

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Ing. ROBERT KALA

**České Budějovice
2018**

Autoreferát disertační práce

Doktorand: Ing. ROBERT KALA

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat

Název práce: Vliv biologických faktorů na zastoupení mastných kyselin mléčného tuku

Školitel: doc. Ing. EVA SAMKOVÁ, Ph.D.

Oponenti: doc. Ing. LENKA KOUŘIMSKÁ, Ph.D.

doc. Ing. JIŘÍ MLČEK, Ph.D.

prof. Ing. LENKA VORLOVÁ, Ph.D.

Obhajoba disertační práce se koná dne 10. 1. 2019 v hodin v pavilonu učeben M, místnost vědecké rady ZF JU v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení ZF JU v Českých Budějovicích.

prof. Ing. JAN TRÁVNÍČEK, CSc.
předseda oborové rady
Zoohygiena a prevence chorob
hospodářských zvířat ZF JU
v Českých Budějovicích

SEZNAM IMPAKTOVANÝCH PUBLIKACÍ

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

PRÁCE VZNIKLA ZA PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH PROJEKTŮ

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

SOUHRN

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

SUMMARY

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

1. ÚVOD

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

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

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

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

2. CÍL PRÁCE

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

Dílčí cíle

- Posoudit vliv genetického založení (plemene a individuality dojnice), pořadí a stadia laktace na zastoupení mastných kyselin mléčného tuku u dojnic českého strakatého a holštýnského skotu.
- Zjistit četnosti polymorfismu genů souvisejících s biosyntézou mléčného tuku a mastných kyselin u dojnic českého strakatého a holštýnského skotu.
- Vyhodnotit vztah polymorfismu genů diacylglycerol acyltransferázy 1 a stearyl-CoA desaturázy 1 (případně dalších souvisejících se syntézou mléčného tuku) a ukazatelů mléčné užitkovosti.
- Zjistit možnosti stanovení mastných kyselin pomocí rutinní metody a porovnat je se stanovením mastných kyselin referenční metodou.
- Zjistit možnosti izolace DNA ze vzorků mléka a vyhodnotit metody genotypizace vybraných genů souvisejících s kvalitou kravského mléka.

3. MATERIÁL A METODIKA

Kapitola „*Materiál a metodika*“ není v práci podrobně zpracována. Jednotlivé metody a designy experimentů jsou uvedeny v příslušných publikacích.

4. SHRUTÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

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

4.1. Faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin mléčného tuku

4.1.1. Publikace vztahující se k danému tématu

- Hanuš, O., Samková, E., Křížová, L., Hasoňová, L., **Kala, R.** 2018. Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability – A review. *Molecules*, 1636, 23(7): 1-32.
- Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Hanuš, O., **Kala, R.**, Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J. 2018a. Joint effects of breed, parity, month of lactation, and cow individuality on the milk fatty acids composition. *Mljekarstvo*, 68(2): 98-107.
- Kala, R.**, Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J., Hanuš, O. 2018a. Nutritionally desirable fatty acids including CLA of cow's milk fat explained by animal and feed factors. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66(1): 69-76.
- Kala, R.**, Samková, E., Hasoňová, L., Špička, J., Pelikánová, T., Křížová, Z., Hladký, J. 2016a. Proportion of important fatty acids in cow and goat milk fat. In: *23th International PhD Students Conference MendelNet 2016*. Brno, 9-10 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 582-587. ISBN 978-80-7509-443-8

4.1.2. Komentář k problematice

Již počátkem 90. let 20. století byly publikovány souhrnné publikace, které se zabývaly studiem faktorů ovlivňujících složení mléčného tuku. Zásadní význam měly především studie Palmquista *a kol.* (1993) a později Jensena (2002). Autoři zde označují jako určující faktory související se složením mléčného tuku především biologické faktory a vliv výživy.

