6.	DISKUZE	45
6.1.	Vliv genotypu α 1-CN na složení a obsah bílkovin	46
6.2.	Vliv genotypu κ -CN na složení a obsah bílkovin	47
6.3.	Vliv fáze laktace na složení a obsah bílkovin	49
6.4.	Vliv genotypu α 1-CN a κ -CN na syřitelnost	51
7.	ZÁVĚR	53
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53
9.	PŘÍLOHY	60
10.	SEZNAMY	61
10.1.	Seznam obrázků	61
10.2.	Seznam tabulek	61
10.3.	Seznam grafů	62
10.4.	Seznam příloh	62

SEZNAM ZKRATEK

α1-CN	α 1-kasein
α2-CN	α 2- kasein
α-La	α -laktalbumin
β-CN	β -kasein
β-Lg	β -laktoglobulin
κ-CN	κ -kasein
CMA	alergie na bílkoviny kravského mléka (cow milk protein allergy)
CN	kaseiny
CSN1S1	gen pro α 1-kasein
CSN1S2	gen pro α 2-kasein
CSN2	gen pro β -kasein
CSN3	gen pro κ -kasein
HCl	kyselina chlorovodíková
HPLC	vysokoúčinné kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
Ig	imunoglobuliny
kb	kilobáze
LALAB	gen pro α -La
LOD	mez detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
PDA	detektor diodového pole
PVDF	polyvinylidenfluorid
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
TFA	kyselina trifluoroctová
WP	syrovátkové bílkoviny

1. ÚVOD

Mléko přežvýkavců tvoří nedílnou součást lidské stravy už od počátků domestikace hospodářských zvířat. V mnoha rozvojových zemích má chov koz hlavní úlohu v živočišné výrobě. Objem produkce kozího mléka zaujímá celosvětově třetí místo po mléku kravském a buvolím.

Kozí mléko je cenným zdrojem proteinů, vápníku a fosforu v mnoha zemích, především afrických a asijských, ale také například ve Francii, Norsku a Itálii. Oproti těmto zemím jsou v České republice kozí mléko a kozí sýry méně tradiční komoditou, avšak jejich obliba roste. Poptávka po kozím mléce a výrobcích z kozího mléka v posledním desetiletí postupně narůstá díky přesvědčení, že má kozí mléko unikátní terapeutické a zdravotní účinky. Kozí mléko je v evropských zemích využíváno především k výrobě sýrů a fermentovaných mlék.

Kvalita kozího mléka může být hodnocena vzhledem k hygienickým, nutričním, senzorickým i technologickým parametrům. Všechny tyto parametry podléhají mnoha faktorům, jako je životní prostředí, zdravotní stav, plemeno, fáze laktace a další. Obsah proteinů (bílkovin) v mléce patří mezi důležitá technologická kritéria kvality kozího mléka.

Mléčné bílkoviny se rozdělují obecně na kaseinové a syrovátkové. Mají v mléce význam nutriční i technologický. Mléčné proteiny, především syrovátkové, jsou pro člověka významným nutričním zdrojem. Dodávají organismu aminokyseliny pro syntézu vlastních proteinů a dalších dusíkatých látek. Složení proteinů kozího mléka přispívá k tomu, že má kozí mléko oproti kravskému lepší stravitelnost a pravděpodobně nižší alergenicitu. Technologický význam mléčných bílkovin spočívá v jejich funkci při výrobě sýrů a dalších mléčných produktů. Kaseiny jsou v mléce produkovány v podobě micel. Výroba sýra je založena na štěpení peptidové vazby κ -CN na jejich povrchu. Dojde tak k uvolnění hydrofobních kaseinů a tím ke koagulaci micel. Vysoký obsah kaseinů a obecně proteinů přispívá k lepším koagulačním vlastnostem a vyšší sýrařské výtěžnosti.

Mléčné bílkoviny jsou geneticky polymorfní. Jednotlivé genetické varianty bílkovin mají vztah ke složení mléka, nutričním charakteristikám a výrobním vlastnostem při produkci sýrů. Správná selekce mléčných koz na bázi plemene či složení mléka by mohla být využita za účelem vylepšení těchto vlastností.

2. VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce je v teoretické části vypracovat literární rešerši shrnující současné poznatky o složení bílkovin v kozím mléce a o polymorfismu mléčných bílkovin. V praktické části budou sledovány změny v obsahu bílkovin a v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v kozím mléce plemene koza bílá krátkosrstá. Změny budou vyhodnocovány v závislosti na genetické příslušnosti zvířete v průběhu laktačního období. Experimentálně zjištěné rozdíly budou statisticky vyhodnoceny.

Hypotézy:

- Zastoupení a obsah jednotlivých bílkovinných frakcí v mléce se liší v závislosti na genetické příslušnosti a individualitě dojeného zvířete.
- Zastoupení a obsah jednotlivých bílkovinných frakcí v mléce se v průběhu laktačního období liší.
- Zastoupení a obsah jednotlivých bílkovinných frakcí v mléce ovlivňuje syřitelnost mléka.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1. Kozí mléko

Mléko je sekret mléčné žlázy. Jde o emulzi olej ve vodě, která obsahuje mléčné tuky, proteiny a laktózu, a dále i minerální látky, enzymy, somatické buňky, hormony, a další složky (Selvaggi et al., 2014). Průměrné složení kozího mléka a porovnání s mlékem kravským je uvedeno v Tabulce č. 1. Složení a vlastnosti mléka se liší jednak v závislosti na živočišném druhu, ale jsou také ovlivněny dalšími faktory, jako je výživa, roční období, životní prostředí, plemeno, stádium laktace a další (Park et al., 2007). Kozí mléko se od kravského liší vyšší stravitelností, odlišnou alkalinitou, vyšší pufruční kapacitou a terapeutickými účinky využívanými v lidské výživě a medicíně. Nutriční a metabolické vlastnosti kozího mléka jsou zkoumány pro možnost jejich využití ve výživě kojenců, malých dětí a také dospělých trpících alergií na bílkovinu kravského mléka a gastrointestinálními problémy (Montalbano et al., 2016).

Lepší stravitelnost kozího mléka oproti kravskému souvisí s přirozenou homogenitou mléčného tuku. Tukové kuličky kozího mléka jsou menší a mají tak větší povrch. Působení lipáz je díky tomu rychlejší. Lepší stravitelnost je také dána vyšším obsahem mastných kyselin s krátkým a středním řetězcem. Kyseliny kaprylová, kapronová a kaprinová, typické pro kozí mléko, bývají využívány pro léčbu malabsorpčních syndromů, střevních problémů, koronárních onemocnění, cystické fibrózy, žlučových kamenů a pro kojeneckou výživu, jelikož dodávají energii a zároveň snižují ukládání cholesterolu. Proteiny kozího mléka jsou rychleji tráveny a jejich aminokyseliny jsou absorbovány účinněji. (Ribeiro et Ribeiro, 2010).

Tabulka č. 1: Průměrné složení kozího a kravského mléka (Jandal, 1996).

Složky mléka	Kozí mléko	Kravské mléko
Tuk (%)	3,8	3,67
Bílkoviny (%)	2,9	3,23
Laktóza (%)	4,08	4,78
Minerální látky (%)	0,79	0,73

3.2. Bílkoviny

Hlavní bílkoviny kozího mléka jsou stejné jako v mléce kravském. Mléčné proteiny se dělí do dvou základních kategorií - nerozpustné kaseiny a rozpustné syrovátkové bílkoviny (WP). Kaseiny zahrnují α 1-kasein, α 2-kasein, β -kasein a κ -kasein. Hlavní WP jsou β -laktoglobulin a α -laktalbumin. V menším množství jsou pak zastoupeny imunoglobuliny, sérový albumin, laktoferin, transferin, kalcium-vázající protein, prolaktin, folát-vázající protein a proteózo-peptony (Selvaggi et al., 2014). Proteózo-peptony jsou produktem rozkladu β -kaseinu plasminem. Imunoglobuliny a sérový albumin nejsou specifické pro mléko a jsou shodné s těmi, které se vyskytují v krvi (Park et al., 2007). Poměr kaseinových bílkovin ku WP v kozím mléce je asi 80 : 20, podobně jako v kravském mléce (Selvaggi et al., 2014). Kozí mléko se tedy řadí mezi mléka kaseinová, která mají zastoupení kaseinů alespoň 75 % (Gajdůšek, 2003). Celkový obsah proteinů v kozím mléce je různý, pohybuje se přibližně od 2,6 g l^{-1} do 4,1 g l^{-1} , v závislosti na genetických vlivech a plemenné příslušnosti, stádiu laktace, ročním období, věku a krmivu (Raynal-Ljutovac et al., 2008). Obsah nebílkovinných dusíkatých látek zaujímá 5,8 % celkových dusíkatých látek. Vyskytuje se především močovina, volné aminokyseliny, nukleotidy a polyaminy (Selvaggi et al., 2014).

Mléčné proteiny jsou pro člověka významným nutričním zdrojem. Dodávají organismu aminokyseliny pro syntézu vlastních proteinů a dalších dusíkatých látek. Některé z mléčných proteinů také obsahují bioaktivní peptidy, které se uvolňují při hydrolýze bílkovin a mohou mít vliv na lidské zdraví. Mezi účinky jednotlivých peptidů patří mimo jiné například účast na vazbě a přenosu minerálních látek a růstových faktorů, regulace krevního tlaku nebo protektivní působení proti některým mikroorganismům a virům. Nutriční význam mléčných proteinů závisí na obsahu esenciálních aminokyselin (Almaas et al., 2006).

Ve složení proteinů kozího a kravského mléka existují rozdíly a stejně tak i rozdíly mezi jednotlivými plemeny v rámci každého druhu, v závislosti na různých faktorech, například stádiu laktace, krmení, klimatu a výskytu mastitidy. V důsledku této rozmanitosti by měly být používány různé zkušební metody a standardy. Haenlein (2004) uvádí, že kozí mléko má o 1 % vyšší kapacitu vazby barviv než kravské mléko a o 4 % nižší absorpci v infračervené oblasti. Je proto vhodné při měření obsahu mléčných proteinů použít rozdílné kalibrační křivky pro každý druh.

3.2.1. Geny pro bílkoviny a polymorfismus

Proteiny kozího mléka jsou podle obecné klasifikace stejné jako proteiny kravského mléka. Liší se ale v genetickém polymorfismu a jejich frekvenci výskytu (Haenlein, 2004). Genetickým polymorfismem se rozumí výskyt více variant (alel) určitého genu (Mátlová et Sztankóová, 2010). Polymorfismus je následkem mutace. Jde o rozdíl v sekvenci DNA (Yahyaoui, 2003). Polymorfismus může být detekován pomocí elektroforézy nebo analýzy DNA (Moioli et al., 1998). Polymorfismus mléčných proteinů byl popsán na úrovni proteinů i na úrovni DNA (Abd El-Gawad et Ahmed, 2011).

Více než 95 % proteinů mléka přežvýkavců je syntetizováno ze šesti strukturních genů, které kódují šest hlavních proteinů. Gen pro β -laktoglobulin je umístěn na 11. chromozomu a gen pro α -laktalbumin na 5. chromozomu. Geny pro kaseinové bílkoviny jsou na 6. chromozomu (Martin et al., 2002). Jedná se o jednoduché autozomální geny. Všechny čtyři geny, které kódují kaseiny, jsou úzce spojeny a tvoří shluk zabírající 250 kilobází (kb) fragmentu DNA (Najafi et al., 2014). Tvoří haplotyp, tedy shluk genů, které jsou v těsné blízkosti vedle sebe na jednom nepohlavním chromozomu a dědí se zpravidla společně (Mátlová et Sztankóová, 2010). U mnoha plemen byly identifikovány příznivé haplotypy, které mají pozitivní vliv na kvalitu mléka a technologické vlastnosti. Všechny kaseinové frakce vykazují vysokou variabilitu. Nejvíce variabilní z kaseinových genů je gen pro α s1-kasein - CSN1S1 (Ballabio et al., 2011). Polymorfismus je u tohoto genu významný, jelikož ovlivňuje i celkový obsah kaseinů a dalších složek mléka (Pirisi et al., 1994).

Polymorfismus mléčných proteinů má vztah ke složení mléka, nutričním charakteristikám a výrobním vlastnostem při produkci sýrů, jako jsou vlastnosti koagulační, velikost a mineralizace micel a sýrařská výtěžnost (Montalbano et al., 2016).

3.2.2. Kaseiny

Kaseiny tvoří hlavní proteinovou frakci mléka mnoha druhů zvířat. Jejich funkcí je přenos fosforečnanu vápenatého v mléce, a tak zásobení mláďat zdrojem vápníku a fosforu pro tvorbu kostí a dále přispívají k zásobení organismu aminokyselinami. Kaseiny se řadí do skupiny fosfoproteinů. Jsou syntetizovány v mléčné žláze v reakci na laktogenní hormony a další podněty. Jsou produkovány v podobě micel, tedy velkých koloidních agregátů, které jsou zodpovědné za většinu jedinečných fyzikálních vlastností mléka (Selvaggi et al., 2014). Při pokojové teplotě se kaseiny vysráží při pH 4, 6, čehož se využívá při produkci mléčných výrobků. Kaseinové micely jsou propojeny fosforečnanem vápenatým a také malým

množstvím hořčíku, draslíku a citrátu, které rozptylují světlo a dodávají mléku neprůhledný bílý vzhled (Park et al., 2007). Struktura micely kozího mléka se liší od kravského v průměru, hydrataci a mineralizaci (Silanikove et al., 2010). Kaseinové micely v kozím mléce jsou velké asi 260 nm (Wang et al., 2017). Jsou tedy větší než micely kravského mléka, které mají asi 60–80 nm (Silanikove et al., 2010). Micely kozího mléka obsahují více vápníku a anorganického fosforu. Jsou méně rozpustné, méně tepelně stabilní a snadněji ztrácí β -kasein (Park et al., 2007).

3.2.2.1. α 1-kasein (α 1-CN)

Frakce α 1-CN je jedním z kalcium senzitivních kaseinů a z nich je v přítomnosti vápníku nejvíce rozpustný. Jde o vysoce fosforylovaný protein. Je strukturní součástí kaseinové micely a ovlivňuje tvorbu sýřeniny. α 1-CN sestává z 214 aminokyselin. Gen kódující tento protein se označuje jako CSN1S1 (Selvaggi et al., 2014). Je charakterizován 19 exony, které zahrnují od 24 po 388 párů bází. Tento gen zabírá v DNA přes 17,5 kb (Najafi et al., 2014).

α 1-CN vykazuje velké individuální změny v kvantitě výskytu v důsledku existence genetického polymorfismu a má vliv na kvalitu a technologické vlastnosti mléka. Jednotlivé varianty se odlišují záměnou aminokyselin (jednonuklidové substituce), delecí peptidového fragmentu nebo posttranslačními modifikacemi, jako je fosforylace nebo glykosylace. Modifikace způsobují změny v sekundární a terciární struktuře proteinů (Ballabio et al., 2011). Doposud bylo identifikováno mnoho alel, které souvisí s různým stupněm exprese genu CSN1S1 v mléce. Podle několika autorů bylo identifikováno minimálně 17 variant tohoto genu (Selvaggi et al., 2014; Dagnachew et Ådnøy, 2014; Marletta et al., 2007; Sztankóova et al., 2007; Moatsou et al., 2008). Caboni et al. (2016) v novější studii uvádí, že bylo popsáno minimálně 23 variant. Varianty genu CSN1S1 jsou děleny do čtyř skupin a to v závislosti na obsahu α 1-CN v mléce. Dělí se na alely silné (A, A2, A3, A', B1, B2, B3, B4, B', C, H, L, M), střední (D1, E, I), slabé (D, F, G) a nulové (01, 02, 04, N) (Caboni et al., 2016). Silné alely jsou spojeny každá s produkcí asi $3,5 \text{ g l}^{-1}$ α 1-CN, střední alely produkují přibližně $1,1 - 1,7 \text{ g l}^{-1}$ a slabé $0,45 \text{ g l}^{-1}$ α 1-CN. Výskyt nulové alely znamená nepřítomnost α 1-CN v mléce (Najafi et al., 2014). Mléko zvířat se silným genotypem má větší předpoklady pro výrobu sýrů, zatímco mléko zvířat se slabým či nulovým genotypem by mohlo být využíváno pro alergiky, protože mléko postrádající α 1-CN je pravděpodobně méně alergenní (Caboni et al., 2016). Nulové varianty jsou typické pro původní norskou kozí populaci. Vyskytují se v ní ve významně vyšší frekvenci než u jiných evropských plemen.

Nulová varianta $\alpha 1$ -CN, označovaná jako exon 12 D alela, je jedinečná pro norské kozy. Mutace vychází z delece jedné báze ve 12 exonu genu CSN1S1. Její výskyt snižuje obsah proteinů a tuku v mléce. Výskyt slabých a nulových variant je u ostatních evropských plemen nízký, s výjimkou španělského plemene Canaria a italských plemen Frisa a Garganica (Devold et al., 2011).

Obsah $\alpha 1$ -CN je v relaci s ostatními mléčnými složkami a koagulačními vlastnostmi. Kozí mléko, které obsahuje vysoké či střední množství $\alpha 1$ -CN má vyšší hladiny ostatních mléčných komponent než mléko bez $\alpha 1$ -CN. Mléka od zvířat se silnými alelami mají vyšší obsah sušiny, mléčného tuku a proteinů, vykazují vyšší aktivitu vápníku, nižší pH a obsahují menší kaseinové micely v porovnání s mléky s nižším výskytem $\alpha 1$ -CN. Mléka s vyšším obsahem $\alpha 1$ -CN tak vykazují příznivější vlastnosti při výrobě sýrů, jako jsou koagulační vlastnosti, výtěžnost a kvalita. Výrobky ze „silných“ mlék, bývají méně náchylné k lipolýze a přejímání pachů (Devold et al., 2011). $\alpha 1$ -CN je důležitý pro schopnost tvorby sýřeniny. Mléko s vysokým obsahem $\alpha 1$ -CN tvoří pevnější sraženinu. Pevnost sraženiny je hlavní vlastnost, která ovlivňuje kvalitu, výtěžnost a ekonomickou návratnost při výrobě sýrů (Clark et Sherbon, 2000). K pevnosti sraženiny přispívá nižší velikost kaseinových micel a ta také snižuje čas potřebný k vyvločkování při výrobě sýrů (Pirisi et al., 1994).

Mléko, které obsahuje malé množství nebo žádný $\alpha 1$ -CN má nižší výtěžnost při výrobě sýrů, delší koagulační čas při srážení syřidlem, horší tepelnou stabilitu a řidší sýřeninu, což pravděpodobně přispívá k lepší stravitelnosti výrobků z takového mléka v trávicím traktu člověka (Ballabio et al., 2011).

3.2.2.2. $\alpha 2$ - kasein ($\alpha 2$ -CN)

Frakce $\alpha 2$ -CN se skládá z 207 aminokyselin. Obsahuje velké množství pozitivně nabitých postranních řetězců, především na C-konci peptidového řetězce, tedy na konci s volnou karboxylovou skupinou.. Obsahuje dva cysteinové zbytky a málo prolinu. $\alpha 2$ -CN je protein, který se nevyskytuje v mateřském mléce (Selvaggi et al., 2014).

Gen kódující $\alpha 2$ -CN se označuje jako CSN1S2 (Marletta et al., 2004). Gen zabírá v DNA 18, 5 kb. Zahrnuje 18 exonů, které obsahují od 21 po 266 párů bází (Marletta et al., 2007). V kozím mléce bylo identifikováno 8 variant genu CSN1S2. Stejně jako u $\alpha 1$ -CN jsou jednotlivé alely spojeny s určitou mírou produkce tohoto proteinu. Varianty se dělí do tří skupin s odlišnými úrovněmi syntézy $\alpha 2$ -CN (Bozkaya et al., 2008). Jedinci s výskytem silných alel (A, B, C, E, F, G) produkují mléko s normálním obsahem $\alpha 2$ -CN, tedy

kolem $2,5 \text{ g l}^{-1}$ na každou alelu (Park et al., 2007). Tyto varianty se od sebe liší záměnou jediné aminokyseliny v důsledku bodových mutací (Marletta et al., 2007). Silné varianty mají větší alergenní potenciál. Alela D snižuje obsah $\alpha\text{s}2\text{-CN}$ v mléce na asi $1,5 \text{ g l}^{-1}$ (Montalbano et al., 2016). Alela D je vzácně se vyskytující defektní alela charakterizovaná delecí 106 párů bází v 11. exonu a následujícím intronu. Delecí u této varianty dochází ke ztrátě kodonů pro prolin, treonin a valin na pozicích 122, 123 a 124 a dále k substituci treoninu za asparagin na pozici 121 (Marletta et al., 2007; Selvaggi et al., 2014). Při výskytu nulové alely 0 není v mléce detekováno žádné množství $\alpha\text{s}2\text{-CN}$ (Park et al., 2007). Mutace charakterizující alelu 0 je záměna guaninu za adenin na 80. nukleotidu v 11. exonu. Touto záměnou dochází k vytvoření předčasného stop kodonu na pozici 110. Výskyt nulové alely byl identifikován pouze u malých populací v jižní Itálii a to vždy v nízkých frekvencích výskytu. Mohlo by jít o genetickou zvláštnost této populace. Při přítomnosti dvou normálních alel má $\alpha\text{s}2\text{-CN}$ zastoupení asi 16 % z celkových kaseinů. U heterozygotů s jednou alelou normální a druhou nulovou klesá toto procento na asi 9 % zastoupení. U jedinců homozygotních s oběma nulovými alelami dochází k úplné absenci $\alpha\text{s}2\text{-CN}$ (Marletta et al., 2004).

3.2.2.3. β -kasein (β -CN)

Z proteinů je v kozím mléce β -CN zastoupen nejvíce. Může tvořit až 60 % z celkového obsahu kaseinů (Neveu et al., 2003). Podobnost kozího β -CN s kravským je 91 % (Hazebrouck et al., 2013). Stejně jako $\alpha\text{s}1\text{-CN}$ a $\alpha\text{s}2\text{-CN}$ patří mezi kalcium senzitivní kaseiny a sráží se v přítomnosti vápenatých iontů. Gen kódující β -CN se označuje jako CSN2. Tento gen je menší než geny pro ostatní kaseiny citlivé na přítomnost vápníku. Skládá se z 9 exonů, které zahrnují od 24 po 492 párů bází. β -CN byl dlouhou dobu považován za monomorfní. Postupně ale bylo objeveno 8 jeho variant (Marletta et al., 2007). Alely A, A1, B, C, D a E jsou spojeny s normální produkcí β -CN. Kromě normálních alel byly objeveny u některých italských plemen i dvě nulové alely – 0 a 0'. Obě jsou charakterizovány mutací, která u nich zodpovídá za vznik předčasného stop kodonu v 7. exonu. Varianta 0 vychází z jediné delece adeninu a vede k vytvoření stop kodonu v pozici 73, zatímco varianta 0' vzniká záměnou cytosinu za thymin a stop kodon se tvoří na pozici 182. Obě nulové alely jsou spojeny s nedetekovatelným množstvím β -CN v mléce. Mléko s nulovými variantami β -CN vykazuje delší čas koagulace, nižší pevnost sraženiny a menší velikost micel. Výtěžnost při výrobě sýrů je u „nulového“ mléka pouze 80 % ve srovnání s mlékem s normálním obsahem tohoto kaseinu (Selvaggi et al., 2014).