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

V publikaci typu review (viz kapitola 4.1.1 – Hanuš *a kol.*, 2018) jsme se rovněž zabývali FA mléčného tuku a vlivem vybraných faktorů na jejich variabilitu. Záměrem bylo shrnout nejnovější poznatky související se zastoupením FA mléčného tuku – jejich význam z technologického a nutričního hlediska, změny v obsazích působením biologických faktorů a vlivem výživy a v neposlední řadě vývoj v oblasti nepřímých metod pro jejich stanovení. Část zabývající se vývojem nepřímých metod je detailně rozpracována v kapitole 4.3.2 disertační práce.

V dalších dvou publikacích (viz kapitola 4.1.1 – Samková *a kol.*, 2018a; Kala *a kol.*, 2018a) jsme se zabývali vlivem biologických faktorů a vlivem výživy. První publikace (Samková *a kol.*, 2018a) byla zaměřena na variabilitu FA a jejich skupin a podíl jednotlivých biologických faktorů (plemeno, individualita dojnice, pořadí a stadium laktace) na složení mléčného tuku. Z výsledků vyplynulo, že nejvyšší hodnoty koeficientů determinace (R^2), jako ukazatelů podílu všech faktorů na celkové variabilitě v zastoupení FA, byly zjištěny u kyseliny myristolejové (C14:1), nejnižší naopak u kyseliny máselné (C4:0, *butyric acid*; 61,8 %, resp. 23,3 %). V případě skupin byly nejvyšší hodnoty R^2 zjištěny u nasycených FA (SFA, *saturated fatty acids*), nejnižší u polynenasycených FA (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*; 46,8 %, resp. 39,2 %). U C14:1 byla potvrzena statistická významnost v případě faktoru plemene, individuality dojnice a stadia laktace ($P < 0,001$). Hodnoty u C4:0 statisticky významné nebyly. U skupiny SFA byla zjištěna statistická významnost u faktoru individuality dojnice a stadia laktace ($P < 0,001$) i pořadí laktace ($P < 0,01$). V případě skupiny PUFA byla zjištěna statistická významnost u faktoru individuality dojnice a stadia laktace ($P < 0,001$, resp. $P < 0,01$). Ze zjištěných výsledků lze usuzovat, že nejvýznamnější vliv na zastoupení FA má

především individualita dojnice a stadium laktace.

Ve druhé publikaci (Kala *a kol.*, 2018a) jsme se zaměřili kromě vlivu biologických faktorů také na vliv výživy. Nejvyšší hodnoty R^2 byly zjištěny u kyseliny vakcenové (VA, *vaccenic acid*) a FA s rozvětveným řetězcem (BCFA, *branched-chain fatty acids*; 65 %, resp. 54 %), nejnižší pak u kyseliny linolové (LA, *linoleic acid*) a mononenasycených FA (MUFA, *monounsaturated fatty acids*; 25 %, resp. 30 %). U všech zjištěných hodnot R^2 byla potvrzena statistická významnost ($P < 0,001$). Výživa se na celkové variabilitě podílela nejvíce u VA a konjugované kyseliny linolové (CLA, *conjugated linoleic acid*) v případě skupin u PUFA.

Výsledky obou našich analýz v zásadě potvrdily závěry dalších publikací, tedy že zastoupení FA v mléčném tuku se mění v závislosti na biologických faktorech, a to s různou mírou intenzity. Někteří autoři sledovali i další faktory, např. Kay *a kol.* (2005) vliv genetické selekce na ukazatele mléčné užitkovosti, Kgwatalala *a kol.* (2009a) vliv polymorfismu stearoyl-CoA desaturázy 1 (*SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1*) na zastoupení FA, Mele *a kol.* (2009) vliv heritability a genetických korelací na zastoupení FA nebo Stoop *a kol.* (2009a) vliv energetického metabolismu na zastoupení FA.

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

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

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

Bainbridge *a kol.* (2016) se ve své studii zaměřili na porovnání VA, konjugované kyseliny linolové (CLA, *conjugated linoleic acid*) a kyseliny α -linolenové (ALA, *α -linolenic acid*) u dojnic holštýnského (H, *Holstein*) a jerseykého (J, *Jersey*) plemene, a u první generace kříženek holštýnského a jerseykého (CB, *crossbreds*) plemene. Laktaci rozdělili do čtyř

období – 5, 95, 185 a 275 DIM. Z výsledků studie vyplynulo, že v případě H a CB bylo zastoupení VA a ALA vyšší v prvním období laktace (5 DIM) a v dalších obdobích (95, 185 a 275 DIM) spíše klesalo. Hodnoty CLA pak stadiem laktace ovlivněny téměř nebyly.

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

Rozdíly v zastoupení FA jsou rovněž závislé na druhu zvířat (viz kapitola 4.1.1 – Kala *a kol.*, 2016a). V této studii jsme se zaměřili na porovnání zastoupení FA v mléčném tuku u dvou plemen dojnic a dvou plemen koz, a na vzájemné porovnání obou druhů mléčného tuku. Z výsledků vyplynulo, že zatímco mezi plemeny dojnic nebyly v zastoupení FA zjištěny statisticky významné rozdíly, v případě koz byl vliv plemene potvrzen pro ALA ($P < 0,01$), VA ($P < 0,001$) a nenasycených FA (UFA, *unsaturated fatty acids*; $P < 0,01$). Ze srovnání dojnic a koz vyplynulo, že v porovnání s dojnicemi bylo v mléčném tuku koz zjištěno nižší zastoupení C16:0, vyšší zastoupení kyseliny linolové (LA, *linoleic acid*) a ALA a výrazně vyšší zastoupení těkavých FA (VFA, *volatile fatty acids*). Tyto výsledky potvrdili také Barłowska *a kol.* (2011).

4.2. Polymorfismus genů souvisejících s obsahem a složením mléčného tuku

4.2.1. Publikace vztahující se k danému tématu

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

Hanusová, L., Čítek, J., Samková, E., Kala, R., Křížová, Z., Hanuš, O. 2018. Frekvence polymorfismů v genech *DGAT1*, *FASN*, *LEP* a *SCD1* v dojené populaci skotu v České republice. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 170, 29(5): 31-34.

Čítek, J., Hanuš, O., Večerek, L., Samková, E., Hanusová, L., Křížová, Z., Jelínková, I., Kala, R. 2018a.

Certifikovaná metodika QJ1510339 CM 181 – Izolace bovinní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a Svazem výrobců mléka a.s. z 24. 9. 2018.* Datum certifikace: 8. 10. 2018.

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

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

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

4.2.2. Komentář k problematice

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

Dílčím cílem disertační práce bylo zjistit výskyt polymorfismu v lokusech souvisejících s biosyntézou mléčného tuku a FA u dojnic českého strakatého a holštýnského skotu. Disertační práce byla původně zaměřena především na geny diacylglycerol acyltransferázu 1 (*DGATI*, *diacylglycerol acyltransferase 1*) a *SCD1*, v průběhu jejího zpracování však byla rozšířena i o sledování výskytu polymorfismu dalších genů souvisejících s mléčným tukem, a to syntázu mastných kyselin (*FASN*, *fatty acid synthase*) a leptin (*LEP*, *leptin*).

Také v této části disertační práce byla problematika zpracována rešeršní formou (viz kapitola 4.2.1 – Kala *a kol.*, 2016b; Hanuš *a kol.*, 2018) a výsledky jsou zpracované ve vědeckých publikacích (viz kapitola 4.2.1 – Kala *a kol.*, 2017; Hanusová *a kol.*, 2018).

Rešeršní práce byly mj. zaměřeny na výskyt polymorfismu kandidátních genů ve vztahu k FA mléčného tuku a obsahují stručné shrnutí významných genů (*DGATI*, *SCD1*, *FASN*, *LEP*) včetně jejich souvislostí k ukazatelům mléčné užitkovosti, případně k jednotlivým FA. Následující text, získaný studiem literatury vztahující se k tomuto tématu, je doplněním problematiky, především s ohledem na obsah a složení mléčného tuku.