3.2.2.4. κ -kasein (κ -CN)

Frakce κ -CN reprezentuje asi 15 % z celkového obsahu kaseinů. κ -CN kozího mléka se skládá ze 171 aminokyselin (Selvaggi et al., 2014). Gen kódující κ -CN je CSN3 a zabírá 14 kb. Zahrnuje 5 exonů, ale kódující oblast pro zralý protein je obsažena především ve čtvrtém exonu (162 aminokyselin). Čtvrtý exon tedy nese více než 90 % informace pro kódování κ -CN. V posledních několika letech bylo zjištěno, že gen CSN3 vykazuje mnoho alelických forem (Marletta et al., 2007). Bylo charakterizováno 16 alel. Z nich 13 vede ke vzniku odlišných proteinových variant a 3 z nich jsou tiché mutace detekovatelné pouze na úrovni DNA (Chiatti et al., 2007). Jednotlivé varianty se dělí do dvou skupin na základě jejich isoelektrického bodu. Skupina A zahrnuje 12 alel (A, B, B', B'', C, C', F, G, H, I, J, L), jejichž isoelektrický bod je 5,29. Do skupiny B se řadí 4 alely (D, E, K, M) a jejich isoelektrický bod je 5,66. Skupina B je spojena s vyšším obsahem kaseinů v mléce než skupina A.

V porovnání s ostatními kaseiny má κ -CN odlišné charakteristické vlastnosti. Je rozpustný v přítomnosti vápenatých iontů, obsahuje méně fosfátu a je hydrofilní (Marletta et al., 2007). κ -CN určuje technologické vlastnosti mléka. Zatímco kalcium senzitivní kaseiny jsou soustředěny uprostřed micel, κ -CN se vyskytuje na jejich povrchu. N-konec molekuly κ -CN, tedy konec s volnou aminoskupinou, interaguje s ostatními kaseinovými frakcemi a C-konec molekuly vytváří hlavní vnější vrstvu kaseinové micely (Yahyaoui, 2003). Umožňuje tak vytvoření a stabilizaci kaseinových micel a podmiňuje jejich velikost a funkci (Yahyaoui et al., 2003). κ -CN v mléce přežvýkavců obsahuje 2 cysteinové zbytky na pozici 11 a 88 a protein se tak vyskytuje v polymerní formě navázáním přes disulfidické vazby. Polymerní struktura κ -CN pravděpodobně usnadňuje jeho roli v pokrývání povrchu micel, a tím jejich stabilizaci. Při tepelném ošetření mléka se κ -CN váže pomocí disulfidických vazeb k syrovátkovým proteinům a α s2-CN. Tím se zvyšuje povrch micel a ovlivňují technologické vlastnosti mléka. K α s1-CN a β -CN se κ -CN neváže, jelikož neobsahují žádné cysteinové zbytky.

Kromě stabilizace kaseinových micel má κ -CN další zásadní funkci, a to při výrobě sýrů, protože je citlivý na srážecí účinek syřidla. Syřidlo působí na specifickou labilní vazbu na C-konci molekuly. U přežvýkavců jde o vazbu mezi fenylalaninem a methioninem (Yahyaoui, 2003). κ -CN v mléce ostatních savců je štěpen v místě mezi fenylalaninem a isoleucinem nebo fenylalaninem a leucinem. Tento rozdíl pravděpodobně odráží rozdíly v mechanismu srážení mléka přežvýkavců a nepřežvýkavců (Selvaggi et al., 2014).

Hydrolytické štěpení vede k rozdělení κ -CN na dvě molekuly. Na N-konci polypeptidového řetězce vzniká hydrofobní para- κ -CN a na C-konci se tvoří hydrofilní glykosylovaný kaseinomakropeptid (Yahyaoui et al., 2003). Kaseinomakropeptid zvyšuje retenční čas mléka ve střevech a zvyšuje tak účinnost trávení. Když se z κ -CN, který je na povrchu micely, uvolní kaseinomakropeptid, sníží se elektrostatická a sterická stabilizace povrchu micely, a to umožní spojení micel a vytvoření sraženiny (Yahyaoui, 2003).

κ -CN je jako jediný z kaseinů glykosylovaný. Ke glykosylaci dochází posttranslačně. Sacharidy jsou ke κ -CN vázány pomocí O-glykosidické vazby k reziduum treoninu a serinu na C-konci polypeptidového řetězce. Stupeň glykosylace klesá s postupujícím laktačním obdobím a roste při výskytu mastitidy. Stupeň glykosylace nemá vliv na strukturu micel, ale má vliv na citlivost κ -CN k hydrolytickému štěpení syřidlem. S rostoucí mírou glykosylace klesá citlivost na účinek syřidla (Selvaggi et al., 2014).

3.2.3. Syrovátkové bílkoviny (WP)

WP jsou definovány jako skupina mléčných proteinů, která zůstává rozpuštěna v mléčném séru či syrovátce po vysrážení kaseinů při pH 4,6 a teplotě 20 °C či po vysrážení kaseinů syřidlem (Selvaggi et al., 2014). WP jsou globulární molekuly. Asi 75 % WP tvoří albuminy, a to α -laktalbumin a β -laktoglobulin (Chatteron et al., 2006). Z nutričního hlediska jsou WP nadřazené kaseinům. Jejich aminokyselinový profil je podobnější bílkovinám v mateřském mléku. Proto jsou WP doporučené pro výrobu produktů, které nahrazují kravské mléko a pro kojeneckou výživu. WP také podléhají trávení a vstřebávání ve větší míře než kaseiny. WP se využívají v potravinářství pro své funkční vlastnosti, jako je rozpustnost, viskozita, želatinizace, emulzifikace, pění a hygroskopicitá (Selvaggi et al., 2014). WP jsou hojným a relativně levným vedlejším produktem při výrobě sýrů. Vyznačují se vysokou nutriční kvalitou a v současnosti se využívají pro přípravu různých komerčních produktů s efektem na zdraví spotřebitelů. Zvažuje se jejich využití jako funkčních potravin pro regulaci obezity a dalších současně probíhajících onemocnění, zvláště vysokého krevního tlaku a diabetu 2. typu. Podle Tulipano et al. (2012) klinické studie naznačují, že příjem WP může zlepšit kontrolu glykémie po jídle a zesilovat uvolňování inzulínu, prostřednictvím uvolňování bioaktivních peptidů.

3.2.3.1. β -laktoglobulin (β -Lg)

Frakce β -Lg je hlavní nekaseinovou bílkovinou mléka přežvýkavců. Je přítomný v mléce mnoha druhů zvířat, nevyskytuje se však v mléce mateřském a mléce zajícovitých a hlodavců (Loch et al., 2015). Jde o malý, rozpustný, globulární protein (Chatteron et al., 2006). Jeho isoelektrický bod je 5,9 (Loch et al., 2015). Sestává ze 162 aminokyselin a v mléce tvoří stabilní dimery. Bovinní β -Lg je první mléčný protein, u něhož byl pozorován genetický polymorfismus (Gharedaghi et al., 2016). β -Lg se v kravském mléce vyskytuje ve dvou isoformách – β -LgA a β -LgB, přičemž isoforma B je zastoupena více. Rozdíl mezi isoformou A a B je pouze v obsahu 2 aminokyselin (asparagin a glycin na pozici 64, valin a alanin na pozici 118) a neovlivňuje sekundární ani terciární strukturu bílkoviny (Tavares et al., 2015). Sekvence aminokyselin β -Lg v kozím mléce se od bovinního β -Lg liší pouze v 6 pozicích. Kozí β -Lg vykazuje nižší stupeň variability. U několika plemen koz byl pozorován genetický polymorfismus v genu pro β -Lg, ale Loch et al. (2015) uvádí, že byla identifikována pouze 1 jeho isoforma. Gen pro β -Lg je u koz umístěn na 11 chromozomu (Selvaggi et al., 2014)

β -Lg působí jako zdroj aminokyselin pro mláďata. Jiné fyziologické funkce jsou předmětem zkoumání. Pravděpodobně se β -Lg podílí na transportu retinolu a mastných kyselin (Selvaggi et al., 2014). β -Lg se řadí mezi lipokaliny. Skupina lipokalinů zahrnuje malé proteiny, které mají schopnost vázat hydrofobní molekuly, jako je retinol, mastné kyseliny, aromatické látky, steroidy a další. Lipokaliny sdílejí stejnou strukturu založenou na β -barelu, který je primárním vazebným místem pro ligandy (Loch et al., 2015). Vazebná místa pro mastné kyseliny na β -Lg mu umožňují podílet se na trávení mléčných lipidů během novorozeneckého období (Hernández-Ledesma et al., 2011). El Hanafy et al. (2015) uvádí, že se β -Lg podílí na regulaci enzymů, neonatální aktivaci pasivní imunity spolu s imunoglobulinem G (IgG), vykazuje antimikrobiální aktivitu proti bakteriím způsobujícím mastitidu a působí jako zdroj bioaktivních peptidů. β -Lg je bohatým zdrojem esenciální aminokyseliny cysteinu. Ta stimuluje syntézu glutationu, antikarcinogenního tripeptidu produkovaného v játrech (Hernández-Ledesma et al., 2011).

3.2.3.2. α -laktalbumin (α -La)

Frakce α -La je nejmenší globulární protein z WP a je jedním z hlavních WP v mléce přežvýkavců. Je bohatý na esenciální a podmíněně esenciální aminokyseliny. Obsahuje

vysoké množství lysinu, cysteinu a především tryptofanu (Selvaggi et al., 2014). Jeho isoelektrický bod je 4,8. α -La se skládá z jednoho polypeptidového řetězce, který obsahuje 123 aminokyselin. Zahrnuje osm molekul cysteinu, které jsou kovalentně vázány čtyřmi disulfidickými vazbami (Mátlová et Sztankóová, 2010). U koz je gen pro α -La (LALAB) umístěn na 5. chromozomu a organizovaný do čtyř exonů. Transkripční jednotka se liší délkou na každém exonu, od 75 nukleotidů na třetím exonu po 329 nukleotidů na čtvrtém exonu (Jain et al., 2009). V kozím mléce byly popsány dvě varianty α -La (Moioli et al., 1998). Podobnost kozího α -La s kravským je 94% (Mátlová et Sztankóová, 2010).

Na α -La je umístěno vazebné místo pro vápník a řadí se tak mezi metaloproteiny. Obsahuje jeden atom vápníku na molekulu (Park et al., 2007). Vápník má vliv na strukturu a stabilitu α -La. Mátlová et Sztankóová (2010) uvádí, že vápník je potřebný pro složení denaturovaného proteinu do jeho přirozené struktury pomocí vytvoření disulfidických vazeb mezi cysteiny.

α -La je fyziologicky významný, neboť se podílí na syntéze laktózy, mléčného cukru. Zvyšuje substrátovou aktivitu enzymu β -1,4-galaktosyltransferázy, který katalyzuje tvorbu laktózy z glukózy a UDP-galaktózy (Martin et al., 2002).

3.2.3.3. Sérový albumin

Sérový albumin se do mléka dostává z krve. Sestává z 582 aminokyselin. Má schopnost vázat volné mastné kyseliny a podílí se na syntéze lipidů. Vykazuje antioxidační aktivitu a ochraňuje tak lipidy před oxidací (Hernández-Ledesma et al., 2011).

3.2.3.4. Imunoglobuliny (Ig)

Ig tvoří skupinu globulárních proteinů, které jsou produkovány B-lymfocyty (Hernández-Ledesma et al., 2011). Ig jsou přítomné v mléku i kolostru všech savců. Základní funkcí Ig je dodat mláďatům imunologickou ochranu proti mikrobiálním patogenům a toxinům a také ochránit mléčnou žlázu před infekcí. Jsou rozděleny do tříd s rozdílnou strukturou a biologickou aktivitou. Koncentrace jednotlivých tříd Ig se liší v závislosti na živočišném druhu, plemeni, věku, fázi laktace a zdravotním stavu. Nejvyšší obsah Ig v mléce přežvýkavců je během prvních 12 – 36 hodin po porodu. Mláďata přežvýkavců jsou rozena prakticky bez Ig a proto je pro ně příjem Ig z kolostra nezbytný (Marnila et Korhonen, 2002).

Poskytují mláďatům ochranu, dokud se u nich nevyvine vlastní imunitní systém. Kolostrum tak obsahuje mnohem vyšší množství Ig než zralé mléko (Hernández-Ledesma et al., 2011).

3.3. Výroba a výtěžnost sýrů z koziho mléka

Výroba sýra je proces, při němž dochází ke koncentrování mléčných složek, zejména proteinů a tuků. Čím větší procento pevných látek přejde do sýra, tím větší množství se ho získá a zpeněží. Obecně výtěžnost a kvalita sýrů závisí na celkovém obsahu kaseinů a tuků. Sýrařská výtěžnost je definována jako množství sýra v kg, vyrobené ze 100 kg mléka. Výtěžnost je důležitým ekonomickým faktorem. I malé změny ve výtěžnosti mohou vést k velkým rozdílům v zisku. Výtěžnost je ovlivňována mnoha faktory včetně množství kaseinů a jejich genetických variant (Abd El- Gawad et Ahmed, 2011).

Oproti Francii a Itálii je v České republice kozí sýr méně tradiční komoditou. Francie je největším producentem koziho mléka ve světě a více než 90 % koziho mléka je zde zpracováno na sýry. V porovnání se sýry z kravského mléka existuje méně typů kozích sýrů. Většina jsou to sýry čerstvé, měkké nebo bílé nezrající sýry. Je tomu tak především kvůli horším mechanickým vlastnostem sýřeniny z koziho mléka. Sýřenina bývá obecně příliš měkká, aby odolala mechanickému namáhání v procesu výroby polotvrdých a tvrdých sýrů (Thomann et al., 2008). Kravské a kozí mléko obsahují stejné množství κ -CN a α s2-CN. Kozí mléko obsahuje více β -CN a méně α s1-CN v porovnání s kravským. Sýřenina z koziho mléka tak bývá měkčí než z kravského mléka, i přes to, že je obsah kaseinů stejný (Clark et Sherbon, 2000). Správná selekce mléčných koz na bázi plemene či složení mléka by měla vylepšit schopnost výroby sýrů z koziho mléka (Thomann et al., 2008).

Výtěžnost a kvalitu sýrů ovlivňují koagulační vlastnosti mléka. Ty závisí na složení mléka, teplotě inkubace, typu a koncentraci enzymů i použitých mikrobiálních kultur. Srážení mléka indukované syřidlem má dvě fáze. První fáze je enzymatická. Dochází zde k proteolýze κ -CN. Když je κ -CN hydrolyzován, kaseinové micely se stanou nestabilní a náchylné ke srážení vápníkem. Druhá fáze je neenzymatická a dochází při ní k agregaci kaseinových micel. Během koagulace dochází k vytvoření vazeb mezi kaseinovými micelami a fosforečnanem vápenatým. Vzniká tak zesíťení, které vede k zadržování tuků a dalších pevných látek (Clark et Sherbon, 2000).

Vysoký obsah kaseinů a obecně proteinů přispívá k lepším koagulačním vlastnostem a vyšší sýrařské výtěžnosti. Mléko s vysokým obsahem proteinů má delší koagulační čas než mléko s nízkým obsahem. Koagulace tedy nastupuje pomaleji u mléka s vyšším

obsahem proteinů (kaseinů). Čas koagulace je bod, kdy je poprvé zaznamenána koagulace. Je to čas, kdy se kaseinové micely agregují dostatečně na to, aby vytvořily viditelné vločky. Prodloužení času koagulace u mléka s vysokým obsahem proteinů nastává částečně proto, že takové mléko má vyšší obsah α 1-CN a α 2-CN. Tyto dvě kaseinové frakce zpomalují formování sraženiny tím, že vážou vápenaté ionty, které se tak stávají méně dostupné pro zesítní kaseinových micel po proteolýze κ -CN. Mléko, u něhož trvá delší dobu, než započne koagulace, formuje pevnější sraženinu (Clark et Sherbon, 2000).

Na koagulační vlastnosti i syrařskou výtěžnost má největší vliv polymorfismus α 1-CN a κ -CN. Mléko s vyšším obsahem α 1-CN vykazuje delší koagulační čas a formuje pevnější sraženinu. Výroba sýrů z kozího mléka od koz se slabými či nulovými alelami pro α 1-CN vede k nižší pevnosti sraženiny a nižší výtěžnosti ve srovnání s mlékem od koz se silnými alelami pro α 1-CN (Thomann et al., 2008). Mléko s nízkým obsahem α 1-CN má vyšší ztráty sušiny a tuku do syrovátky. Sýry vyrobené z mléka s vysokým obsahem α 1-CN mají naopak vyšší obsah sušiny, tukuprosté sušiny i tuku (Pirisi et al., 1994). Skupina variant B pro κ -CN je spojena s vyšším obsahem κ -CN i celkových kaseinů. Obsah kaseinů přímo souvisí s výtěžností (Abd El- Gawad et Ahmed, 2011). Polymorfismus κ -CN a hladina jeho glykosylace ovlivňuje citlivost kozího mléka k srážecímu účinku enzymů (Albenzio et Santillo, 2011). Princip srážení mléka syřidlem je popsán v kapitole 3.2.2.4. Obsah variant skupiny B κ -CN má za následek i menší velikost micel, která souvisí se zlepšením koagulačních vlastností mléka. Pro kozí mléko existuje negativní korelace v obsahu kaseinu a velikosti micel. Kravské mléko vykazuje naopak pozitivní korelaci (Pirisi et al., 1994). Kaseinové micely jsou zodpovědné za formování struktury sýra. Sraženina z mléka s menšími micelami je pevnější a schopná zadržovat větší množství pevných látek (Abd El- Gawad et Ahmed, 2011).

3.4. Alergie na mléčné bílkoviny

Složení mléka odráží výživové potřeby mláďat jednotlivých druhů savců. Pro kojence je nejvhodnější a přirozený zdroj potravy mateřské mléko. Pokud ale mateřské mléko není z nějakých důvodů dostupné, většinou se jako náhrada pro kojence využívá mléko kravské. Tato záměna může být spojena s nutričními a imunologickými problémy, jako je alergie na bílkoviny kravského mléka (CMA). Alergie je zvýšená či abnormální reakce imunitního systému vznikající při styku alergenu a tkáně. CMA je abnormální imunologická reakce na jednu nebo více mléčných bílkovin, kdy dochází k reakcím zprostředkovaných IgE.

Kravske mléko obsahuje přes 20 proteinů, které mohou potencionálně způsobit alergickou reakci. Avšak hlavními alergeny kravského mléka jsou α 1-CN a β -Lg (El-Agamy, 2006). β -Lg je zodpovědný za nástup alergií na mléčnou bílkovinu, které postihují značné procento kojenců, kteří jsou vyživováni náhradami mateřského mléka vyrobenými z mléka kravského (Selvaggi et al., 2014).

CMA je nejčastější alergií vyskytující se v prvním roce života. Postihuje 2 – 3 % kojenců. V případě absence mateřského mléka a zároveň výskytu CMA, je nutné pro alergické jedince zajistit alternativní zdroj proteinů. Často jsou k tomuto účelu využívány hydrolyzáty proteinů kravského mléka či výživa založená na sojovém mléce. Možnou alternativou by mohlo být mléko některých druhů zvířat včetně kozího mléka (Ballabio et al., 2011).

CMA je obecně nejzávažnější alergií u kojenců. CMA ve velkém množství případů vymizí kolem 4. roku života dítěte, nicméně u některých jedinců přetrvává i v dospělosti (El-Agamy, 2006). Alergie na bílkoviny kozího mléka byly také identifikovány, ale vyskytují se většinou až v pozdějším věku oproti CMA. Kozí mléko tak může být prospěšné pro malé kojence, kteří jsou závislí na příjmu mléka jako hlavním zdroji obživy. Pro vyvolání nežádoucí reakce při alergii na bílkoviny kozího mléka ho bývá potřeba 5x více než v případě CMA. Nižší alergenita kozího mléka je pravděpodobně ve vztahu k nižšímu obsahu α 1-CN (Silanikove et al., 2010). Ribeiro et Ribeiro (2010) uvádí, že náhrada kravského mléka kozím u osob citlivých na proteiny kravského mléka vyřeší problém ve 40 % případů.

Při náhradě kravského a mateřského mléka mlékem kozím musí být zajištěna jeho dostatečná kvalita a bezpečnost (Selvaggi et al., 2014). Také je důležité dbát na začlenění suplementů kyseliny listové, jelikož kozí mléko a jeho produkty jsou chudým zdrojem kyseliny listové (Pandya et Ghodke, 2006).

Podle Ribeiro et Ribeiro (2010) je kozí mléko také prospěšné pro osoby trpící problémy s aciditou, ekzémy, astmatem, žaludečními vředy, poruchami trávení a příznaky související se stresem, jako je zácpa či nespavost. Je předpoklad, že u lidí s těmito problémy a s CMA by v budoucnu mohla spotřeba kozího mléka a produktů z něj vzrůst za účelem jejich vyřešení.

3.5. Plemeno koza bílá krátkosrstá

Koza bílá krátkosrstá je hlavní plemeno využívané v České republice pro produkci kozího mléka za účelem zpracování na kozí sýry. Jde o české národní plemeno. Chová se především

pro dobré vlastnosti při produkci mléka. Plemeno je charakteristické velmi dobrou plodností, časnou vyspělostí a vysokou úrovní produkce mléka.

Plemeno vznikalo na území Moravy mezi lety 1900 a 1930 křížením místních bílých koz se sánskými kozly pocházejícími ze Švýcarska. Cílem křížení bylo vylepšit mléčnou užitkovost. Původní dominantní vlastností tohoto plemene je bezrohost u obou pohlaví (Sztankóova et al., 2007).

Svaz chovatelů ovcí a koz (n.d.) uvádí dojivost koz tohoto plemene v rozmezí 800 – 1000 kg mléka za rok. Obsah bílkovin se průměrně pohybuje kolem 2,7 %. Od roku 1995 je plemeno koza bílá krátkosrstá zařazeno do Národního programu genetických zdrojů jako potenciálně ohrožený druh (Sztankóova et al., 2007).

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Vzorky mléka

Vzorky mléka byly odebírány na kozí farmě ve východní části České republiky ve spolupráci s Výzkumným ústavem mlékárenským. Farma se zabývá ekologickým způsobem chovu koz plemene koza bílá krátkosrstá. Zvířata jsou krmena krmnou dávkou, která obsahuje senáž, seno, jádro a ovesnou slámu a v létě jsou pouštěna do výběhu na pastvu. Stádo zahrnuje 410 dojených koz a denní nádoj činí 750 – 850 litrů mléka.