Mutace K232A v genu *DGATI* je odpovědná za variabilitu profilu FA na úrovni 50 %

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

SCDI je dalším genem, který ovlivňuje složení mléčného tuku a má významný vliv na profil FA, např. má hlavní roli při syntéze MUFA. Kgwatalala *a kol.* (2009b) prokázali, že alela *A* v polymorfismu A293V u genu *SCDI* pozitivně ovlivňuje C10:0, C12:0 a kyselinu myristovou (C14:0, *myristic acid*) u kanadského jerseykého plemene. Autoři uvádějí, že polymorfismus A293V může být použit jako genetický marker při selekci plemene jersey se zaměřením na C10:0, C12:0 a C14:0. Bouwman *a kol.* (2011) zjistili podobnou spojitost mezi vyšším zastoupením C10:0, C12:0 a C14:0 a alelou *A* u holandského holštýnského plemene.

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

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

Polymorfismus genů *DGATI*, *SCDI*, *FASN* a *LEP* byl v rámci této disertační práce zkoumán nejen z pohledu genotypových a alelových frekvencí, ale také s ohledem na vliv polymorfních variant těchto genů na ukazatele mléčné užitkovosti u dojnic na první laktaci.

V první publikaci (Kala *a kol.*, 2017) jsme se nejdříve zaměřili na analýzu genetické

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

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

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

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

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

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

Dílčím cílem bylo rovněž zjistit možnosti izolace bovinní genomové DNA z mléka (viz kapitola 4.2.1 – Čítek *a kol.*, 2018a). Dosud byla DNA izolována většinou z krve, popř. býčího spermatu, méně často pak z tkání (např. svalová). Záměrem bylo izolovat DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků. Z našich výsledků vyplynulo, že izolace DNA ze vzorků mléka je možná. Metodika uvádí několik postupů, např. izolaci DNA pomocí chelexu.

Předešlý dílčí cíl zabývající se možnostmi izolace DNA z mléka plynule navazuje na studium genetického polymorfismu ve vztahu ke kvalitě kravského mléka (viz kapitola 4.2.1 – Čítek *a kol.*, 2018b). Genotypizace prováděná na genové úrovni pomocí metod molekulární genetiky je popsána u genů, jimiž se disertační práce zabývá – *DGAT1* a *SCD1*. Rovněž je popsána genotypizace genů *LEP* a 1-acylglycerol-3-fosfát acyltransferázy 6 (*AGPAT6*, *1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase 6*) Podkladem pro optimalizaci metod byly studie Wintera *a kol.* (2002) v případě *DGAT1* a Inostrozy *a kol.* (2013) v případě genu *SCD1*.

4.3. Metody stanovení mastných kyselin mléčného tuku

4.3.1. Publikace vztahující se k danému tématu

- Kala, R.**, Samková, E., Pecová, L., Hanuš, O., Sekmokas, K., Riaukienė, D. 2018b. An overview of determination of milk fat: Development, quality control measures and application. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 105, 66(4): 1055-1064.
- Samková, E., **Kala, R.**, Hasoňová, L., Pecová, L., Hanuš, O. 2018b. Využití rutinního stanovení mastných kyselin při odhadu heritability. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 168, 29(3): 13-16.
- Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Klimešová, M., Hasoňová, L., Jedelská, R., Trávníček, J., Kopecký, J., **Kala, R.**, Elich, O. 2017. Certifikovaná metodika QJ1510336 RO1417 CM 35 – Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Českomoravskou společností chovatelů a.s. z 27. 9. 2017*. Datum certifikace: 22. 12. 2017.
- Hanuš, O., Samková, E., Špička, J., Hasoňová, L., **Kala, R.**, Klímová, Z., Kopunecz, P., Kopecký, J. 2015. Porovnání metod používaných při stanovení zastoupení zdravotně významných mastných kyselin

mléčného tuku v bazénových vzorcích mléka dojníc. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 151, 26: 12-15.

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

4.3.2. Komentář k problematice

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

V publikaci typu review (viz kapitola 4.3.1 – Kala *a kol.*, 2018b) bylo naším záměrem zpracovat přehled současných metod využívaných pro stanovení mléčného tuku, jejich vývoj a možnosti aplikace. Průzkumem bylo zjištěno, že rutinní metody je možné využít pro stanovení mléčného tuku s velmi dobrými výsledky. Ty mohou být ověřeny metodami referenčními. Stanovením mléčného tuku, popř. stanovením FA se zabývali také např. Brondz (2002) či Karoui a de Baerdemaeker (2007).