Vzorky mléka z večerního nádoje byly odebrány 3x v měsíčním intervalu a to v měsících květen, červen a červenec 2017. Vzorky byly odebírány celkově od 64 zvířat a byly použity přednostně pro stanovení syřitelnosti a pro stanovení obsahu jednotlivých složek mléka metodou NIR ve Výzkumném ústavu mlékárenském. Pro HPLC analýzu byl od 21 zvířat odebrán vzorek ve všech třech měsících, od 31 zvířat ve dvou měsících a od 10 zvířat pouze v jednom z uvedených měsíců. Vzorky byly uchovávány ve zmraženém stavu po dobu méně než 6 měsíců.

Individuální vzorky mléka byly odebírány od koz na základě jejich genotypu. Genotypy byly zjištěny ve Výzkumném ústavu živočišné výroby podle metodiky uvedené v práci Mátlové et Sztankóové (2010). Pro účely této diplomové práce byly rozlišeny alely pro kaseinové frakce α 1-CN (61 koz) a κ -CN (63 koz). Pro α 1-CN se vyskytovaly alely A, B a F. Nulová alela se nevyskytovala u žádné z koz, od které byl odebrán vzorek mléka. Přehled genotypů pro α 1-CN je uveden v Tabulce č. 2. Pro κ -CN se vyskytovaly alely A, B, C a G. Přehled genotypů pro κ -CN je uveden v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 2: Četnost výskytu genotypů pro α 1-CN.

Kombinace alel	Počet zvířat
FA	7
FB	37
FF	17

Tabulka č. 3: Četnost výskytu genotypů pro κ -CN.

Kombinace alel	Počet zvířat
AA	1
AB	10
BB	46
BC	4
BG	1
CC	1

4.2. Chemikálie

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

Všechny použité chemikálie s výjimkou deionizované vody byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Česká republika).

4.3. Pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatické pipety (100 – 1000 μl), (Thermo Scientific, Česká republika)
- Injekční jednorázové stříkačky Luer-Slip (2 ml), (Fischer Scientific, Německo)
- PVDF mikrofiltry s porozitou 0,45 μm , (Chromservis, Česká republika)
- HPLC vialky (2 ml), (VT0098M-1232, Německo)

4.4. Přístroje

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

4.5. Příprava vzorků mléka

Pro přípravu vzorků bylo použito syrové a nehomogenizované mléko, které bylo skladováno ve zmraženém stavu po dobu 4 – 6 měsíců před přípravou vzorků. Po rozmražení bylo přibližně 10 ml mléka odstředěno na centrifuze Eppendorf 5810R při rychlosti 12 000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Následně bylo odstředěné mléko ponecháno 5 minut v mrazicím boxu při -20 °C pro vymražení tuku, který by při chromatografické analýze mohl zanášet kolonu a interferovat při stanovení bílkovin. Po uplynutí 5 minut bylo slito mléčné sérum (supernatant). K 0,5 ml supernatantu bylo přidáno 0,5 ml pufru a 9 ml přefiltrované deionizované vody. Pufir obsahoval 6 M guanidin – HCl, 20 mM dithiothreitol a 5 mM citran trisodný. Vzorek byl krátce vortexován, ponechán 1 hodinu inkubovat při pokojové teplotě a následně znovu vortexován. Poté byl vzorek přefiltrován přes membránový stříkačkový filtr (celulóza - acetát s průměrem pórů 0,45 µm) do vialky o objemu 2 ml. Na filtraci každého vzorku byl použit nový filtr. Roztok ve vialce byl použit pro analýzu na HPLC přístroji. Všechny vzorky byly připraveny ve dvou opakováních.

4.6. Chromatografické podmínky

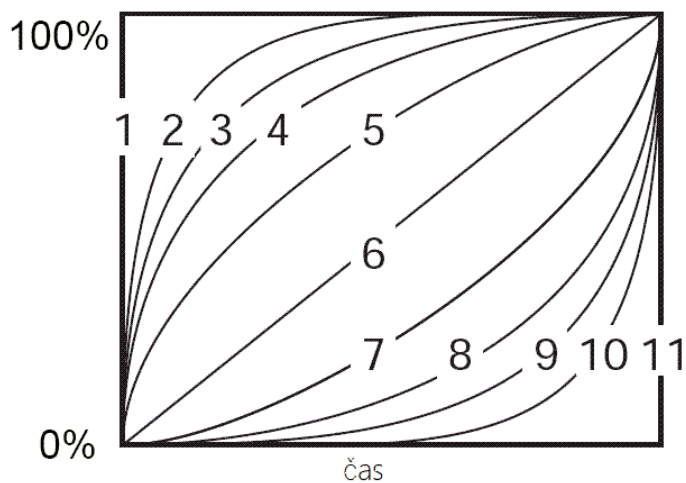
- Analytická kolona: Vydac 214TP C4 5 µm (průměr 2,1 mm, délka 150 mm), (Grace Discovery Sciences, USA)
- Mobilní fáze A: složení - voda:acetonitril (10:90), (v/v) s podílem 0,1 % TFA
- Mobilní fáze B: složení - voda:acetonitril (90:10), (v/v) s podílem 0,1 % TFA
- Průtok mobilní fáze: 0,25 ml/min

- Typ eluce: gradientová – podmínky eluce uvedeny v Tabulce č. 4
- Teplota chromatografické kolony: 40 °C
- Doba analýzy: 71 minut/1 vzorek
- Objem analyzovaného vzorku: 20 µl
- Podmínky detekce: detektor diodového pole (PDA), vlnová délka $\lambda = 218$ nm

Tabulka č. 4: Podmínky gradientové eluce.

Čas (min)	Rychlost průtoku (ml/min)	%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

Obrázek č. 1: Profil křivky pro změnu gradientu.



K tvorbě kalibračních křivek byly použity standardy kaseinů i syrovátkových bílkovin, které byly rozpuštěny ve stejném pufru, jaký byl použit k přípravě vzorků. Z důvodu nedostupnosti standardů pro kozí mléko byly v této práci použity pro vytvoření kalibračních křivek standardy kravského mléka. Bylo porovnáváno relativní procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí. Všechny kalibrační křivky byly ve zvoleném rozsahu koncentrací lineární. Zvolený kalibrační rozsah odpovídal očekávaným hodnotám sledovaných analytů v mléce (korelační koeficient $R = 0,972 - 0,999$). Nejnižší hodnota korelačního koeficientu odpovídá kalibrační závislosti κ -kaseinu. Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé bílkovinné frakce jsou uvedeny v Tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Meze detekce a stanovitelnosti sledovaných analytů.

Bílkovinná frakce	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
α_{S1} - CN	0,02	0,07
α_{S2} - CN	0,05	0,17
β - CN	0,05	0,17
κ - CN	0,02	0,07
α - La	0,03	0,10
β - LgA	0,03	0,10
β - LgB	0,02	0,07

4.7. Statistické vyhodnocení

K výpočtu aritmetických průměrů a směrodatných odchylek byl použit program Microsoft Office Excel 2007. Pro další zhodnocení byl použit statistický software Statistica 12. Bylo hodnoceno, zda existují statisticky významné rozdíly v obsahu celkových bílkovin i jednotlivých bílkovinných frakcí v závislosti na fázi laktace a na genotypu α 1-CN a κ -CN a rozdíly v syřitelnosti mléka v závislosti na genotypu α 1-CN a κ -CN.

V programu byla nejprve ověřena normalita souboru dat, která je předpokladem pro parametrické hodnocení. Pokud byla normalita dat potvrzena, byl pro zhodnocení rozdílů použit dvouvýběrový t-test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. V případě, že normalita dat nebyla potvrzena, bylo použito neparametrické hodnocení pomocí Mann-Whitneyova U-testu, taktéž na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Nulovou hypotézou H_0 bylo $\mu_x = \mu_y$, tedy že mezi jednotlivými vzorky není statisticky významný rozdíl na zvolené hladině pravděpodobnosti. Při porovnávání obsahu bílkovin a bílkovinných frakcí a při porovnávání syřitelnosti, byly za μ_x a μ_y dosazovány jednotlivé měsíce odběru vzorků při hodnocení vlivu fáze laktace a jednotlivé kombinace alel při hodnocení vlivu genotypů α 1-CN nebo κ -CN. Pro zhodnocení platnosti H_0 byla použita p-hodnota. Pokud byla hodnota $p \leq \alpha$, byla H_0 zamítnuta a mezi vzorky tedy existoval statisticky významný rozdíl. V Tabulkách č. 7 – 17 znázorňujících statistické vyhodnocení jsou hodnoty p , které jsou $\leq \alpha$ zvýrazněny modře. Naopak H_0 byla přijata a mezi porovnávanými vzorky neexistoval statisticky významný rozdíl, pokud byla hodnota $p > \alpha$.

5. VÝSLEDKY

Individuální vzorky mléka byly analyzovány metodou HPLC ve dvou paralelních opakováních. Z výsledků analýz pro každý vzorek byl ze dvou opakování vypočítán průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Bylo vypočítáno procentuální zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkového obsahu kaseinu (CN) a procentuální zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkového obsahu WP. Celkový obsah bílkovin byl zároveň stanoven ve Výzkumném ústavu mlékárenském metodou NIR na přístroji Dairy Spec FT. Jelikož je výtěžnost metody HPLC pro stanovení celkového obsahu bílkovin v mléce nedostačující, byly v diplomové práci použity výsledky celkového obsahu bílkovin stanovené NIR analýzou. Tato diplomová práce navazuje na práci Ing. Jany Opravilové (2017), která se částečně zabývala optimalizací metody HPLC pro stanovení bílkovin v kozím mléce. Výtěžnost metody je pro stanovení celkového obsahu bílkovin v kozím mléce prozatím stále nedostačující a je potřeba nadále pokračovat v její optimalizaci.

Přehled procentuálních zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí a celkového obsahu bílkovin ve vzorcích mléka je uveden v Tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí a celkový obsah bílkovin v individuálních vzorcích mléka (jednotlivé frakce stanoveny metodou HPLC, celkový obsah bílkovin metodou NIR). <LOD... pod mezí detekce N...neurčeno

Identifikační číslo zvířete (genotyp α 1-CN; κ -CN)	Měsíc odběru	α 1-CN (% z CN)	α 2-CN (% z CN)	β -CN (% z CN)	κ -CN (% z CN)	α -La (% z WP)	β -LgA (% z WP)	β -LgB (% z WP)	Proteiny (%)	Σ CN (%)
10969 (FF; BB)	Červen	1,15 ± 0,15	<LOD	86,1 ± 1,2	12,75 ± 1,05	56,26 ± 1	43,74 ± 1	<LOD	2,58	60,92 ± 0,68
	Červenec	2,2 ± 0,08	<LOD	78,19 ± 1,48	19,6 ± 1,41	43,5 ± 0,18	56,5 ± 0,18	<LOD	2,53	69,97 ± 0,47
4227 (FF; BB)	Květen	9,31 ± 1,15	0,46 ± 0,14	63,62 ± 3,85	26,61 ± 2,56	30,53 ± 0,79	69,47 ± 0,79	<LOD	2,89	65,8 ± 1,16
	Červen	5,75 ± 1,16	0,54 ± 0,21	63,03 ± 4,59	30,68 ± 3,63	24,36 ± 0,69	64,43 ± 0,58	11,22 ± 1,28	2,55	60,35 ± 0,02
	Červenec	58,45 ± 0,89	2,57 ± 0,5	25 ± 0,67	13,97 ± 0,27	46,09 ± 5,49	43,63 ± 4,84	10,27 ± 0,65	2,44	52,54 ± 2,96
4643 (FB; BB)	Červen	2,39 ± 0,15	0,34 ± 0,02	66,78 ± 4,97	30,49 ± 4,8	20,84 ± 5,85	79,16 ± 5,85	<LOD	2,41	81,38 ± 0,97
	Červenec	4,9 ± 0,36	0,23 ± 0,32	70,04 ± 1,45	24,83 ± 0,77	63,41 ± 0,49	36,59 ± 0,49	<LOD	2,5	58,65 ± 1,1
4725 (FF; BB)	Červen	1,75 ± 0,09	<LOD	71,38 ± 0,34	26,87 ± 0,25	52,17 ± 0,15	47,83 ± 0,15	<LOD	2,81	67,67 ± 1,03
4739 (FF; BB)	Květen	0,5 ± 0,07	0,18 ± 0,04	81,44 ± 0,16	17,88 ± 0,26	35,83 ± 0,39	64,17 ± 0,39	<LOD	2,81	80,24 ± 0,6
	Červen	1,3 ± 0,22	0,26 ± 0,02	72,78 ± 0,06	25,66 ± 0,25	39,54 ± 0,8	53,16 ± 0,41	7,29 ± 0,39	2,72	63,86 ± 0,57
	Červenec	1,88 ± 0,22	0,44 ± 0,04	73,94 ± 0,96	23,74 ± 0,79	44,53 ± 0,73	41,47 ± 1,09	14,01 ± 1,83	2,68	64,02 ± 0,38
5803 (FF; BB)	Květen	0,69 ± 0,01	<LOD	75,8 ± 0,81	23,52 ± 0,82	49,81 ± 0,76	50,19 ± 0,76	<LOD	2,64	70,73 ± 0,53
	Červen	1,21 ± 0,04	<LOD	69,25 ± 0,56	29,54 ± 0,61	33,75 ± 3,05	66,25 ± 3,05	<LOD	2,23	63,24 ± 0,67
	Červenec	1,64 ± 0,14	<LOD	72,77 ± 1,16	25,58 ± 1,02	48,24 ± 2,53	51,76 ± 2,53	<LOD	2,25	64,08 ± 0,15
5812 (FF; BB)	Červen	0,55 ± 0,06	<LOD	80,59 ± 1,16	18,87 ± 1,22	34,06 ± 0,72	62,93 ± 0,34	3,01 ± 0,37	2,3	71 ± 0,52
	Červenec	0,78 ± 0,02	0,37 ± 0	80,49 ± 0,48	18,36 ± 0,49	33,97 ± 0,03	66,03 ± 0,03	<LOD	2,08	77,83 ± 1,09
5862 (FF; BB)	Červen	0,69 ± 0,09	<LOD	75,83 ± 1,24	23,48 ± 1,15	33,93 ± 4,21	66,07 ± 4,21	<LOD	2,58	70,63 ± 2,45
5872 (FF; BB)	Červen	31,38 ± 1,16	2,05 ± 0,05	49,25 ± 1,57	17,32 ± 0,46	46,66 ± 1,33	53,34 ± 1,33	<LOD	2,29	68,13 ± 0,27
	Červenec	24,66 ± 1,28	<LOD	43,08 ± 0,79	32,25 ± 0,49	22,13 ± 1,16	68,48 ± 0,69	9,38 ± 1,84	2,48	52,34 ± 0,88
5887 (FB; AB)	Květen	3,54 ± 0,49	0,68 ± 0,04	74,22 ± 0,14	21,56 ± 0,31	38,71 ± 0,18	61,29 ± 0,18	<LOD	3,26	73,25 ± 1,48
	Červen	6,52 ± 0,23	0,78 ± 0,06	69,33 ± 0,6	23,36 ± 0,32	23,87 ± 1,34	76,13 ± 1,34	<LOD	2,95	81,36 ± 0,4

Tabulka č. 6: Pokračování

Identifikační číslo zvířete (genotyp α 1-CN; κ -CN)	Měsíc odběru	α 1-CN (% z CN)	α 2-CN (% z CN)	β -CN (% z CN)	κ -CN (% z CN)	α -La (% z WP)	β -LgA (% z WP)	β -LgB (% z WP)	Proteiny (%)	Σ CN (%)
5887 (FB; AB)	Červenec	4,46 ± 0,49	1,27 ± 0,22	76,57 ± 0,81	17,71 ± 1,08	43,9 ± 1,26	56,1 ± 1,26	<LOD	2,97	74,78 ± 0,98
5911 (FB; BB)	Červen	9,12 ± 4,18	<LOD	57,48 ± 3,81	33,4 ± 0,36	32,84 ± 5,86	57,11 ± 3,47	10,05 ± 2,39	2,57	64,35 ± 1,08
	Červenec	22,46 ± 2,8	0,99 ± 0,01	46,67 ± 1,84	29,88 ± 0,97	51,33 ± 1,31	44,18 ± 1,12	4,49 ± 2,43	2,58	54,97 ± 0,44
5932 (FF; AB)	Květen	0,54 ± 0,04	0,45 ± 0,06	79,74 ± 1,26	19,27 ± 1,24	30,26 ± 1,71	69,74 ± 1,71	<LOD	2,78	79,66 ± 0,71
	Červen	2,19 ± 0,12	<LOD	83,84 ± 0,02	13,96 ± 0,15	49,25 ± 0,7	43,68 ± 0,61	7,08 ± 0,09	2,59	61,86 ± 0,77
	Červenec	1,27 ± 0,35	<LOD	74,05 ± 1,17	24,68 ± 0,82	44,68 ± 0,15	55,32 ± 0,15	<LOD	2,12	78,06 ± 0,16
6034 (FB; BB)	Červen	2,5 ± 0,01	0,63 ± 0,01	68,78 ± 0,58	28,09 ± 0,58	55,75 ± 1,17	44,25 ± 1,17	<LOD	2,75	71,17 ± 0,03
	Červenec	7,16 ± 0,01	1,96 ± 0,02	64,42 ± 0,14	26,46 ± 0,15	58,4 ± 0,11	41,6 ± 0,11	<LOD	2,89	64,08 ± 0,62
6046 (FB; BB)	Červen	10,28 ± 3,05	0,59 ± 0,26	65,99 ± 3,22	23,14 ± 0,42	42,45 ± 2,01	57,55 ± 2,01	<LOD	3,01	75,01 ± 2,53
	Červenec	8,61 ± 1,26	0,18 ± 0,25	65,41 ± 1,72	25,8 ± 0,71	50,73 ± 2,82	49,27 ± 2,82	<LOD	3,2	72,01 ± 0,45
6059 (FA; BG)	Červen	<LOD	<LOD	90,7 ± 0,38	9,3 ± 0,38	64,93 ± 1,88	35,07 ± 1,88	<LOD	2,77	56,27 ± 0,16
6938 (FB; BC)	Červen	29,51 ± 0,45	<LOD	53,18 ± 2,25	17,31 ± 2,71	51,75 ± 3,03	48,25 ± 3,03	<LOD	2,17	68 ± 0,82
6954 (FB; AB)	Červen	1,97 ± 0,12	<LOD	80,58 ± 2,82	17,45 ± 2,95	57,49 ± 0,66	42,51 ± 0,66	<LOD	2,47	63,36 ± 1,87
	Červenec	3,88 ± 0,58	1,12 ± 0	70,45 ± 0,36	24,55 ± 0,22	59,19 ± 1,58	40,81 ± 1,58	<LOD	2,55	71,9 ± 0,84
7125 (FB; BB)	Květen	1,31 ± 0,22	<LOD	77,05 ± 0,5	21,65 ± 0,28	52,93 ± 1,07	47,07 ± 1,07	<LOD	2,85	71,53 ± 1,09
	Červen	3,11 ± 0,3	<LOD	66,36 ± 1,16	30,52 ± 0,86	29,51 ± 0,29	62,42 ± 1,46	8,07 ± 1,17	2,4	62,12 ± 0,13
	Červenec	3,02 ± 0,7	<LOD	70,59 ± 0,69	26,39 ± 0,01	61,02 ± 0,57	38,98 ± 0,57	<LOD	2,51	65,24 ± 1,48
7127 (FF; BB)	Květen	0,63 ± 0,03	<LOD	77,57 ± 0,14	21,8 ± 0,11	45,58 ± 0,91	54,42 ± 0,91	<LOD	2,73	76,52 ± 0,25
	Červen	0,66 ± 0,02	<LOD	74,15 ± 1,72	25,19 ± 1,71	50,58 ± 0,02	43,32 ± 0,13	6,11 ± 0,11	2,66	67,04 ± 1,17
7208 (N; N)	Červen	1,05 ± 0,11	<LOD	74,1 ± 0,39	24,85 ± 0,28	43,05 ± 0,87	50,33 ± 0,45	6,62 ± 0,43	2,7	70,77 ± 0,34
7227 (FA; BB)	Červenec	1,16 ± 0,12	1 ± 0,02	74,63 ± 0,36	23,2 ± 0,26	50,47 ± 3,43	49,53 ± 3,43	<LOD	2,64	81,8 ± 2,26
7231 (FA; BB)	Květen	1,64 ± 0,31	0,63 ± 0,01	76,86 ± 0,4	20,87 ± 0,1	53,79 ± 4,44	46,21 ± 4,44	<LOD	2,52	74,5 ± 1,83
	Červen	3,25 ± 0,03	0,29 ± 0,04	74,74 ± 0,29	21,71 ± 0,31	53,35 ± 0,45	46,65 ± 0,45	<LOD	2,81	67,28 ± 0,35

Tabulka č. 6: Pokračování

Identifikační číslo zvířete (genotyp α s1-CN; κ -CN)	Měsíc odběru	α s1-CN (% z CN)	α s2-CN (% z CN)	β -CN (% z CN)	κ -CN (% z CN)	α -La (% z WP)	β -LgA (% z WP)	β -LgB (% z WP)	Proteiny (%)	Σ CN (%)
7773 (FB; AB)	Červen	26,4 ± 7,93	<LOD	45,09 ± 2,58	28,51 ± 5,35	54,46 ± 1,49	45,54 ± 1,49	<LOD	2,71	66,05 ± 1,05
7889 (FF; AA)	Červen	1,04 ± 0,14	0,4 ± 0,01	78,15 ± 1,61	20,4 ± 1,74	31,48 ± 2,94	68,52 ± 2,94	<LOD	2,02	61,3 ± 1,06
	Červenec	3,19 ± 0,42	0,3 ± 0,01	79,18 ± 0,93	17,33 ± 0,5	49,72 ± 5,34	50,28 ± 5,34	<LOD	2,1	74,51 ± 5,85
7896 (FB; BB)	Květen	0,8 ± 0,08	<LOD	79,13 ± 1,01	20,07 ± 1,1	28,36 ± 2,61	71,64 ± 2,61	<LOD	2,68	77,7 ± 0,12
	Červen	1,03 ± 0,21	0,76 ± 0,08	81,75 ± 0,67	16,46 ± 0,54	43,09 ± 0,01	56,91 ± 0,01	<LOD	2,53	71,97 ± 0,08
	Červenec	1,27 ± 0,05	<LOD	83,32 ± 0,79	15,42 ± 0,74	66,01 ± 0,05	33,99 ± 0,05	<LOD	2,51	59,19 ± 0,24
7919 (FF; BB)	Červen	0,46 ± 0,06	<LOD	73,43 ± 1,45	26,1 ± 1,51	39,41 ± 1,08	56,37 ± 1,23	4,23 ± 0,15	2,46	66,82 ± 0,13
	Červenec	12,62 ± 2,57	0,22 ± 0,31	57,1 ± 3,41	30,06 ± 1,15	47,74 ± 0,62	52,26 ± 0,62	<LOD	2,6	63,12 ± 0,54
7923 (FF; BB)	Květen	0,83 ± 0,05	0,42 ± 0,03	76,54 ± 0,04	22,21 ± 0,05	30,57 ± 0,6	56,32 ± 0,91	13,11 ± 0,32	3,25	74,79 ± 1,61
	Červen	2,54 ± 0,55	0,33 ± 0,03	67,21 ± 1,71	29,91 ± 1,13	32,64 ± 0,16	67,36 ± 0,16	<LOD	2,62	73,57 ± 0,69
	Červenec	1,25 ± 0	0,59 ± 0,02	72,8 ± 1,41	25,36 ± 1,43	40,76 ± 0,72	59,24 ± 0,72	<LOD	2,72	70,95 ± 0,39
8731 (FB; AB)	Červen	3,05 ± 0,78	<LOD	73,45 ± 1,31	23,5 ± 0,53	31,02 ± 3,22	68,98 ± 3,22	<LOD	2,45	64,16 ± 1,19
	Červenec	6,06 ± 0,68	1,68 ± 0,05	71,55 ± 2,4	20,72 ± 1,67	64,72 ± 0,84	35,28 ± 0,84	<LOD	2,21	65,29 ± 0,01
8743 (FA; BB)	Červen	3,46 ± 0,3	0,66 ± 0,1	73,63 ± 0,34	22,25 ± 0,75	26,62 ± 3,23	73,38 ± 3,23	<LOD	2,31	80,47 ± 1,29
	Červenec	2,27 ± 0,08	2,19 ± 0,49	72,14 ± 1,37	23,4 ± 0,97	34,36 ± 0,71	65,64 ± 0,71	<LOD	2,35	72,76 ± 0,49
8745 (FA; BB)	Červen	13,04 ± 2,27	<LOD	54,72 ± 4,72	32,24 ± 2,46	25,65 ± 2,53	62,34 ± 2,9	12,02 ± 0,37	2,58	57,52 ± 0,87
	Červenec	27,86 ± 2,07	2,83 ± 0,63	48,5 ± 1,1	20,81 ± 1,6	56,45 ± 0,96	43,55 ± 0,96	<LOD	2,96	61,84 ± 0,03
8747 (FB; BB)	Červen	2,43 ± 0,09	<LOD	70,96 ± 0,06	26,61 ± 0,15	27,01 ± 2,04	65,32 ± 2,36	7,67 ± 0,32	2,6	67,59 ± 1,39
	Červenec	1,21 ± 0	1,83 ± 0,46	74,23 ± 1,87	22,73 ± 2,33	39,22 ± 1,12	60,78 ± 1,12	<LOD	2,46	79,4 ± 0,29
8749 (FB; BB)	Červen	6,77 ± 0,8	0,88 ± 0	72,43 ± 0,73	19,93 ± 0,08	40,61 ± 0,39	43,02 ± 0,85	16,36 ± 1,24	2,77	55,49 ± 0,48
8754 (FB; BB)	Červen	6,6 ± 1,95	<LOD	74,9 ± 2,19	18,5 ± 0,24	45,2 ± 0,66	54,8 ± 0,66	<LOD	2,66	77,37 ± 2,11
	Červenec	10,47 ± 0,65	0,59 ± 0,03	73,2 ± 0,23	15,75 ± 0,39	40,02 ± 0,16	59,98 ± 0,16	<LOD	2,69	79,8 ± 0,44
8766 (FF; BB)	Červen	0,47 ± 0,13	0,23 ± 0,04	75,25 ± 1,58	24,05 ± 1,75	27,78 ± 1,21	72,22 ± 1,21	<LOD	2,25	70,6 ± 0,29

Tabulka č. 6: Pokračování

Identifikační číslo zvířete (genotyp α 1-CN; κ -CN)	Měsíc odběru	α 1-CN (% z CN)	α 2-CN (% z CN)	β -CN (% z CN)	κ -CN (% z CN)	α -La (% z WP)	β -LgA (% z WP)	β -LgB (% z WP)	Proteiny (%)	Σ CN (%)
8766 (FF; BB)	Červenec	40,06 ± 0,68	1,26 ± 0	37,9 ± 0,71	20,78 ± 1,39	63,85 ± 0,46	36,15 ± 0,46	<LOD	2,41	73,76 ± 1,07
8770 (FF; CC)	Červen	1,72 ± 0,07	<LOD	71,39 ± 0,15	26,89 ± 0,09	50,78 ± 0,73	49,22 ± 0,73	<LOD	2,65	63,94 ± 0,69
	Červenec	5,9 ± 0,73	<LOD	62,51 ± 4,17	31,59 ± 3,44	49,35 ± 1,33	50,65 ± 1,33	<LOD	2,19	61,36 ± 0,59
8778 (FB; BB)	Červen	8,8 ± 0,75	0,4 ± 0,01	70,48 ± 0,49	20,32 ± 0,27	45,73 ± 0,44	54,27 ± 0,44	<LOD	2,9	69,3 ± 1,51
	Červenec	6,56 ± 0,3	0,54 ± 0	77,58 ± 0,27	15,32 ± 0,57	54,95 ± 2,97	45,05 ± 2,97	<LOD	2,98	71,62 ± 1,93
8779 (FB; BB)	Červen	1,04 ± 0,02	0,41 ± 0,16	74,71 ± 1,05	23,84 ± 1,19	34,68 ± 1,29	65,32 ± 1,29	<LOD	2,32	72,05 ± 0,44
	Červenec	1,47 ± 0,13	<LOD	79,95 ± 0,79	18,58 ± 0,92	38,37 ± 0,02	61,63 ± 0,02	<LOD	2,33	79,45 ± 0,11
8780 (FB; BB)	Květen	0,85 ± 0,01	0,66 ± 0,03	72,95 ± 1,74	25,55 ± 1,71	42,26 ± 0,57	57,74 ± 0,57	<LOD	2,49	74,64 ± 0,93
	Červen	1,28 ± 0,34	0,5 ± 0,06	69,24 ± 0,33	28,98 ± 0,73	33,55 ± 2,12	66,45 ± 2,12	<LOD	2,48	69,12 ± 0,35
	Červenec	0,98 ± 0,19	0,75 ± 0,03	77,78 ± 1,13	20,48 ± 0,92	50,23 ± 2,59	49,77 ± 2,59	<LOD	2,46	79,76 ± 0,2
8796 (FB; BC)	Červen	25,87 ± 8,05	<LOD	42,85 ± 4,72	31,28 ± 3,33	37,97 ± 3,37	62,03 ± 3,37	<LOD	2,49	56,55 ± 3,61
8798 (FB; AB)	Červen	<LOD	<LOD	82,28 ± 0,53	17,72 ± 0,53	43,74 ± 0,96	56,26 ± 0,96	<LOD	2,42	71,08 ± 0,15
	Červenec	17,05 ± 1,49	<LOD	63,24 ± 0,4	19,71 ± 1,1	62,9 ± 0,76	37,1 ± 0,76	<LOD	2,49	55,31 ± 0,67
8804 (FA; BB)	Červen	1,19 ± 0,23	0,31 ± 0	81,13 ± 0,18	17,37 ± 0,4	38,45 ± 2,83	61,55 ± 2,83	<LOD	2,63	73,63 ± 1,27
	Červenec	6,3 ± 0,17	1,13 ± 0,08	73,6 ± 0,15	18,97 ± 0,1	47,24 ± 0,58	52,76 ± 0,58	<LOD	2,49	66,6 ± 0,17
8809 (FF; BC)	Červen	1,05 ± 0,09	<LOD	72,18 ± 0,22	26,77 ± 0,13	23,3 ± 0,92	76,7 ± 0,92	<LOD	2,88	65 ± 1,39
	Červenec	2,36 ± 0,12	<LOD	76,47 ± 2,07	21,17 ± 2,19	53,89 ± 0,53	46,11 ± 0,53	<LOD	2,38	60,38 ± 0,73
8810 (N; BB)	Červen	0,94 ± 0,08	<LOD	74,07 ± 0,27	24,99 ± 0,36	22,42 ± 0,48	77,58 ± 0,48	<LOD	2,52	73,62 ± 0,08
	Červenec	2,56 ± 0,74	<LOD	72,91 ± 1,26	24,53 ± 0,51	41,97 ± 0,36	58,03 ± 0,36	<LOD	2,47	65,48 ± 1,66
8817 (FB; BB)	Květen	3,11 ± 0,11	0,73 ± 0,18	77,54 ± 0,75	18,62 ± 0,82	27,52 ± 2,93	72,48 ± 2,93	<LOD	2,59	80,09 ± 1,29
	Červen	17,18 ± 1,79	1,16 ± 0,36	59,2 ± 4,34	22,46 ± 2,91	29,5 ± 1,42	44,12 ± 4,77	26,38 ± 3,35	2,77	56,94 ± 0,93
	Červenec	5,05 ± 0,3	1,15 ± 0,02	73,72 ± 0,88	20,07 ± 0,56	50,07 ± 0,72	49,93 ± 0,72	<LOD	2,82	80,63 ± 0,93
8833 (FB; AB)	Květen	22,39 ± 2,12	<LOD	65,5 ± 3,12	12,11 ± 1	54,51 ± 3,94	45,49 ± 3,94	<LOD	2,86	63,95 ± 0,02

Tabulka č. 6: Pokračování

Identifikační číslo zvířete (genotyp α 1-CN; κ -CN)	Měsíc odběru	α 1-CN (% z CN)	α 2-CN (% z CN)	β -CN (% z CN)	κ -CN (% z CN)	α -La (% z WP)	β -LgA (% z WP)	β -LgB (% z WP)	Proteiny (%)	Σ CN (%)
8833 (FB; AB)	Červen	1,41 ± 0,95	0,44 ± 0,09	85,35 ± 1,72	12,8 ± 0,68	22,19 ± 1,33	77,81 ± 1,33	<LOD	2,37	68,44 ± 2,29
	Červenec	2,09 ± 0,41	1,04 ± 0,1	72,25 ± 0,33	24,62 ± 0,64	51,46 ± 5,24	48,54 ± 5,24	<LOD	2,87	80,86 ± 3,42
8834 (FB; BB)	Květen	1,6 ± 0,12	<LOD	78,12 ± 0,09	20,28 ± 0,21	47,62 ± 2,24	52,38 ± 2,24	<LOD	2,96	74,27 ± 1,47
	Červen	7,03 ± 0,01	<LOD	76,01 ± 0,97	16,96 ± 0,99	48,23 ± 5,35	36,16 ± 3,49	15,61 ± 1,85	2,67	54,7 ± 1,26
	Červenec	3,2 ± 0,05	<LOD	74,94 ± 1,14	21,86 ± 1,08	61,34 ± 0,04	38,66 ± 0,04	<LOD	2,71	72,16 ± 0,04
8845 (FF; BC)	Květen	0,65 ± 0,1	0,4 ± 0,03	76,78 ± 0,38	22,17 ± 0,25	22,55 ± 0,78	77,45 ± 0,78	<LOD	2,69	82,1 ± 0,27
	Červen	<LOD	<LOD	74,01 ± 0,52	25,99 ± 0,52	37,46 ± 1,03	62,54 ± 1,03	<LOD	2,45	73,76 ± 1,1
	Červenec	0,96 ± 0,12	1,22 ± 0,11	73,67 ± 0,7	24,14 ± 0,48	43,48 ± 2,11	56,52 ± 2,11	<LOD	2,59	74,67 ± 0,32
8856 (FB; BB)	Červen	2,26 ± 0,27	0,42 ± 0,15	71,37 ± 0,35	25,95 ± 0,06	23,08 ± 0,49	76,92 ± 0,49	<LOD	2,57	74,11 ± 2,41
	Červenec	1,66 ± 0,27	0,37 ± 0,01	76,69 ± 0,54	21,28 ± 0,81	36,34 ± 2,13	63,66 ± 2,13	<LOD	2,65	82,29 ± 0,99
8863 (FB; BB)	Květen	0,72 ± 0,05	<LOD	83,9 ± 0,08	15,38 ± 0,02	43,97 ± 0,14	56,03 ± 0,14	<LOD	2,51	75,24 ± 0,6
	Červen	1,82 ± 0,19	<LOD	83,64 ± 0,4	14,54 ± 0,21	50,27 ± 0,89	42,44 ± 0,43	7,29 ± 0,46	2,67	59,26 ± 1,04
	Červenec	1,92 ± 0,22	0,71 ± 0,03	79,22 ± 0,28	18,16 ± 0,09	43,58 ± 0,32	45,23 ± 1,04	11,19 ± 1,37	2,7	67,53 ± 1,09
8865 (FB; BB)	Květen	3,05 ± 0,49	<LOD	74,95 ± 0,01	22 ± 0,48	46,85 ± 0,12	53,15 ± 0,12	<LOD	3,26	64,22 ± 0,26
	Červen	6,8 ± 0,28	<LOD	67,11 ± 1,93	26,08 ± 1,65	23,77 ± 0,77	76,23 ± 0,77	<LOD	2,81	68,74 ± 1,2
	Červenec	16,46 ± 5,5	0,51 ± 0,06	59,77 ± 1,68	23,26 ± 3,88	44,88 ± 1,32	55,12 ± 1,32	<LOD	2,93	79,14 ± 4,98
8902 (FB; BB)	Červen	8,52 ± 0,63	0,51 ± 0,12	71,38 ± 1,13	19,58 ± 0,37	24,27 ± 1,31	75,73 ± 1,31	<LOD	2,8	79,29 ± 0,53
	Červenec	3,86 ± 2,32	0,4 ± 0,08	72,78 ± 9,83	22,96 ± 7,43	44,87 ± 0,51	55,13 ± 0,51	<LOD	2,78	75,38 ± 4,89
8923 (FB; AB)	Květen	0,99 ± 0,59	<LOD	82,81 ± 0,76	16,2 ± 1,35	42,11 ± 0,49	46,93 ± 0,02	10,96 ± 0,48	2,72	66,78 ± 3,82
	Červen	1,28 ± 0,19	<LOD	81,56 ± 0,1	17,16 ± 0,09	47,48 ± 1,55	52,52 ± 1,55	<LOD	2,5	69,5 ± 0,31
	Červenec	3,86 ± 0,57	<LOD	80,33 ± 2,29	15,81 ± 1,72	65,77 ± 0,52	34,23 ± 0,52	<LOD	2,67	67,26 ± 0,74
8927 (FB; BB)	Květen	5,46 ± 2,32	<LOD	76,06 ± 1,51	18,48 ± 0,81	63,35 ± 1,96	36,65 ± 1,96	<LOD	2,58	65,19 ± 1,16
	Červen	2,74 ± 0,48	<LOD	79,96 ± 0,5	17,3 ± 0,98	37,92 ± 0,57	62,08 ± 0,57	<LOD	2,84	68,69 ± 0,93

Tabulka č. 6: Pokračování

Identifikační číslo zvířete (genotyp α 1-CN; κ -CN)	Měsíc odběru	α 1-CN (% z CN)	α 2-CN (% z CN)	β -CN (% z CN)	κ -CN (% z CN)	α -La (% z WP)	β -LgA (% z WP)	β -LgB (% z WP)	Proteiny (%)	Σ CN (%)
8927 (FB; BB)	Červenec	2,09 ± 0,51	0,59 ± 0,05	79,47 ± 0,09	17,85 ± 0,37	58,38 ± 0,49	41,62 ± 0,49	<LOD	2,59	61,27 ± 1,74
8960 (FA; BB)	Červen	3,06 ± 0,73	0,3 ± 0	75,33 ± 0,98	21,32 ± 0,25	35,54 ± 0,95	64,46 ± 0,95	<LOD	2,42	64,21 ± 0,04
	Červenec	7,91 ± 1,8	<LOD	72,5 ± 4,16	19,59 ± 2,36	38 ± 0,6	44,46 ± 0,07	17,54 ± 0,53	2,36	56,04 ± 1,29
8969 (FB; BB)	Květen	2,03 ± 0,26	<LOD	79,32 ± 2,4	18,65 ± 2,15	36,29 ± 2,41	63,71 ± 2,41	<LOD	2,88	67,38 ± 3,54
	Červen	1,71 ± 0,41	0,42 ± 0,03	75,19 ± 0,09	22,67 ± 0,47	27,53 ± 0,22	72,47 ± 0,22	<LOD	2,44	67,96 ± 0,94
	Červenec	2,57 ± 0,12	0,13 ± 0,07	75,95 ± 0,26	21,36 ± 0,32	46,11 ± 1,12	53,89 ± 1,12	<LOD	2,37	77,5 ± 0,05
9019 (FB; BB)	Květen	0,36 ± 0,01	<LOD	81,37 ± 0,13	18,27 ± 0,15	33,61 ± 2,4	66,39 ± 2,4	<LOD	2,46	82,76 ± 0,16
	Červen	1,17 ± 0,36	0,69 ± 0,01	83,56 ± 0,77	14,59 ± 0,4	39,51 ± 1,66	60,49 ± 1,66	<LOD	2,76	78,79 ± 1,78
	Červenec	13,22 ± 0,25	<LOD	72,32 ± 2,72	14,45 ± 2,47	52,05 ± 0,36	47,95 ± 0,36	<LOD	2,64	69,42 ± 2,16
9057 (FB; AB)	Červen	24,68 ± 0,52	1,27 ± 0,03	47,94 ± 0,61	26,12 ± 0,12	47,01 ± 0,15	52,99 ± 0,15	<LOD	2,76	60,24 ± 0,45
	Červenec	21,79 ± 0,58	1,01 ± 0,4	54,88 ± 0,64	22,33 ± 0,82	65,52 ± 1,19	34,48 ± 1,19	<LOD	2,74	62,02 ± 1,12
9139 (FB; BB)	Květen	0,72 ± 0,06	<LOD	80,23 ± 0,01	19,05 ± 0,04	38,11 ± 0,73	45,17 ± 1,33	16,72 ± 2,06	3,22	63,12 ± 1,04
	Červen	1,23 ± 0,04	0,38 ± 0,09	75,28 ± 0,13	23,11 ± 0,09	35,12 ± 0,6	64,88 ± 0,6	<LOD	2,65	65,18 ± 1,32
9150 (FB; BB)	Květen	0,87 ± 0,06	<LOD	82,33 ± 0,51	16,8 ± 0,45	34,51 ± 0,6	65,49 ± 0,6	<LOD	2,82	80,25 ± 0,19
	Červen	18,54 ± 1,72	<LOD	52,55 ± 1,43	28,91 ± 0,29	23,5 ± 2,73	65,36 ± 2,73	11,14 ± 0,01	2,75	56,1 ± 2,04
	Červenec	36,59 ± 2,88	0,47 ± 0,01	47,94 ± 2,49	15 ± 0,4	60,65 ± 0,91	39,35 ± 0,91	<LOD	2,61	76,41 ± 0,9
9158 (FB; BB)	Červen	11,36 ± 1,13	0,88 ± 0,18	70,93 ± 1,57	16,83 ± 0,63	27,18 ± 0,58	72,82 ± 0,58	<LOD	2,91	78,26 ± 0,59
9204 (FA; BB)	Červen	8,77 ± 2,91	<LOD	69,94 ± 2,43	21,29 ± 0,48	27,09 ± 2,49	72,91 ± 2,49	<LOD	2,75	71,05 ± 2,82
	Červenec	5,15 ± 2,15	0,57 ± 0,02	72,57 ± 0,06	21,71 ± 2,23	53,36 ± 0,54	46,64 ± 0,54	<LOD	2,62	77,94 ± 0,4
9731 (N; BB)	Květen	3,13 ± 0,4	<LOD	71,32 ± 0,48	25,55 ± 0,08	26,79 ± 1,15	73,21 ± 1,15	<LOD	2,64	79,18 ± 0,08
	Červen	4,67 ± 0,6	<LOD	74,6 ± 0,51	20,72 ± 0,09	41,35 ± 1,42	54,69 ± 1,97	3,96 ± 0,55	2,79	77,8 ± 0,77
	Červenec	7,91 ± 0,97	0,42 ± 0,06	69,88 ± 1,69	21,78 ± 0,78	38,57 ± 1,18	61,43 ± 1,18	<LOD	2,54	76,38 ± 1,58
9737 (FB; BB)	Červen	1,17 ± 0,03	0,62 ± 0,08	75,87 ± 0,9	22,35 ± 0,84	45,06 ± 1,19	48,57 ± 0,88	6,37 ± 0,3	2,77	68,04 ± 0,07

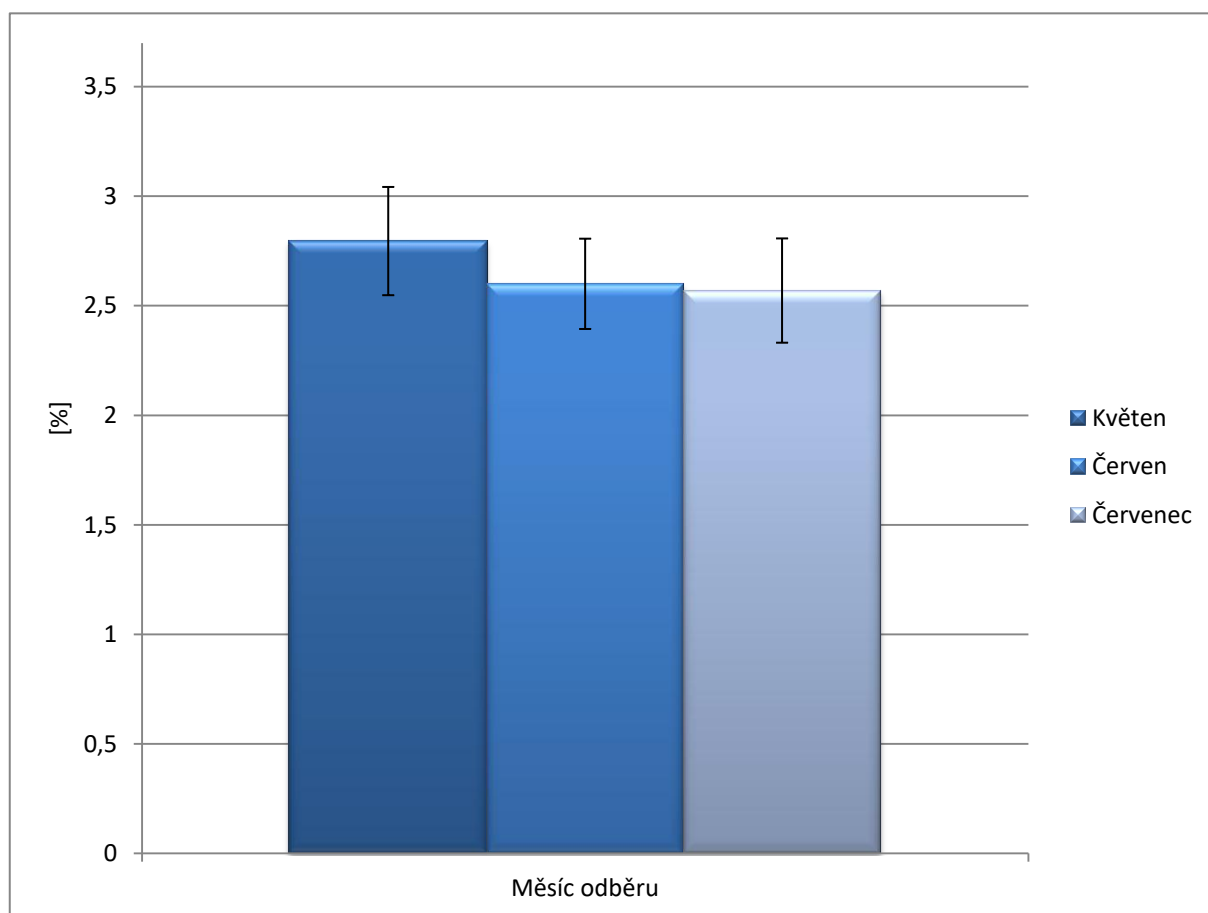
Tabulka č. 6: Pokračování

Identifikační číslo zvířete (genotyp α1-CN; κ-CN)	Měsíc odběru	α1-CN (% z CN)	α2-CN (% z CN)	β-CN (% z CN)	κ-CN (% z CN)	α-La (% z WP)	β-LgA (% z WP)	β-LgB (% z WP)	Proteiny (%)	Σ CN (%)
9737 (FB; BB)	Červenec	2,92 ± 0,59	0,75 ± 0,13	71,24 ± 1,83	25,09 ± 1,37	47,79 ± 0,34	52,21 ± 0,34	<LOD	2,63	68,03 ± 1,84
9762 (FB; BB)	Červen	8,62 ± 4,61	0,77 ± 0,13	74,32 ± 5,95	16,29 ± 1,21	37,2 ± 0,12	49,85 ± 3,91	12,95 ± 4,03	2,79	57,93 ± 5,11

5.1. Vliv fáze laktace na obsah bílkovin v mléce

V Grafech č. 1, č. 2 a č. 3 jsou znázorněny změny v celkovém obsahu bílkovin v mléce a v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v mléčných bílkovinách v závislosti na fázi laktace. Jelikož byly vzorky odebírány v měsících květen, červen a červenec, je v grafech znázorněn vývoj zastoupení bílkovin a jednotlivých bílkovinných frakcí pouze ve třech měsících z celého laktačního období. Statistické vyhodnocení vlivu fáze laktace na obsah bílkovin na zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v mléce je uvedeno v Tabulkách č. 7, č. 8 a č. 9.