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

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

V rámci disertační práce jsme provedli porovnání obou metod, a to jak u bazénových vzorků, tak u individuálních vzorků mléka. Dílčí výsledky byly publikovány již v roce 2015 (viz kapitola 4.3.1 – Hanuš *a kol.*, 2015; Samková *a kol.*, 2015).

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

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

Databáze výše uvedených výsledků z referenční a rutinní analýzy byla v průběhu dalších let rozšířena a její vyhodnocení se stalo součástí certifikované metodiky (viz kapitola 4.3.1 – Samková *a kol.*, 2017). Závěry této certifikované metodiky prakticky korespondují se závěry obou pilotních studií. Hodnota R^2 byla v případě bazénových vzorků nejvyšší u skupiny SFA, nejnižší pak u skupiny MUFA (51,4 %, resp. 35,3 %; $P < 0,001$). Hodnota R^2 u skupiny PUFA byla 39,4 % ($P < 0,001$). U individuálních vzorků byly nejvyšší hodnoty zjištěny rovněž u SFA, nejnižší však u PUFA (73,8 %, resp. 11,0 %; $P < 0,001$). U skupiny MUFA byla zjištěna hodnota R^2 57,5 % ($P < 0,001$).

Jedním z praktických využití stanovení FA pomocí MIR by mohly být odhady heritability pro jednotlivé FA (viz kapitola 4.3.1 – Samková *a kol.*, 2018b). Z provedené metaanalýzy, do níž bylo zahrnuto 8 studií odhadu heritability FA stanovených metodou GC, metodou MIR či kombinací obou metod vyplynulo, že hodnoty heritability byly vyšší u metody MIR. Závěry potvrzují Poulsen *a kol.* (2014), kteří pro stanovení FA využili obě metody.

5. ZÁVĚRY

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

Z uvedených studií vyplývají následující závěry:

- Výsledky potvrdily, že zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku se mění v závislosti na biologických faktorech, a to s různou mírou intenzity. Významnou roli hrála především variabilita uvnitř plemene a stadium laktace. Uvedené poznatky je možné využít při výběru mléka se specifickým profilem mastných kyselin (např. vyšší zastoupení nutričně prospěšných mastných kyselin). V tomto případě by se však jednalo spíše o menší chovy.
- U dojnic českého strakatého a holštýnského skotu byly zjištěny četnosti polymorfních variant genů *DGATI*, *FASN*, *LEP* a *SCD1*, které souvisejí s biosyntézou mléčného tuku a mastných kyselin. Homozygotní genotypy s převahou dominantních alel *A*, *G* a *M* byly potvrzeny u genů *DGATI*, *FASN* a *LEP*. V případě *SCD1* byl jak u českého strakatého, tak holštýnského plemene jako nejčetnější zjištěn heterozygotní genotyp *TC* s převahou alely *C*, která je spojována s vyšším zastoupením nutričně prospěšných mononenasyčených mastných kyselin. Na základě studia problematiky lze usuzovat, že další vědecká práce v této oblasti má do budoucna potenciál, který by mohl vést ke zlepšení profilu mastných kyselin.
- V souvislosti s ukazateli mléčné užitkovosti byl vyhodnocen vztah polymorfismu genů *DGATI*, *FASN*, *LEP* a *SCD1*. Byla potvrzena souvislost mezi produkcí tuku (kg) a geny *DGATI* a *SCD1*. Zjištěné výsledky mohou být využity ve šlechtitelských programech pro selekci jedinců zaměřených na mléčnou produkci.
- Bylo zjištěno, že pomocí rutinní metody lze stanovovat některé skupiny mastných kyselin v individuálních i bazénových vzorcích mléka s vysokou mírou věrohodnosti. Na základě zjištěných výsledků byla připravena certifikovaná metodika "*Validate a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku*". Její součástí jsou výsledky porovnání rutinní

a referenční metody, z kterých lze usuzovat, že MIR-FT má velmi dobrou vypovídací schopnost a je vhodná pro použití v mlékárenských provozech či akreditovaných laboratořích pro analýzu mléka, jako nepřímá metoda pro stanovení mastných kyselin, resp. jejich skupin.