Graf č. 1: Celkový obsah bílkovin v mléce v jednotlivých měsících odběru vzorku.

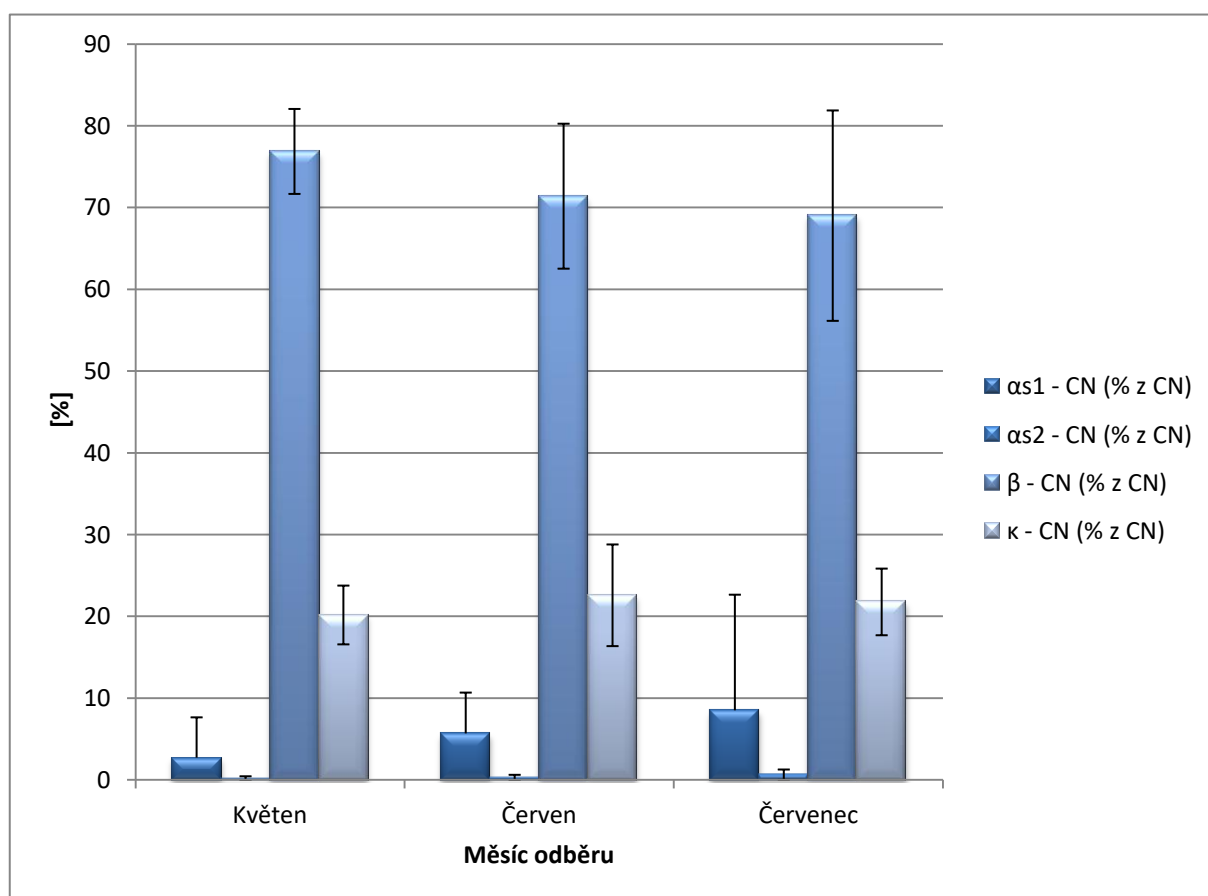


Tabulka č. 7: Statistické vyhodnocení vlivu fáze laktace na celkový obsah bílkovin v mléce ($\alpha = 0,05$).

Měsíc odběru	p-hodnota
Květen x Červen	$p = 0,000340$
Květen x Červenec	$p = 0,000309$
Červen x Červenec	$p = 0,461658$

Z Grafu č. 1 je patrné, že v daných měsících obsah bílkovin postupně klesá. Statisticky významný rozdíl v obsahu bílkovin byl ale zjištěn pouze ve vzorcích mléka odebraných v květnu a vzorky mléka odebranými v ostatních měsících. Rozdíl mezi červnem a červencem není statisticky významný na zvolené hladině pravděpodobnosti.

Graf č. 2: Průměrné zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkových CN v mléce v jednotlivých měsících odběru vzorku.

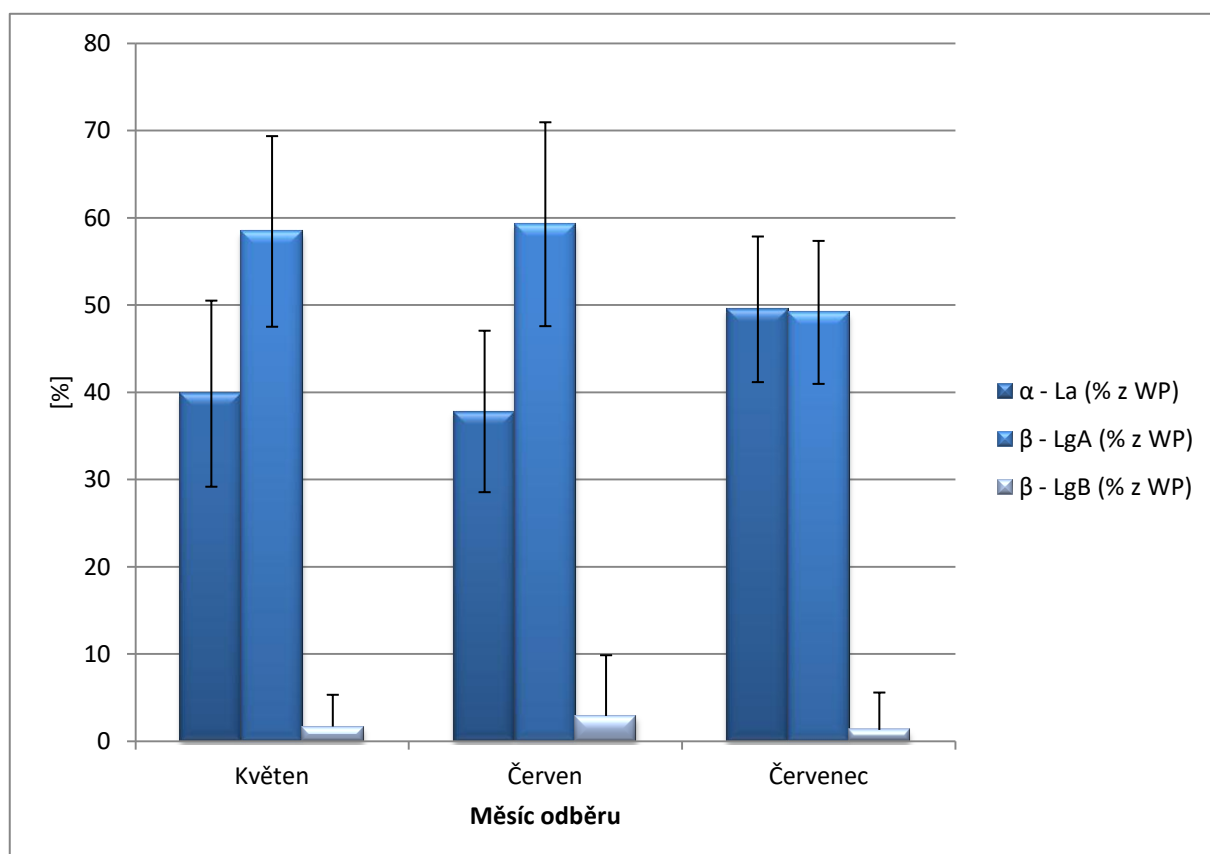


Tabulka č. 8: Statistické vyhodnocení vlivu fáze laktace na zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí v mléce ($\alpha = 0,05$).

	α 1-CN	α 2-CN	β -CN	κ -CN
Měsíc odběru	p-hodnota			
Květen x Červen	p = 0,013169	p = 0,410405	p = 0,002976	p = 0,052688
Květen x Červenec	p = 0,000042	p = 0,003387	p = 0,000209	p = 0,115036
Červen x Červenec	p = 0,046848	p = 0,004025	p = 0,479695	p = 0,414504

Z Grafu č. 2 a Tabulky č. 8 je zřejmé, že v jednotlivých měsících je nejvíce proměnlivé zastoupení α 1-CN. Jeho obsah je největší v červenci. Naopak obsah β -CN postupně klesá a v červenci je nejmenší. V zastoupení β -CN je statisticky významný rozdíl mezi květnem a ostatními měsíci. Zastoupení α 2-CN se statisticky významně liší mezi červencem a ostatními měsíci. Nejstabilnější kaseinovou frakcí je κ -CN, jehož zastoupení se statisticky významně neliší v žádném z měsíců.

Graf č. 3: Průměrné zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkových WP v jednotlivých měsících odběru vzorku.



Tabulka č. 9: Statistické vyhodnocení vlivu fáze laktace na zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin v mléce ($\alpha = 0,05$).

	α -La	β -LgA	β -LgB
Měsíc odběru	p-hodnota		
Květen x Červen	p = 0,404953	p = 0,761679	p = 0,305191
Květen x Červenec	p = 0,000499	p = 0,000969	p = 0,936631
Červen x Červenec	p = 0,000000	p = 0,000008	p = 0,037021

Z Grafu č. 3 a Tabulky č. 9 vyplývá, že i zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin se s postupující fází laktace mění. Nejméně zastoupenou frakcí je β -LgB. Jeho obsah se statisticky významně liší mezi červnem a červencem. V květnu a červnu převažuje v mléce obsah β -LgA nad α -La. V červenci je poměr vyrovnanější a obsah β -LgA je mírně převýšen obsahem α -La. Statisticky významný rozdíl v obsahu α -La a β -LgA byl pozorován mezi červencem a ostatními měsíci.

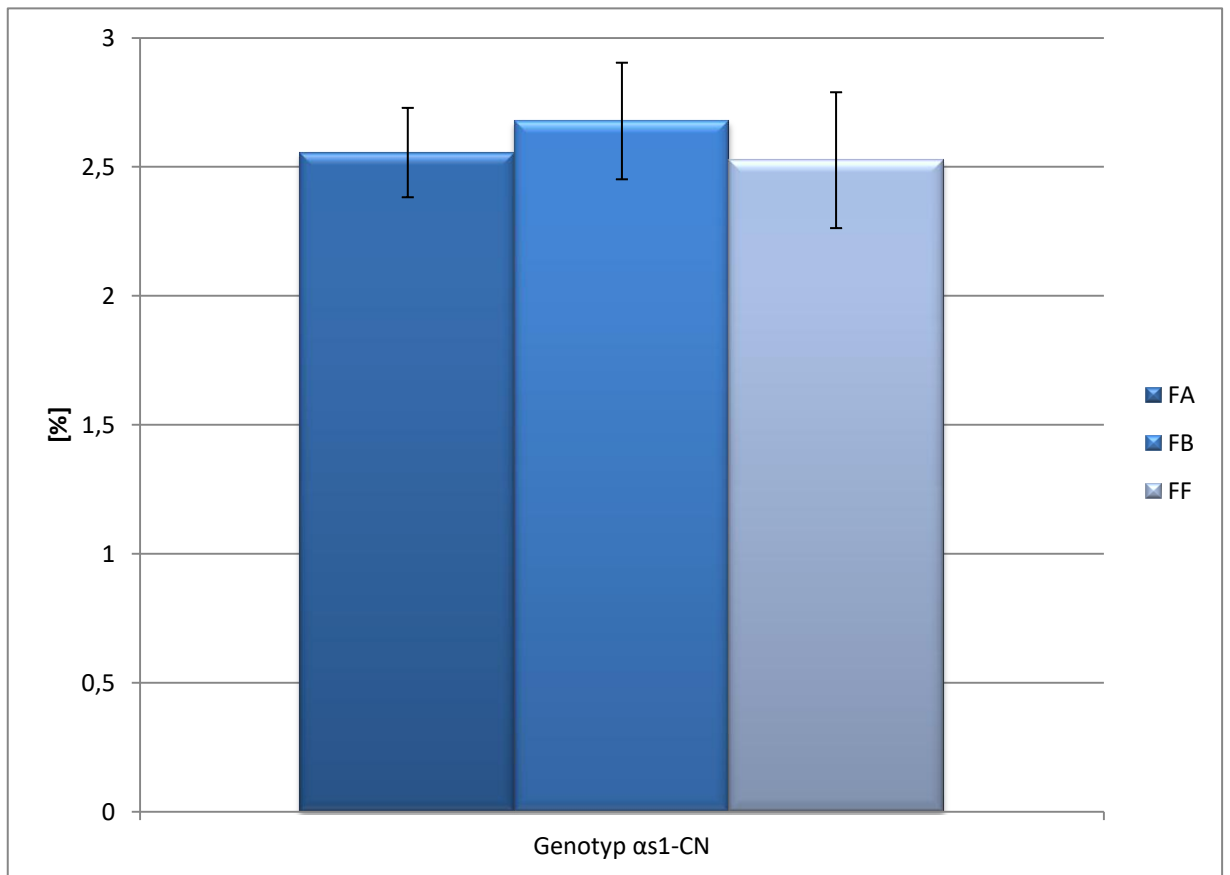
5.2. Vliv genotypů α s1-CN a κ -CN na obsah bílkovin v mléce

Vzorky byly odebrány od jednotlivých zvířat na základě jejich genotypu. Pro účely této diplomové práce byly zjištěny genotypy pro kaseinové frakce α s1-CN a κ -CN. Kombinace alel a počet zvířat, u nichž se tyto kombinace vyskytují, jsou uvedeny v Tabulkách č. 2 a č. 3.

Vliv genotypů α s1-CN a κ -CN na celkový obsah bílkovin v mléce je znázorněn v Grafech č. 4 a č. 5. Dále byl sledován vliv genotypů α s1-CN a κ -CN na zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v mléce. V Grafech č. 6 a č. 8 je uvedeno průměrné procentuální zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkových CN. Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkových WP je uvedeno v Grafech č. 7 a č. 9.

Statistické vyhodnocení vlivu genotypů α s1-CN a κ -CN na obsah bílkovin v mléce je uvedeno v Tabulkách č. 10 a č. 11, statistické vyhodnocení vlivu genotypů na zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí v Tabulkách č. 12 a č. 14 a statistické vyhodnocení vlivu genotypů na zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin v Tabulkách č. 13 a č. 15. Genotyp pro κ -CN BG nebyl zahrnut do statistického hodnocení, protože od zvířete s tímto genotypem byl odebrán jediný vzorek mléka.

Graf č. 4: Závislost mezi celkovým obsahem bílkovin v mléce a genotypem $\alpha 1$ -CN.

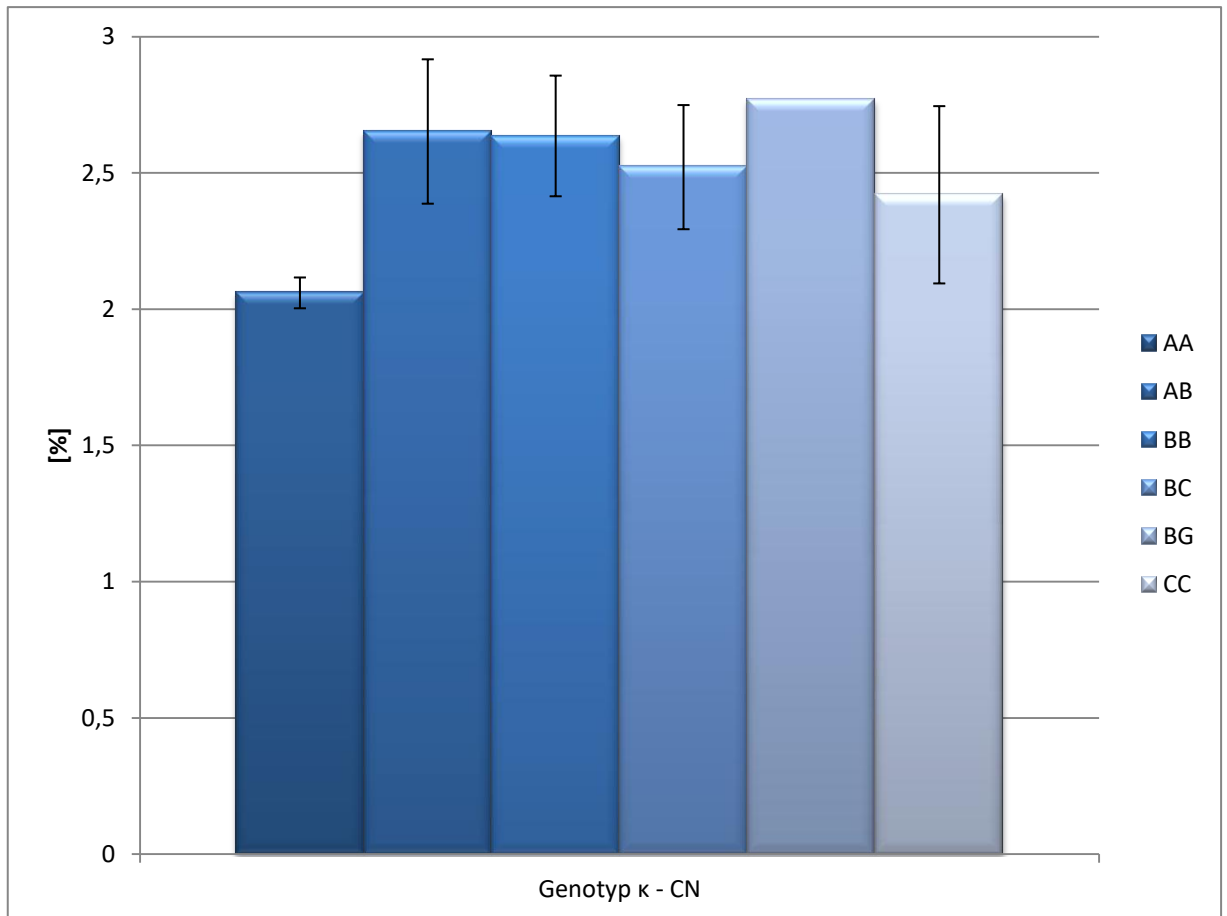


Tabulka č. 10: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu $\alpha 1$ -CN na celkový obsah bílkovin v mléce ($\alpha = 0,05$).

Genotyp $\alpha 1$ -CN	p-hodnota
FA x FB	p = 0,075720
FA x FF	p = 0,718264
FB x FF	p = 0,001519

Z Grafu č. 10 vyplývá, že nejvyšší obsah bílkovin v mléce zajišťuje kombinace alel F a B pro $\alpha 1$ -CN, zatímco nejnižší je pro genotyp FF. Statisticky významně se liší právě obsah bílkovin v mléce koz s genotypem FB a FF.

Graf č. 5: Závislost mezi celkovým obsahem bílkovin v mléce a genotypem κ -CN.



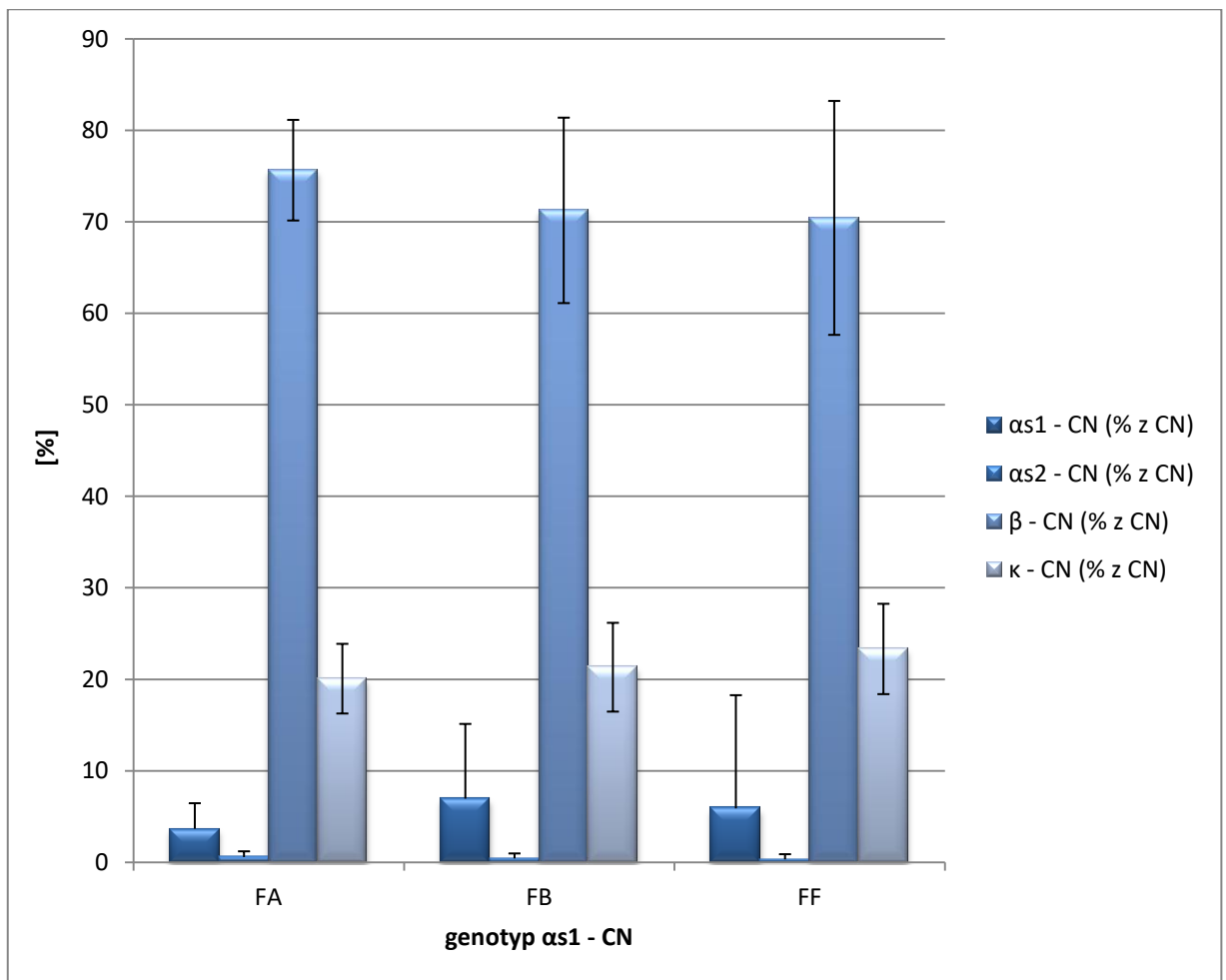
Pozn.: Pro genotyp BG byl analyzován pouze jeden vzorek mléka.

Tabulka č. 11: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu κ -CN na celkový obsah bílkovin v mléce ($\alpha = 0,05$).

Genotyp κ -CN	p-hodnota
AA x AB	$p = 0,005080$
AA x BB	$p = 0,000401$
AA x BC	$p = 0,029974$
AA x CC	$p = 0,263000$
AB x BB	$p = 0,759233$
AB x BC	$p = 0,249211$
AB x CC	$p = 0,251634$
BB x BC	$p = 0,189305$
BB x CC	$p = 0,177434$
BC x CC	$p = 0,620257$

Nejvyšší obsah bílkovin v mléce byl zjištěn v mléce kozy s genotypem BG a nejnižší obsah v mléce kozy s genotypem AA. Toto zjištění nemusí být zcela odpovídající, jelikož se v dané skupině zvířat, od kterých byly odebrány vzorky, vyskytuje pouze 1 koza s každým z těchto dvou genotypů pro κ -CN. Mezi genotypy κ -CN, které byly zastoupeny větším počtem zvířat, není v obsahu bílkovin v mléce statisticky významný rozdíl.

Graf č. 6: Procentuální zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkových CN v závislosti na genotypu α 1-CN.

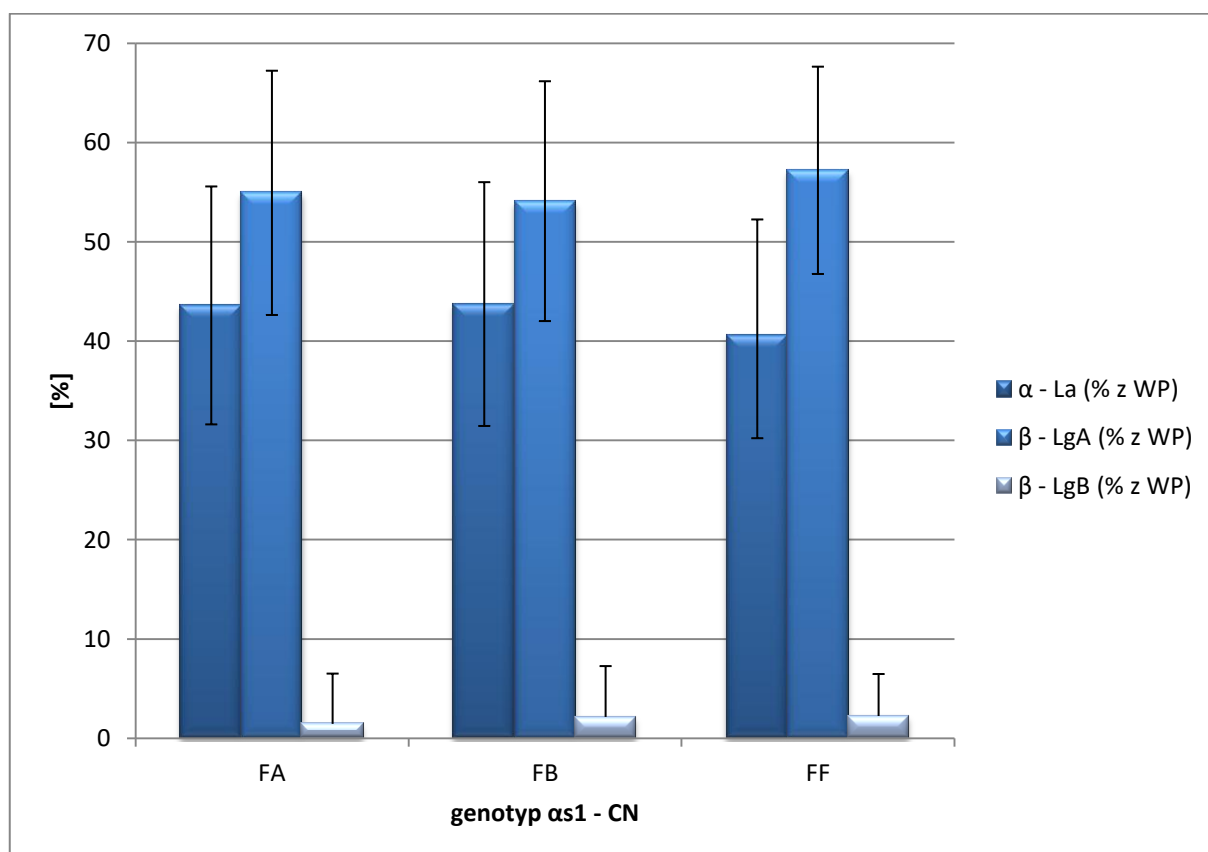


Tabulka č. 12: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu α 1-CN na zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkových CN ($\alpha = 0,05$).

	α 1-CN	α 2-CN	β -CN	κ -CN
Genotyp α 1-CN	p-hodnota			
FA x FB	p = 0,461454	p = 0,387495	p = 0,404982	p = 0,395130
FA x FF	p = 0,117020	p = 0,071102	p = 0,625278	p = 0,042305
FB x FF	p = 0,000591	p = 0,141898	p = 0,957258	p = 0,039204

Z Grafu č. 6 plyne, že zastoupení α 1-CN a α 2-CN je největší v mléce koz s genotypem FB. β -CN má největší zastoupení v mléce koz s genotypem FA a κ -CN je zastoupen v největší míře v mléce koz s genotypem FF. Rozdíly v zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí jsou v obsahu α 1-CN na stanovené hladině pravděpodobnosti statisticky významné mezi genotypy FB a FF a v obsahu κ -CN mezi genotypem FF a ostatními genotypy, jak je doloženo v Tabulce č. 12.

Graf č. 7: Procentuální zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkových WP v závislosti na genotypu α 1-CN.

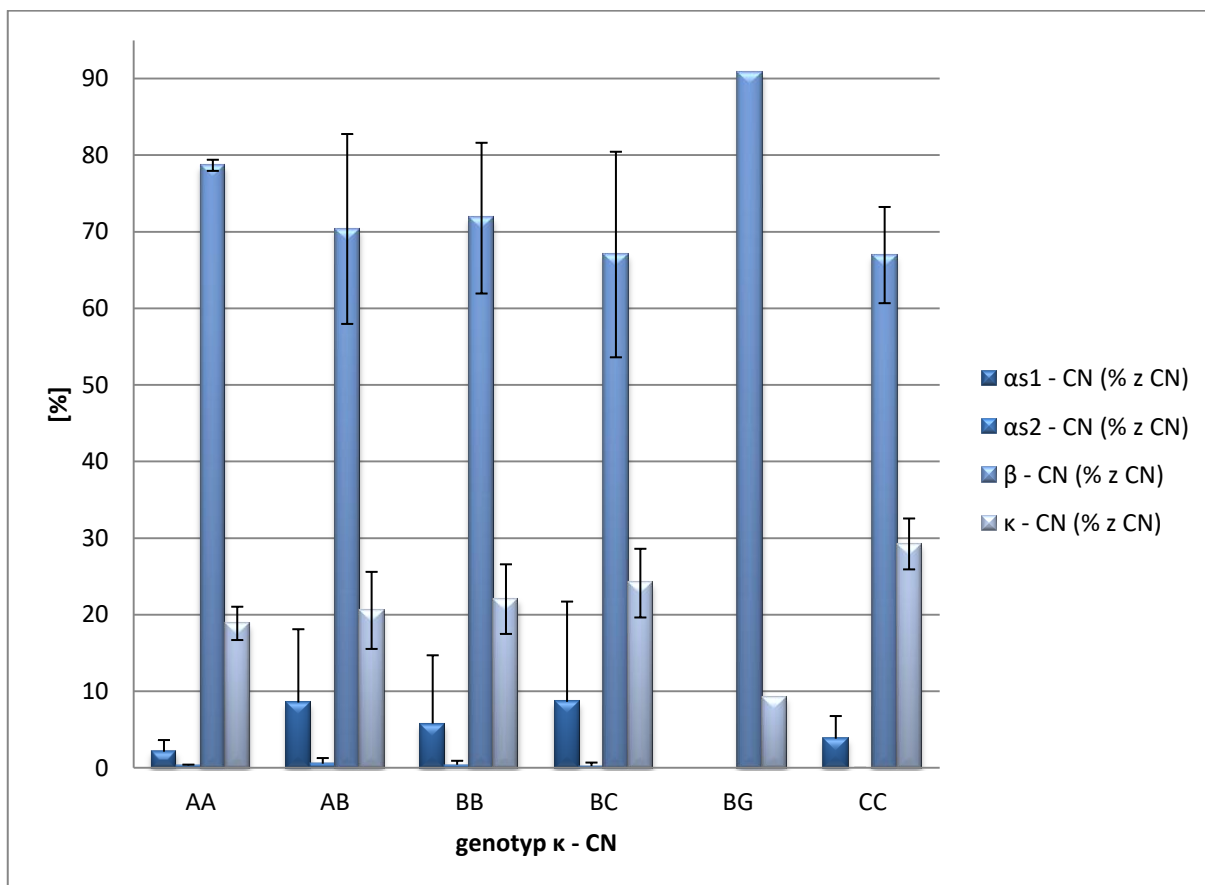


Tabulka č. 13: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu α 1-CN na zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkových WP ($\alpha = 0,05$).

	α -La	β -LgA	β -LgB
Genotyp α 1-CN	p-hodnota		
FA x FB	p = 0,977403	p = 0,790042	p = 0,467351
FA x FF	p = 0,357584	p = 0,517378	p = 0,265994
FB x FF	p = 0,199334	p = 0,137134	p = 0,438393

Z Grafu č. 7 je zřejmé, že pro všechny genotypy je nejvíce zastoupenou frakcí WP β -LgA a v nejmenším množství se vyskytuje β -LgB. Byly zjištěny rozdíly v zastoupení jednotlivých frakcí WP v závislosti na genotypu α 1-CN, nicméně mezi žádnými z genotypů nebyl rozdíl statisticky významný.

Graf č. 8: Procentuální zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkových CN v závislosti na genotypu κ -CN.



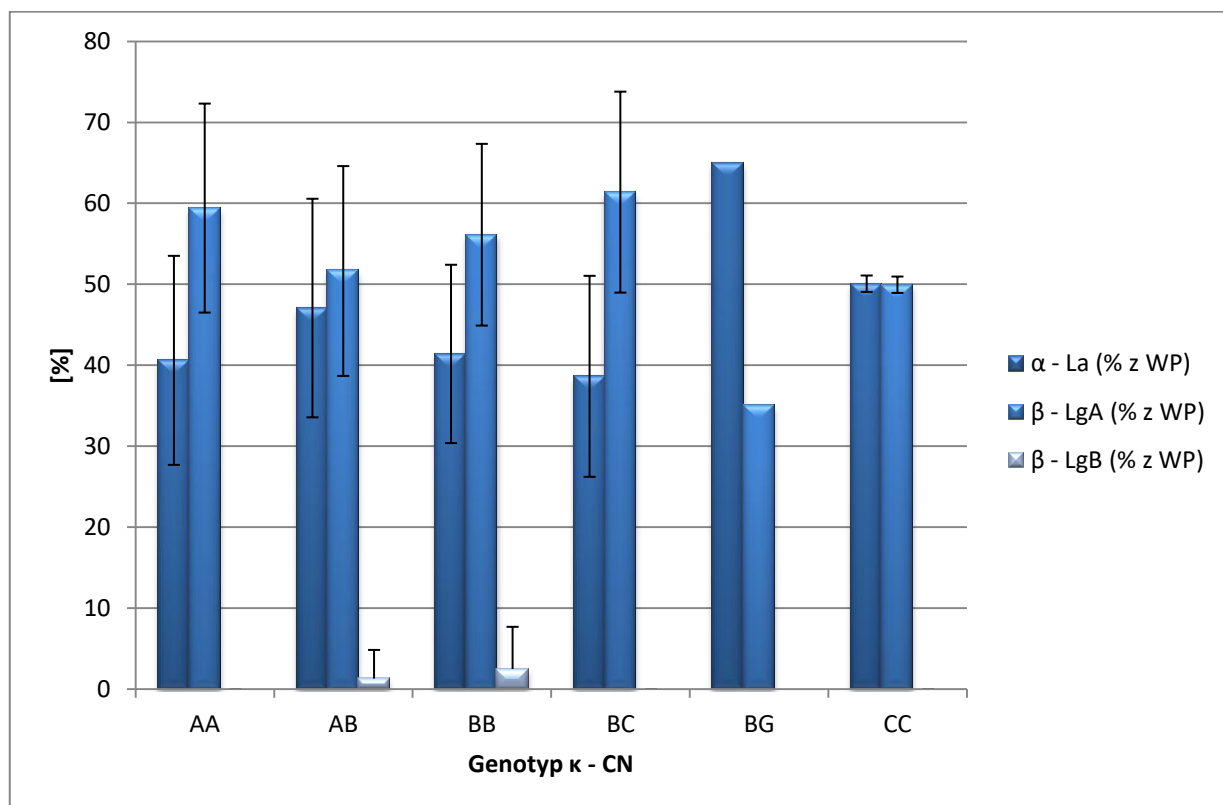
Pozn.: Pro genotyp BG byl analyzován pouze jeden vzorek mléka.

Tabulka č. 14: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu κ -CN na zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkových CN ($\alpha = 0,05$).

	α S1-CN	α S2-CN	β -CN	κ -CN
Genotyp κ -CN	p-hodnota			
AA x AB	p = 0,341307	p = 0,957661	p = 0,514991	p = 0,646126
AA x BB	p = 0,644407	p = 0,892858	p = 0,132844	p = 0,329892
AA x BC	p = 0,883618	p = 0,261652	p = 0,057041	p = 0,165543
AA x CC	p = 0,698536	p = 0,220672	p = 0,245279	p = 0,066053
AB x BB	p = 0,175756	p = 0,737197	p = 0,926391	p = 0,172007
AB x BC	p = 0,338937	p = 0,303107	p = 0,492414	p = 0,104942
AB x CC	p = 0,802264	p = 0,246888	p = 0,394537	p = 0,026644
BB x BC	p = 0,390301	p = 0,204276	p = 0,447144	p = 0,241879
BB x CC	p = 0,840553	p = 0,142965	p = 0,188971	p = 0,028224
BC x CC	p = 0,660550	p = 0,547615	p = 0,464215	p = 0,184567

Frakce α S1-CN byla nejvíce zastoupenou v mléce koz s genotypem BC a následně AB. α S2-CN byl ve všech případech v zanedbatelném zastoupení a u genotypu BG a CC byla tato frakce pod mezí detekce. V mléce kozy s genotypem BG byl pod mezí detekce α S1-CN i α S2-CN. Frakce β -CN tak u tohoto vzorku zastupovala více než 90 %. Z ostatních vzorků bylo průměrné zastoupení β -CN nejvyšší u genotypu AA. Průměrné zastoupení κ -CN bylo nejvyšší u genotypu CC. Statisticky významně se lišil pouze obsah κ -CN mezi genotypy AB a CC a mezi genotypy BB a CC.

Graf č. 9: Procentuální zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkových WP v závislosti na genotypu κ -CN.



Pozn.: Pro genotyp BG byl analyzován pouze jeden vzorek mléka.

Tabulka č. 15: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu κ -CN na zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkových WP ($\alpha = 0,05$).

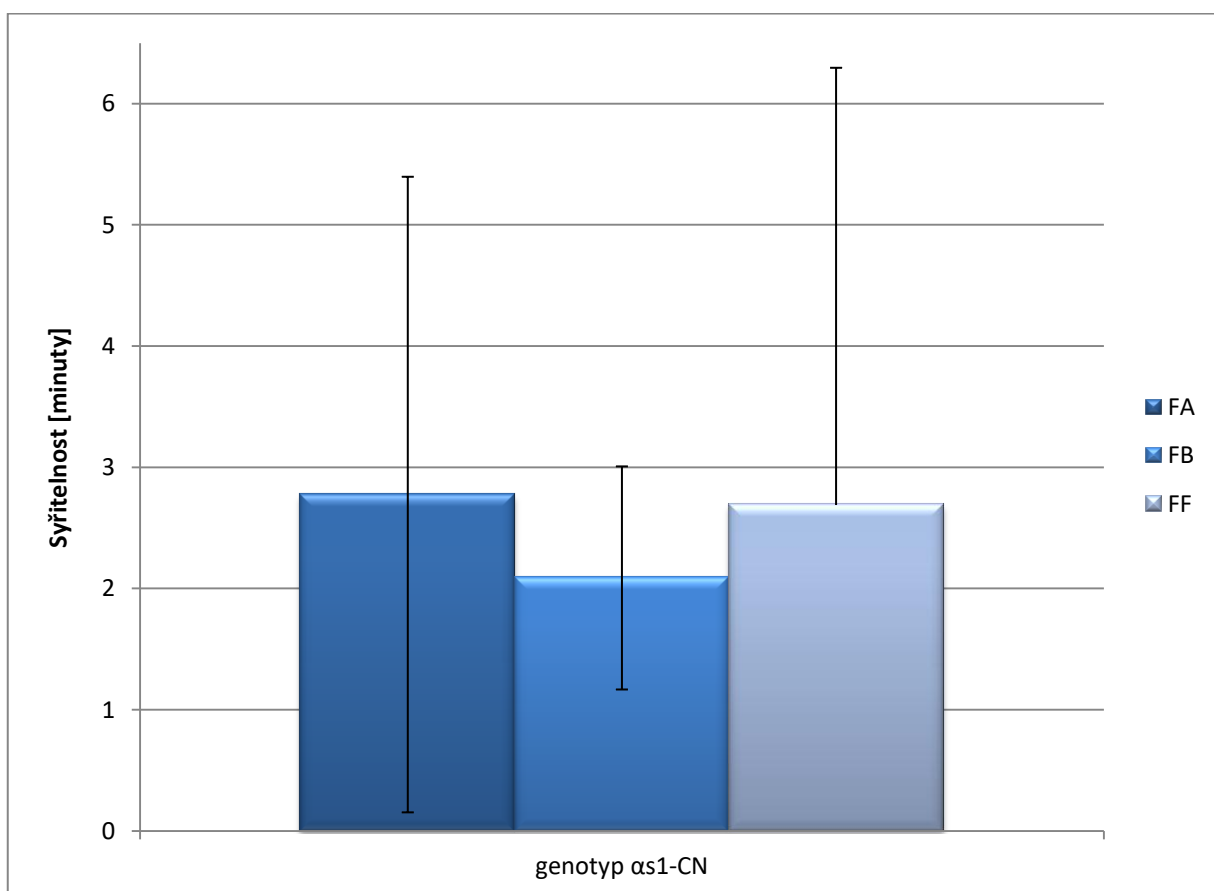
	α -La	β -LgA	β -LgB
Genotyp κ -CN	p-hodnota		
AA x AB	p = 0,652169	p = 0,452501	p = 0,657419
AA x BB	p = 0,915177	p = 0,610833	p = 0,451127
AA x BC	p = 1,000000	p = 1,000000	p = 1,000000
AA x CC	p = 0,698536	p = 0,698536	p = 0,698536
AB x BB	p = 0,042426	p = 0,084801	p = 0,274318
AB x BC	p = 0,105638	p = 0,062422	p = 0,346406
AB x CC	p = 0,802264	p = 0,960056	p = 0,657419
BB x BC	p = 0,599353	p = 0,296262	p = 0,154630
BB x CC	p = 0,181125	p = 0,400768	p = 0,451127
BC x CC	p = 0,464215	p = 0,464215	p = 0,883618

Z Grafu č. 9 vyplývá, že nejvíce zastoupenou frakcí WP byla ve většině případů frakce β -LgA. Pro genotyp CC je zastoupení α -La a β -LgA nejvyrovnanější s nepatrnou převahou α -La. Pouze u genotypu BG výrazně převažuje zastoupení α -La nad β -LgA. Frakce β -LgB byla stanovena pouze v mléce koz s genotypem AB a BB. Z Tabulky č. 15 je patrné, že rozdíly v zastoupení jednotlivých frakcí WP v závislosti na genotypu κ -CN nejsou až na jednu výjimku statisticky významné.

5.3. Vliv genotypů α s1-CN a κ -CN na syřitelnost mléka

Ve Výzkumném ústavu mlékárenském byla stanovena syřitelnost jednotlivých vzorků mléka. Syřitelnost je schopnost mléka srážet se syřidlem v důsledku koagulace kaseinů a vytvářet tak sýřeninu požadovaných vlastností. Pro každý vzorek byla stanovena syřitelnost mléka jako časový interval (minuty) od přidání syřidla do objevení prvních vloček srážejícího se kaseinu. Závislost syřitelnosti na genotypu α s1-CN a κ -CN je zobrazena v Grafech č. 10 a č. 11.

Graf č. 10: Závislost syřitelnosti na genotypu α s1-CN.

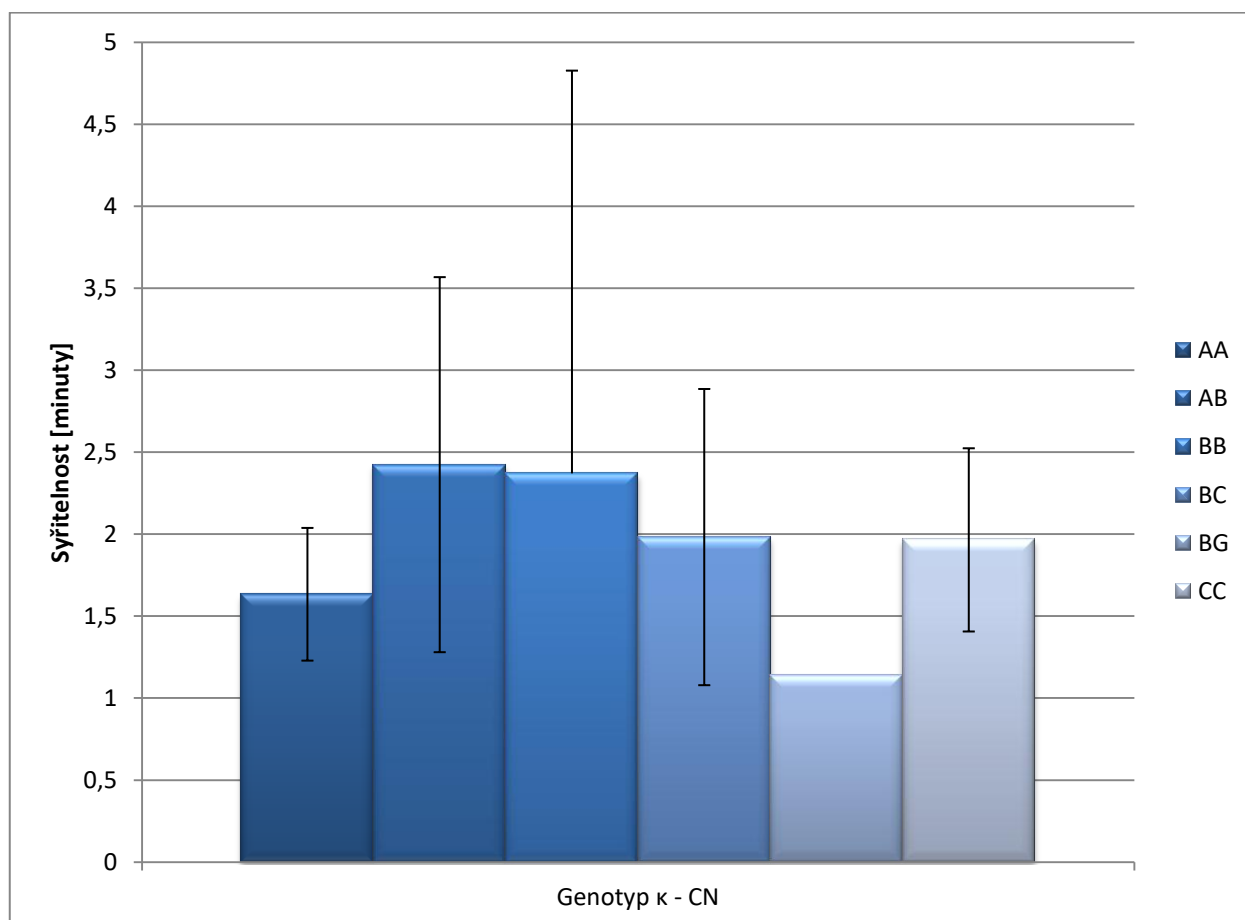


Tabulka č. 16: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu α 1-CN na syřitelnost mléka ($\alpha = 0,05$).

Genotyp α 1-CN	p-hodnota
FA x FB	p = 0,505918
FA x FF	p = 0,507459
FB x FF	p = 0,974428

V Grafu č. 10 jsou patrné určité rozdíly v syřitelnosti mléka. Průměrně nejrychleji se začaly tvořit vločky kaseinu v mléce koz s genotypem FB, naopak nejpomaleji v mléce koz s genotypem FA. Rozdíly v syřitelnosti však nejsou statisticky významné.

Graf č. 11: Závislost syřitelnosti na genotypu κ -CN.



Pozn.: Pro genotyp BG byl analyzován pouze jeden vzorek mléka.

Tabulka č. 17: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu κ -CN na syřitelnost mléka ($\alpha = 0,05$).

Genotyp κ-CN	p-hodnota
AA x AB	p = 0,103988
AA x BB	p = 0,474946
AA x BC	p = 0,672604
AA x CC	p = 0,386477
AB x BB	p = 0,113380
AB x BC	p = 0,244726
AB x CC	p = 1,000000
BB x BC	p = 0,536489
BB x CC	p = 0,717990
BC x CC	p = 0,591208

Vliv genotypu κ -CN (Graf č. 11) na syřitelnost mléka je výraznější než vliv genotypu α s1-CN (Graf č. 10). Průměrně nejrychlejší vytvoření vloček kaseinu bylo pozorováno v mléce kozy s genotypem BG a následně AA. Průměrně nejpomalejší nástup koagulace byl v mléce koz s genotypem AB a následně BB. Ani zde, stejně jako v případě vlivu genotypu α s1-CN na syřitelnost, nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl v syřitelnosti mléka.

6. DISKUZE

Zkoumání polymorfismu genů mléčných bílkovin má velký potenciál pro vylepšení vlastností jako je obsah proteinů v mléce a jejich výtěžnost při zpracování mléka. V této diplomové práci byl hodnocen vliv rozdílného genotypu α s1-CN a rozdílného genotypu κ -CN na celkový obsah bílkovin a na procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v kozím mléce. Ověřovány byly hypotézy, že se zastoupení a obsah jednotlivých bílkovinných frakcí v mléce liší v závislosti na genetické příslušnosti a individualitě dojeného zvířete a v závislosti na fázi laktačního období. Dále byl hodnocen vliv rozdílného genotypu α s1-CN a rozdílného genotypu κ -CN na syřitelnost mléka. K hodnocení byly použity vzorky mléka plemene koza bílá krátkosrstá.

Ve vzorcích mléka tvořily kaseinové bílkoviny průměrně $69,4 \pm 8$ % z celkových bílkovin. To je o něco méně, než bývá obecně pro kozí mléko uváděno (Moioli et al., 1998; Hilali et al., 2011; Selvaggi et al., 2014), tedy 80 % kaseinových ku 20 % syrovátkovým bílkovinám. V diplomové práci Opravilové (2017), na kterou tato práce metodicky navazuje, bylo zastoupení kaseinů také nižší a zároveň se lišilo ve vzorcích mléka dvou plemen. Ve vzorcích mléka plemene koza sánská bylo zastoupení kaseinů $76,43 \pm 12,22$ % a ve vzorcích mléka plemene koza bílá krátkosrstá $73,37 \pm 8,28$ % na jedné farmě a $65,19 \pm 9,62$ % na farmě druhé. Je tedy pravděpodobné, že poměr kaseinových bílkovin ku syrovátkovým se mírně liší a to nejen v závislosti na plemeni.

Celkově se ve všech vzorcích mléka pohybovaly hodnoty procentuálního zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v těchto rozmezech:

- α s1-CN <0,02 – 58,45 % z CN (průměrně $6,23 \pm 9,11$ %)
- α s2-CN <0,05 – 2,83 % z CN (průměrně $0,41 \pm 0,55$ %)
- β -CN 25 – 90,7 % z CN (průměrně $71,48 \pm 10,46$ %)
- κ -CN 9,3 – 33,4 % z CN (průměrně $21,88 \pm 4,80$ %)
- α -La 20,84 – 66,01 % z WP (průměrně $42,49 \pm 11,67$ %)
- β -LgA 33,99 – 79,16 % z WP (průměrně $55,40 \pm 11,68$ %)
- β -LgB <0,02 – 26,38 % z WP (průměrně $2,11 \pm 4,77$ %)

6.1. Vliv genotypu α 1-CN na složení a obsah bílkovin

V genetické výbavě jednotlivých zvířat byly zjištěny alely A, B a F pro α 1-CN. Varianty A a B se řadí do skupiny silných alel. Varianta F patří mezi slabé alely. Tato alela se vyskytovala ve všech případech a konkrétní genotypy pro α 1-CN byly heterozygotní FA a FB a homozygotní FF. Podle Sztankóové et al. (2007) se plemeno koza bílá krátkosrstá řadí spolu s plemeny koza hnědá krátkosrstá, koza sánská a koza alpská mezi plemena s vysokou frekvencí výskytu alely F pro α 1-CN.

Nejvyšší celkový obsah bílkovin v mléce zajišťovala kombinace alel F a B. Průměrný celkový obsah bílkovin v mléce koz s genotypem FB byl $2,68 \pm 0,23$ %. Maximální stanovená hodnota u kombinace F a B byla 3,26 % a minimální hodnota 2,17 %. Genotyp FA dával průměrně $2,56 \pm 0,17$ % bílkovin v mléce. Nejnižší celkový obsah bílkovin byl zjištěn v mléce koz homozygotních pro α 1-CN s genotypem FF, ve kterém bylo stanoveno průměrně $2,53 \pm 0,26$ % bílkovin. Na zvolené hladině významnosti byl statisticky významný rozdíl v celkovém obsahu bílkovin v mléce koz s genotypem FB a FF. U ostatních kombinací nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Rovněž Rodriguez et al. (2015) zjistili nejnižší obsah bílkovin v mléce zvířat s homozygotním genotypem FF.

Zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí se v závislosti na genotypu α 1-CN mírně lišilo. Největší zastoupení měl podle předpokladu ve všech variantách β -CN, následovaný κ -CN, α 1-CN a v nejmenším zastoupení byl vždy α 2-CN. Zastoupení β -CN bylo nejvyšší u genotypu FA ($75,65 \pm 5,50$ %) a nejnižší u genotypu FF ($70,43 \pm 12,78$ %). Rozdíly však nebyly statisticky významné. Zastoupení κ -CN bylo protichůdné oproti zastoupení β -CN, tedy nejvyšší u genotypu FF ($23,32 \pm 4,94$ %) a nejnižší u genotypu FA ($20,08 \pm 3,81$ %). V tomto případě byl prokázán i statisticky významný rozdíl v obsahu κ -CN. Frakce α 2-CN měla velmi malé zastoupení v porovnání s ostatními frakcemi. Nejvyšší zastoupení α 2-CN bylo u genotypu FB ($0,44 \pm 0,54$ %). Velmi malé zastoupení této frakce lze vysvětlit výskytem alely F v genotypu všech zvířat, od kterých bylo odebráno mléko. Také Rodriguez et al. (2015) zjistili, že α 2-CN byl v nejmenší míře zastoupený v mléce koz, u nichž se vyskytovala alela E nebo F. Vliv alel E a F na zastoupení kaseinů potvrdili i Caravaca et al. (2009). Podle těchto autorů tyto dvě alely výrazně snižovaly míru syntézy α 1-CN.

Gen CSN1S1, pro který byly rozlišeny výše zmíněné alely A, B a F, je gen kódující bílkovinnou frakci α 1-CN. Frakce α 1-CN měla největší zastoupení v případě genotypu FB, konkrétně $6,97 \pm 8,17$ %. Zároveň byl prokázán statisticky významný rozdíl v zastoupení této frakce mezi genotypy FB a FF. Devold et al. (2011) uvádí, že s rostoucím obsahem α 1-CN

by měl růst i celkový obsah bílkovin v mléce. Tento jev byl potvrzen, mléko koz s kombinací alel F a B obsahovalo největší celkové množství bílkovin a zároveň i největší zastoupení α 1-CN.

Procentuální zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin se v závislosti na genotypu α 1-CN příliš nelišilo a mezi genotypy nebyl potvrzen žádný statisticky významný rozdíl. Nejvíce zastoupený byl ve všech případech β -LgA, který vždy tvořil více než 50 % syrovátkových bílkovin. Jeho nejvyšší průměrná hodnota byla naměřena u genotypu FF ($57,21 \pm 10,44$ %). Frakce α -La byla vždy v nižším zastoupení než β -LgA. Ke stejnému závěru došli Moatsou et al. (2008). Frakce s nejnižším procentem výskytu byla β -LgB a nejvyšší průměrná hodnota $2,26 \pm 4,23$ % byla stanovena u genotypu FF.

Podle Sztankóové et al. (2007) je hlavní výhodou při hodnocení polymorfismu mléčných bílkovin to, že genotypy mohou být stanoveny hned při narození a to u samců i u samic, zatímco celkový obsah proteinů a jejich výtěžnost mohou být stanoveny pouze u samic a to až po porodu. Gen CSN1S1 má důležitý vliv na obsah bílkovin v kozím mléce. Praktické využití genu CSN1S1 do budoucna záleží na frekvenci výskytu jednotlivých alel v dané populaci.

Mezi genotypy FA a FB nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly na stanovené hladině významnosti. To pravděpodobně odpovídá skutečnosti, že oba dva genotypy zahrnují jednu alelu slabou a druhou silnou. Výsledky v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí by se mohly více lišit ve skupině zvířat, ve které by se vyskytovaly i genotypy homozygotní pro silnou alelu. Ve skupině koz, od kterých byly odebírány vzorky pro účely této diplomové práce, se vždy vyskytovala alespoň jedna slabá alela, proto nelze očekávat výrazné rozdíly v obsahu bílkovin a procentuálním zastoupení bílkovinných frakcí mezi danými genotypy.

6.2. Vliv genotypu κ -CN na složení a obsah bílkovin

Pro gen CSN3, který kóduje bílkovinu κ -CN, byly v dané skupině zvířat rozlišeny alely A, B, C a G. Všechny tyto alely se řadí do stejné skupiny podle isoelektrického bodu. Nejvíce zastoupenou alelou byla alela B následovaná alelou A. Podle Moatsou et al. (2008) jsou tyto dvě alely nejrozšířenější u většiny evropských plemen koz. Konkrétní genotypy byly homozygotní AA, BB a CC a heterozygotní AB, BC a BG. V dané skupině zvířat byl nejčtetnější genotyp BB a od koz s tímto genotypem bylo odebráno 102 vzorků. Genotypy AA a CC se vyskytovaly pouze u jednoho zvířete a od každé kozy byly odebrány 2 vzorky.

Genotyp BG zastupoval pouze 1 vzorek, proto tento genotyp nebyl zahrnut do statistického vyhodnocení. Velké rozdíly v počtu vzorků od různých genotypů mohou ovlivňovat statistické hodnocení. Pokud by existovalo od každého genotypu stejné a dostatečně velké množství vzorků, byly by rozdíly průkaznější.

Celkový průměrný obsah bílkovin byl nejvyšší ve vzorku mléka kozy s kombinací alel B a G pro κ -CN. Tento vzorek obsahoval 2,77 % bílkovin. Ve vzorcích mléka koz s genotypy AB a BB byl celkový průměrný obsah bílkovin nižší, ale v této skupině byla současně stanovena nejvyšší hodnota 3,26 %. Nejnižší průměrný obsah bílkovin byl stanoven ve vzorcích mléka kozy s genotypem AA ($2,06 \pm 0,06$ %). Statisticky průkazný byl rozdíl v celkovém obsahu bílkovin mezi genotypem AA a genotypy AB, BB a BC. Caravaca et al.(2009) shodně stanovili vyšší obsah bílkovin v mléce koz s genotypem AB a BB oproti genotypu AA.

Zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí se vlivem genotypu κ -CN lišilo, avšak pravděpodobně kvůli nerovnému množství vzorků od různých genotypů nebyly rozdíly ve většině případů statisticky průkazné. Nejvyšší zastoupení opět měl β -CN, následovaný κ -CN, α 1-CN a nejméně byl zastoupen α 2-CN. Vzorek mléka kozy s genotypem BG obsahoval nejvyšší množství β -CN a naopak v něm nebyl detekován žádný α 1-CN ani α 2-CN. Absence těchto dvou frakcí byla tedy vyrovnána vyšším obsahem β -CN a nikoliv sníženým celkovým obsahem bílkovin. Obdobně v případě genotypu CC byly ve všech vzorcích mléka α 1-CN a α 2-CN pod mezí detekce. Homozygotní kombinace alel poskytovaly nižší zastoupení α 1-CN než heterozygotní kombinace. Procentuální zastoupení κ -CN v mléce bylo nejvyšší u genotypu CC ($29,24 \pm 3,32$ %) a statisticky významně se lišilo mezi genotypem CC a genotypy AB a BB.

Vliv genotypu κ -CN na zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin byl výraznější než vliv genotypu α 1-CN. U genotypů AA, AB, BB a BC převládala β -LgA nad α -La. U genotypu CC bylo jejich zastoupení vyrovnané s mírnou převahou α -La. Vzorek mléka kozy s genotypem BG měl poměr α -La a β -LgA opačný, výrazně převažovalo zastoupení α -La. V práci Hejtmánkové et al. (2012) bylo rovněž stanoveno vyšší zastoupení frakce α -La oproti frakci β -Lg. Byl pozorován vliv genu CSN3 na možný výskyt frakce β -LgB. V případě genotypů AA, BC, BG a CC byla tato frakce ve všech vzorcích mléka pod mezí detekce. β -LgB byl identifikován pouze ve vzorcích mléka koz s genotypy AB a BB, přičemž u genotypu BB bylo její průměrné zastoupení vyšší ($2,49 \pm 5,21$ %). Nejvyšší naměřená hodnota β -LgB byla 26,36 % pro genotyp BB a 12,02 % pro genotyp AB.

6.3. Vliv fáze laktace na složení a obsah bílkovin

V průběhu laktačního období byl postupně pozorován pokles v celkovém obsahu bílkovin v kozím mléce. Nejvyšší celkový obsah bílkovin byl zjištěn ve vzorcích mléka odebraných v květnu. Průměrný obsah bílkovin v mléce v tomto měsíci činil $2,795 \pm 0,25$ % a maximální naměřená hodnota byla 3,26 %. Tato hodnota byla celkově nejvyšší ze všech analyzovaných vzorků mléka. Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi květnem a ostatními měsíci odběru vzorků mléka, tedy červnem a červencem. V červnu a v červenci byl zaznamenán pokles celkového obsahu bílkovin. V červnu činil průměrný obsah bílkovin v mléce $2,60 \pm 0,21$ % s maximální naměřenou hodnotou 3,01 %. V tomto měsíci byla naměřena i celkově nejnižší hodnota, a to 2,02 % bílkovin v mléce. V červenci byl průměrný obsah bílkovin $2,57 \pm 0,24$ %. Nejvyšší naměřená hodnota byla 3,2 % a nejnižší 2,08 %. Maximální i minimální hodnota naměřená v měsíci červenci byla tedy vyšší než maximální a minimální hodnota naměřená v červnu, celkový průměrný obsah bílkovin byl ale nepatrně vyšší v červnu. Výsledky v celkovém obsahu bílkovin v mléce v měsíci červnu a červenci se liší, ale nebyl mezi nimi na stanovené hladině významnosti prokázán statisticky významný rozdíl. Celkový obsah bílkovin stanovený ve vzorcích mléka odpovídá průměrné hodnotě uváděné Svazem chovatelů ovcí a koz (n. d.) pro plemeno koza bílá krátkosrstá. Uvádí, že se obsah bílkovin v mléce tohoto plemene průměrně pohybuje kolem 2,7 %.

Stanovené výsledky souhlasí s výsledky stanovenými ostatními autory (Fekadu et al., 2005; Hejtmánková et al., 2012; Mestawet et al., 2012; Inglingstad et al., 2016), kteří zjistili, že celkový obsah proteinů v kozím mléce byl v prostřední části laktace nejnižší a na začátku a na konci laktace nejvyšší. Pro účely této diplomové práce byly vzorky odebrány pouze v měsících květen, červen a červenec, tedy v počáteční a prostřední části z celého laktačního období. Laktační období běžně trvá od března do října. Nejvyšší průměrný obsah bílkovin byl zjištěn v měsíci květnu, tedy na začátku laktačního období. Nižší hodnoty byly naměřeny v měsících červen a červenec, které odpovídají prostřední části laktace. Tato práce nepokývá konečnou fázi laktačního období, nicméně z naměřených výsledků a z výsledků stanovených výše uvedenými autory lze předpokládat, že celkový obsah bílkovin bude ke konci laktace narůstat.

Z výsledků analýz vyplývá, že i zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí se během laktačního období liší. Nejvíce zastoupenou kaseinovou frakcí byl ve všech případech β -CN, který vždy tvořil více než 60 % z celkových CN. Následovalo zastoupení κ -CN, α s1-CN a v nejmenší míře se vždy vyskytoval α s2-CN. Zastoupení α s1-CN bylo v jednotlivých

měsících nejproměnlivější. Jeho průměrné zastoupení postupně vzrůstalo od května do července, s průměrnými hodnotami $2,74 \pm 4,65$ % v květnu, $5,78 \pm 7,68$ % v červnu a $8,53 \pm 11,54$ % v červenci. S fází laktace byl zaznamenán i nárůst α_2 -CN, jehož průměrné zastoupení činilo $0,19 \pm 0,27$ % v květnu, $0,29 \pm 0,40$ % v červnu a $0,65 \pm 0,71$ % v červenci. V zastoupení β -CN byla pozorována opačná tendence, tedy nejvyšší zastoupení bylo zjištěno v květnu ($76,88 \pm 4,90$ %) a nejnižší v červenci ($69,03 \pm 11,99$ %). Nejstabilnější kaseinovou frakcí byl κ -CN. Jeho zastoupení se mírně lišilo, nejvyšší průměrné hodnoty byly naměřeny v červnu ($22,56 \pm 5,51$ %), nicméně rozdíly v obsahu κ -CN mezi všemi měsíci odběru vzorků nebyly statisticky významné na zvolené hladině významnosti. Z výsledků analýz lze vyvodit, že s postupující fází laktace klesalo zastoupení β -CN a naopak rostlo zastoupení α_1 -CN a α_2 -CN. Inglingstad et al. (2016) pozorovali opačné výsledky. Relativní zastoupení β -CN bylo nejvyšší uprostřed laktace a relativní zastoupení α_1 -CN nejnižší. Prozatím neexistuje mnoho studií zabývajících se relativním zastoupením jednotlivých kaseinových frakcí v závislosti na různých faktorech. Uvedená studie se týkala populace norských koz, zatímco v této práci bylo hodnoceno mléko plemene koza bílá krátkosrstá. Je možné, že zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí se v průběhu laktace liší i právě v závislosti na plemeni a dalších faktorech.

V procentuálním zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin v kozím mléce byly také zjištěny rozdíly. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v procentuálním zastoupení všech frakcí syrovátkových bílkovin mezi vzorky mléka nadojenými v červnu a v červenci a v procentuálním zastoupení α -La a β -LgA mezi vzorky mléka nadojenými v květnu a v červenci. Nejméně zastoupený byl ve všech případech β -LgB. Jeho obsah byl v porovnání s ostatními frakcemi syrovátkových bílkovin minimální a činil průměrně $1,70 \pm 4,67$ % v květnu, $2,85 \pm 5,38$ % v červnu a $1,31 \pm 3,89$ % v červenci. Zastoupení α -La bylo nejvyšší v červenci ($49,52 \pm 0,74$ %). β -LgA měl nejvyšší zastoupení v červnu ($59,42 \pm 11,73$ %). Poměr mezi α -La a β -LgA se v posledním měsíci změnil. V květnu a v červnu v mléce výrazně převažoval β -LgA nad α -La. V červenci se poměr těchto dvou WP frakcí vyrovnal a mírně převažovalo zastoupení α -La nad β -LgA (α -La $49,52 \pm 9,74$ % a β -LgA $49,17 \pm 9,23$ %). Stanovené výsledky se liší od výsledků získaných Hejtmánkovou et al. (2012). Ve své publikaci uvádějí, že v kozím mléce s výjimkou konce laktace vždy převažoval α -La nad β -Lg.

Byly prokázány rozdíly v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v různých měsících odběru vzorků, konkrétně v květnu, červnu a červenci. Pro přesnější zhodnocení vlivu fáze laktace na procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v kozím mléce

by však bylo třeba zanalyzovat větší množství vzorků odebraných ve všech měsících v průběhu celého laktačního období.

6.4. Vliv genotypu α 1-CN a κ -CN na syřitelnost

Syřitelnost mléka se ve všech vzorcích pohybovala od 0,49 do 4,46 minut. Pouze v mléce tří zvířat byly naměřeny hodnoty vyšší. Vysoké hodnoty byly získány v mléce kozy s identifikačním číslem 5862 se syřitelností 7,49 minut v červnu a více než 25 minut v červenci. V květnu v mléce tohoto zvířete nebyla syřitelnost stanovena. Genotyp této kozy je FF pro α 1-CN a BB pro κ -CN. Další vysoké hodnoty syřitelnosti byly získány v červenci (6,18 minut) v mléce kozy s identifikačním číslem 9057 s genotypy FB pro α 1-CN a AB pro κ -CN a také v červnu v mléce kozy s identifikačním číslem 7227 (12,4 minut) s genotypy FA pro α 1-CN a BB pro κ -CN. Jelikož byl v mléce kozy s identifikačním číslem 5862 časový interval vyjadřující syřitelnost dlouhý ve všech vzorcích a zároveň není žádný zjevný vztah mezi uvedenými vysokými hodnotami a genotypy, lze předpokládat, že je pomalý nástup koagulace způsoben jinými, individuálními vlivy.

Na zvolené hladině významnosti nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl v syřitelnosti vzorků mléka v závislosti na genotypu α 1-CN. Nejkratší čas od přidání syřidla do vytvoření prvních vloček srážejícího se kaseinu byl zaznamenán ve vzorcích mléka koz s genotypem FB. Průměrná syřitelnost byla v tomto případě $2,09 \pm 0,92$ minut. Průměrný časový interval odpovídající syřitelnosti byl pro genotypy FA a FF vyrovnanější a vyšší než v případě genotypu FB. Průměrná syřitelnost vzorků mléka koz s genotypem FA byla $2,78 \pm 2,62$ minut a průměrná syřitelnost vzorků mléka koz s genotypem FF $2,69 \pm 3,6$ minut. Větší vliv genu CSN1S1 na syřitelnost mléka se dá předpokládat ve skupině zvířat, ve které se budou vyskytovat ve větší míře silné alely pro α 1-CN. V důsledku přítomnosti slabé alely F v genotypu všech zvířat, od kterých byl odebrán vzorek mléka, je pravděpodobně vliv na syřitelnost menší a statisticky neprůkazný.

Stejně jako v případě genotypu α 1-CN nebyl ani pro genotyp κ -CN prokázán žádný statisticky významný rozdíl ve vlivu na syřitelnost mléka. Rozdíly v syřitelnosti však byly výraznější než v případě vlivu genotypu α 1-CN. Nejrychlejší vytvoření vloček kaseinu bylo pozorováno ve vzorku mléka kozy s genotypem BG, kde byl časový interval 1,14 minut. Následovaly vzorky mléka kozy s genotypem AA, kde byla syřitelnost průměrně $1,63 \pm 0,41$ minut. Tyto výsledky ale mohou být zkreslené, jelikož genotypy BG i AA se vyskytovaly pouze u jednoho zvířete. Nejpomalejší nástup koagulace byl zaznamenán u vzorků od koz

s genotypy AB a BB. Průměrná syřitelnost byla $2,43 \pm 1,14$ minut pro genotyp AB a $2,37 \pm 2,46$ minut pro genotyp BB. Rozdíly v syřitelnosti mléka v závislosti na genotypu κ -CN nejsou statisticky významné pravděpodobně z důvodu nerovného množství vzorků od jednotlivých genotypů. Stejně jako v případě vyhodnocení vlivu tohoto genotypu na zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v mléce by bylo i zde vhodné hodnotit větší a vyrovnanější počet vzorků mléka původem od zvířat s rozdílnými genotypy.

Celkově nebyly stanoveny žádné statisticky významné rozdíly v syřitelnosti mléka v závislosti na genotypu α 1-CN ani v závislosti na genotypu κ -CN. Rozdíly v hodnotách syřitelnosti mléka jsou velké a je pravděpodobné, že zde převládá individualita zvířat nad vlivem genotypu.

7. ZÁVĚR

- Celkový obsah bílkovin i obsah α 1-CN byl nejnižší u homozygotního genotypu FF. Mezi genotypy FA a FB nebyly prokázány statisticky významné rozdíly na zvolené hladině významnosti, neboť oba genotypy zahrnují jednu silnou a jednu slabou alelu.
- Nejčtenější alely pro κ -CN byly alely B a A. Celkový obsah bílkovin byl vyšší v mléce koz s genotypy AB a BB než v mléce koz s genotypem AA. Zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí se mezi některými genotypy lišilo.
- Vliv genotypu κ -CN na zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin byl výraznější než vliv genotypu α 1-CN. Byl pozorován vliv genotypu κ -CN na možný výskyt frakce β -LgB. Tato frakce se vyskytovala pouze ve vzorcích mléka koz s genotypy AB a BB.
- Celkově byly nalezeny některé rozdíly v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí i v obsahu bílkovin v kozím mléce.
- Byly pozorovány změny v obsahu bílkovin i v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v závislosti na fázi laktace. Celkový obsah bílkovin postupně od května do července klesal. Po porovnání s ostatními studiemi je předpokladem, že na konci laktačního období bude obsah bílkovin narůstat. Zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí záviselo na fázi laktace. Nejstabilnější frakcí byl κ -CN, jehož zastoupení se v průběhu laktace téměř neměnilo.
- Na zvolené hladině významnosti nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl v syřitelnosti mléka v závislosti na genotypu α 1-CN a κ -CN. Vyšší vliv genotypu α 1-CN se předpokládá u skupiny zvířat s nižším výskytem alely F. Vliv genotypu κ -CN byl vyšší, ale rozdíly byly neprůkazné. Pravděpodobně zde převládá individualita zvířat nad vlivem genotypu.

Tato studie byla podpořena grantem projektu NAZV QJ1510137

Ministerstva zemědělství České republiky.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abd El- Gawad, M. A. M., Ahmed, N. S. 2011. Cheese yield as affected by some parameters – review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 10 (2). 131-153.

Albenzio, M., Santillo, A. 2011. Biochemical characteristics of ewe and goat milk: Effect on the quality of dairy products. *Small Ruminant Research*. 101. 33-40.

Almaas, H., Cases, A.L., Devold, T.G., Holm, H., Langsrud, T., Aabakken, L., Aadonoey, T., Vergarud, G.E. 2006. In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastrin and duodenal enzymes. *International Dairy Journal*, 16. 961-968.

Ballabio, C., Chessa, S., Rignanese, D., Gigliotti, C., Pagnacco, G., Terracciano, L., Fiocchi, A., Restani, P., Caroli, A. M. 2011. Goat milk allergenicity as a function of α_{S1} -casein genetic polymorphism. *Journal of Dairy Science*. 94. 998 – 1004.

Bozkaya, F., Mundan, D., Karabulut, O., Yerturk, M., Gurler, S., Aral, F. 2008. An investigation on the distribution of O and D alleles of the CSN1S2 gene in goat populations raised in southeastern region of Turkey *Small Ruminant Research*. 78. 193-196.

Caboni, P., Murgia, A., Porcu, A., Demuru, M., Pulina, G., Nudda, A. 2016. Gas chromatography-mass spectrometry metabolomics of goat milk with different polymorphism at the α_{S1} -casein genotype locus. *Journal of Dairy Science*. 99(8). 6046-6051.

Caravaca, F., Carrizosa, J., Urrutia, B., Baena, F., Jordana, J., Amills, M., Badaoui, B., Sánchez, A., Angiolillo, A., Serradilla, J. M. 2009. Short communication: Effect of α_{S1} -casein (CSN1S1) and κ -casein(CSN3) genotypes on milk composition in Murciano-Granadina goats. *Journal of Dairy Science*. 92 (6). 2960-2964.

Clark, S., Sherbon, J. W. 2000. Alpha $_{S1}$ -casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research*. 38. 123-134.

Dagnachew, B. S., Ådnøy, T. 2014. Additive and dominance effects of casein haplotypes on milk composition and quality in Norwegian dairy goats. *Small Ruminant Research*. 122. 59-69.

- Devold, T. G., Nordbo, R., Langsrud, T., Svenning, C., Brovold, M. J., Sorensen, E. S., Christensen, B., Adnoy, T., Vegarud, G. E. 2011. Extreme frequencies of the α s1-casein “null” variant in milk from Norwegian dairy goats— implications for milk composition, micellar size and renneting properties. *Dairy Science & Technology*. 91. 39-51.
- El-Agamy, E.I. 2006. The challenge of cow milk protein Allergy. *Small Ruminant Research*. 68. 64-72.
- El Hanafy, A. A. M., Qureshi, M. I., Sabir, J., Mutawakil, M., Ahned, M. M. M., El Ashmaoui, H., Ramadan, H. A. M. I., Abou-Alsoud, M., Sadek, M. A. 2015. Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies of beta-lactoglobulin gene in native Saudi goat breeds in relation to milk yield. *Czech journal of Animal Sciences*. 60 (3). 132-138.
- Fekadu, B., Soryal, K., Zeng, S., Van Hekken, D., Bah, B., Villaquiran, M. 2005. Changes in goat milk composition during lactation and their effect on yield and quality of hard and semi-hard cheeses. *Small Ruminant Research*. 59. 55-63.
- Gajdůšek, S. 2003. *Laktologie*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno. 84 s. ISBN: 8071576573.
- Gharedaghi, L., Shahrabaak, H. M., Sadeghi, M. 2016. Identification of novel SNP in caprine β -lactoglobuline gene. *Journal of Genetics*. 95 (3). 485-490.
- Haenlein, G. F. W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*. 51. 155-163.
- Hazebrouck, S., Ah-Leung, S., Bidat, E., Paty, E., Drumare, M. F., Tilleul, S., Adel-Patient, K., Wal, J. M., Bernard, H. 2013. Goat’s milk allergy without cow’s milk allergy: suppression of non-cross-reactive epitopes on caprine β -casein. *Clinical et Experimental Allergy*. 44. 602-610.
- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Gómez-Ruiz, J. A., 2011. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*. 101. 196-204.

- Hilali, M., El-Mayda, E., Rischkowsky, B. 2011. Characteristics and utilization of sheep and goat milk in the Middle East. *Small Ruminant Research*. 101. 92-101.
- Chatteron, D. E. W., Smithers, G., Roupas, P., Brodkorb, A. 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin - Technological implications for processing. *International Dairy Journal*. 16. 1229-1240.
- Chiatti, F., Chessa, S., Bolla, P., Cigalino, G., Caroli, A., Pagnacco, G. 2007. Effect of κ -Casein Polymorphism on Milk Composition in the Orobica Goat. *Journal of Dairy Science*. 90. 1962-1966.
- Inglingstad, R. Aa., Eknæs, M., Brunborg, L., Mestawet, T., Devold, T. G., Vegarud, G. E., Skeie, S. B. 2016. Norwegian goat milk composition and cheese quality: The influence of lipid supplemented concentrate and lactation stage. *International Dairy Journal*. 56. 13-21.
- Jain, A., Gour, D. S., Bisen, P. S., Prashant, Dubey, P. P., Sharma, D. K., Joshi, B. K., Kumar, D. 2009. Single nucleotide polymorphism (SNP) in alpha-lactalbumin gene of Indian Jamunapari breed of *Capra hircus*. *Small Ruminant Research*. 82. 156-160.
- Jandal, J. M. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 22. 177-185.
- Loch, J. I., Bonarek, P., Polit, A., Swiatek, S., Czub, M., Ludwikowska, M., Lewinski, K. 2015. Conformational variability of goat β -lactoglobulin: Crystallographic and thermodynamic studies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 72. 1283-1291.
- Marletta, D., Bordonaro, S., Guastella, A. M., Falagiani, P., Crimi, N., D'Urso, G. 2004. Goat milk with different α_{S2} -casein content: analysis of allergenic potency by REAST-inhibition assay. *Small Ruminant Research*. 52. 19-24.
- Marletta, D., Criscione, A., Bordonaro, S., Guastella, A. M., D'Urso, G. 2007. Casein polymorphism in goat's milk. *Le Lait*. 87(6). 491-504.

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

Marnila, P., Korhonen, H. 2002. Milk Proteins: Immunoglobulins. In: Roginski, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F. (eds.). Encyclopedia of dairy science. Academic Press. Amsterdam. 1950 - 1956. ISBN: 0122272358.

Martin, P., Szymanowska, M., Zwierzchowski, L., Leroux, Ch. 2002. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reproduction Nutrition Development*. 42. 433-459.

Mestawet, T. A., Girma, A., Ådnøy, t., Devold, T. G., Narvhus, J. A., Vegarud, G. E. 2012. Milk production, composition and variation at different lactation stages of four goat breeds in Ethiopia. *Small Ruminant Research*. 105. 176-181.

Moatsou, G., Moschopoulou, E., Mollé, D., Gagnaire, V., Kandarakis, I., Léonil, J. 2008. Comparative study of the protein fraction of goat milk from the Indigenous Greek breed and from international breeds. *Food Chemistry*. 106. 509-520.

Moioli, B., Pilla, F., Tripaldi, C. 1998. Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*. 27. 185-195.

Montalbano, M., Segreto, R., Di Gerlando, R., Mastrangelo, S., Sardina, M. T. 2016. Quantitative determination of casein genetic variants in goat milk: Application in Girgentana dairy goat breed . *Food Chemistry*. 192. 760-764.

Najafi, M., Rahimi Mianji, G., Ansari Pirsaraie, Z. 2014. Cloning and comparative analysis of gene structure in promoter site of alpha-s1 casein gene in Naeinian goat and sheep. *Meta Gene* 2. 854-861

Neveu, C., Mollé, D., Moreno, J., Martin, P., Léonil, J. 2003. Heterogeneity of Caprine Beta-Casein Elucidated by RP-HPLC/MS: Genetic Variants and Phosphorylations. *Journal of Protein Chemistry*. 21 (8). 557-567.

Opravilová, J. 2017. Změny v obsahu bílkovinných frakcí kozího mléka v průběhu laktace. Diplomová práce. ČZU. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 71 s.

Pandya, A.J., Ghodke, K. M., 2006. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Ruminant Research*. 68. 193-206.

Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G. F. W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68. 88-113.

Pirisi, A., Colin, O., Laurent, F., Scher, J., Parmentier, M. 1994. Comparison of milk composition, cheesemaking properties and textural characteristics of the cheese from two groups of goats with a high or low rate of α s1-casein synthesis. *International Dairy Journal*. 4(4). 329-345.

Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*. 79. 57-72.

Ribeiro, A.C., Ribeiro, S.D.A. 2010. Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research*. 89. 225-233.

Rodrigues, M. T., Soares, M. A. M., Zacaro, A. A., Silva, M. M. C., Garcia, O. S. R., Magalhaes, A. C. M. 2015. Differences in the defective alleles E and F for the locus CSN1S1 in goats affects the profile of milk caseins. *Small Ruminant Research*. 123. 47-54.

Selvaggi, M., Laudadio, V., Dario, C., Taufarelli, V. 2014. *Molecular Biology Reports*. 41. 1035-1048.

Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., Prosser, C. G. 2010. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*. 89. 110-124.

Svaz chovatelů ovcí a koz. Koza bílá krátkosrstá (B). [cit. 2018-02-28]. Dostupné z <<http://www.schok.cz/plemena-koz/plemena-mlecna/koza-bila-kratkosrsta-b>>

Sztankóova, Z., Mátlová, V., Malá, G. 2007. Genetic polymorphism at the CSN1S1 gene in two Czech goat breeds. *Czech Journal of Animal Sciences*. 52 (7). 199-202.

Tavares, G.M., Croguennec, T., Hamon, P., Carvalho, A.F., Bouhallab, S. 2015. Selective coacervation between lactoferrin and the two isoforms of β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*. 48. 238-247.

Thomann, S., Brechenmacher, A., Hinrichs, J. 2008. Strategy to evaluate cheesemaking properties of milk from different goat breeds. *Small Ruminant Research*. 74. 172-178.

Tulipano, G., Cocchi, D., Caroli, A. M. 2012. Comparison of goat and sheep β -lactoglobulin to bovine β -lactoglobulin as potential source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibitors. *International dairy Journal*. 24. 97-101.

Wang, X., Zhao, W., Huang, D., Pan, X., Qi, Y., Yang, Y., Zhao, H., Cheng, G. 2017. Proteomic analysis and cross species comparison of casein fractions from the milk of dairy animals. *Scientific Reports*. 7:43020. 1-9.

Yahyaoui, M. H., Angiolillo, A., Pilla, F., Sanchez, A., Folch, J. M. 2003. Characterization and Genotyping of the Caprine κ -Casein Variants. *Journal of Dairy Science*. 86. 2715-2720.

Yahyaoui, M. H. 2003. Genetic polymorphism in goat- study of the kappa casein, beta lactoglobulin, and steroyl coenzyme A desaturase genes. *Universidad Autónoma de Barcelona. Bellatera*. p. 148.

9. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Příklad výstupu ze statistického hodnocení – dvouvýběrový t-test, rozdíl v celkovém obsahu bílkovin v mléce mezi květnem a červnem.

Proměnná	t-testy; grupováno: měsíc (statistika) Skup. 1: červen Skup. 2: květen						
	Průměr červen	Průměr květen	t	sv	p	Poč.plat červen	Poč.plat. květen
%B	2,600159	2,795417	-3,73406	85	0,000340	63	24

Proměnná	t-testy; grupováno: měsíc (statistika) Skup. 1: červen Skup. 2: květen			
	Sm.odch. červen	Sm.odch. květen	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
%B	0,206151	0,247105	1,436777	0,261470

Příloha č. 2: Příklad výstupu ze statistického hodnocení – Mann-Whitneyův U-test – rozdíl v syřitelnosti mléka mezi genotypy FA a FB pro α S1-CN.

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (statistika) Dle proměn. Genotyp α S1-CN Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$						
	Sčt poč. FB	Sčt poč. FA	U	Z	p-hodn.	Z upravené	p-hodn.
Syřitelnost	5813,500	1089,500	763,5000	-0,665156	0,505951	-0,665207	0,505918

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (statistika) Dle proměn. Genotyp ?S1-CN Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$		
	N platn. FB	N platn. FA	2*1str. přesné p
Syřitelnost	100	17	0,506804

10. SEZNAMY

10.1. Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Profil křivky pro změnu gradientu

10.2. Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Průměrné složení kozího a kravského mléka (Jandal, 1996).

Tabulka č. 2: Četnost výskytu genotypů pro α s1-CN.

Tabulka č. 3: Četnost výskytu genotypů pro κ -CN.

Tabulka č. 4: Podmínky gradientové eluce.

Tabulka č. 5: Meze detekce a stanovitelnosti sledovaných analytů.

Tabulka č. 6: Procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí a celkový obsah bílkovin v individuálních vzorcích mléka (jednotlivé frakce stanoveny metodou HPLC, celkový obsah bílkovin metodou NIR).

Tabulka č. 7: Statistické vyhodnocení vlivu fáze laktace na celkový obsah bílkovin v mléce ($\alpha = 0,05$).

Tabulka č. 8: Statistické vyhodnocení vlivu fáze laktace na zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí v mléce ($\alpha = 0,05$).

Tabulka č. 9: Statistické vyhodnocení vlivu fáze laktace na zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin v mléce ($\alpha = 0,05$).

Tabulka č. 10: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu α s1-CN na celkový obsah bílkovin v mléce ($\alpha = 0,05$).

Tabulka č. 11: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu κ -CN na celkový obsah bílkovin v mléce ($\alpha = 0,05$).

Tabulka č. 12: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu α s1-CN na zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkových CN ($\alpha = 0,05$).

Tabulka č. 13: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu α s1-CN na zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkových WP ($\alpha = 0,05$).

Tabulka č. 14: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu κ -CN na zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkových CN ($\alpha = 0,05$).

Tabulka č. 15: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu κ -CN na zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkových WP ($\alpha = 0,05$).

Tabulka č. 16: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu $\alpha 1$ -CN na syřitelnost mléka ($\alpha = 0,05$).

Tabulka č. 17: Statistické vyhodnocení vlivu genotypu κ -CN na syřitelnost mléka ($\alpha = 0,05$).

10.3. Seznam grafů

Graf č. 1: Celkový obsah bílkovin v mléce v jednotlivých měsících odběru vzorku.

Graf č. 2: Průměrné zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkových CN v mléce v jednotlivých měsících odběru vzorku.

Graf č. 3: Průměrné zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkových WP v jednotlivých měsících odběru vzorku.

Graf č. 4: Závislost mezi celkovým obsahem bílkovin v mléce a genotypem $\alpha 1$ -CN.

Graf č. 5: Závislost mezi celkovým obsahem bílkovin v mléce a genotypem κ -CN.

Graf č. 6: Procentuální zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkových CN v závislosti na genotypu $\alpha 1$ -CN.

Graf č. 7: Procentuální zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkových WP v závislosti na genotypu $\alpha 1$ -CN.

Graf č. 8: Procentuální zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí z celkových CN v závislosti na genotypu κ -CN.

Graf č. 9: Procentuální zastoupení jednotlivých frakcí syrovátkových bílkovin z celkových WP v závislosti na genotypu κ -CN.

Graf č. 10: Závislost syřitelnosti na genotypu $\alpha 1$ -CN.

Graf č. 11: Závislost syřitelnosti na genotypu κ -CN.

10.4. Seznam příloh

Příloha č. 1: Příklad výstupu ze statistického hodnocení – dvouvýběrový t-test, rozdíl v celkovém obsahu bílkovin v mléce mezi květnem a červnem.

Příloha č. 2: Příklad výstupu ze statistického hodnocení – Mann-Whitneyův U-test – rozdíl v syřitelnosti mléka mezi genotypy FA a FB pro $\alpha 1$ -CN.