- Bylo zjištěno, že izolace genomové DNA z mléka je možná. Na základě zjištěných výsledků byla připravena certifikovaná metodika "*Izolace bovinní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků*". V návaznosti na metody izolace DNA z mléka byla připravena také certifikovaná metodika "*Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka*". Součástí obou metodik jsou laboratorní postupy izolace DNA a genotypizace vybraných genů souvisejících s biosyntézou mléčného tuku. Tyto laboratorní postupy jsou použitelné v laboratořích zabývajících se analýzou genetického založení skotu pomocí metod molekulární biologie.

6. SEZNAM LITERATURY

1. Abe, T., Saburi, J., Hasebe, H., Nakagawa, T., Misumi, S., Nade, T., Nakajima, H., Shoji, N., Kobayashi, M. and Kobayashi, E. 2009. Novel mutations of the *FASN* gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. *Biochemical Genetics*, 47: 397-411.
2. Aldai, N., Murray, B.E., Najera, A.I., Troy, D.J., Osoro, K. 2005. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1073-1083.
3. Asadollahpour Nanaei, H., Ansari Mahyari, S., Edriss, M.A. 2014. Effect of *LEPR*, *ABCG2* and *SCD1* gene polymorphisms on reproductive traits in the Iranian Holstein cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 49: 769-774.
4. Bainbridge, M.L., Cersosimo, L.M., Wright, A.D.G., Kraft, J. 2016. Content and Composition of Branched-Chain Fatty Acids in Bovine Milk are Affected by Lactation Stage and Breed of Dairy Cow. *Plos One*, 11: 3.
5. Barłowska, J., Sz wajkowska, M., Litwińczuk, Z., Król, J. 2011. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 291-302.
6. Bastin, C., Gengler, N., Soyeurt, H. 2011. Phenotypic and genetic variability of production traits and milk fatty acid contents across days in milk for Walloon Holstein first parity cows. *Journal of Dairy Science*, 94: 4152-4163.
7. Bhuiyan, M.S.A., Yu, S.L., Jeon, J.T., Yoon, D., Cho, Y.M., Park, E.W., Kim, N.K., Kim, K.S., Lee, J.H. 2009. DNA Polymorphisms in *SREBF1* and *FASN* Genes Affect Fatty Acid Composition in Korean Cattle (Hanwoo). *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 22: 765-773.
8. Bilal, G., Cue, R.I., Mustafa, A.F., Hayes, J.F. 2014. Effects of parity, age at calving and stage of lactation on fatty acid composition of milk in Canadian Holsteins. *Canadian Journal of Animal Science*, 94: 401-410.
9. Block, S.S., Smith, J.M., Ehrhardt, R.A., Diaz, M.C., Rhoads, R.P., van Amburgh, M.E., Boisclair, Y.R. 2003. Nutritional and developmental regulation of plasma leptin in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 86: 3206-3214.
10. Blott, S., Kim, J.J., Moisisio, S., Schmidt-Küntzel, A., Cornet, A., Berzi, P., Cambisano, N., Ford, C., Grisart, B., Johnson, D., Karim, L., Simon, P., Snell, R., Spelman, R., Wong, J., Vilkki, J., Georges, M., Farnir, F., Coppieters, W. 2003. Molecular dissection of a quantitative trait locus: A phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics*, 163, 253-266.
11. Bouwman, A.C., Bovenhuis, H., Visker, M.H., van Arendok, J.A. 2011. Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle. *BMC Genetics*, 12: 43.

12. Bronz, I. 2002. Review: Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 465: 1-37.
13. Buchanan, F.C., van Kessel, A.G., Waldner, C., Christensen, D.A., Laarveld, B., Schmutz, S.M. 2003. An association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *Journal of Dairy Science*, 86: 3164-3166.
14. Conte, G., Mele, M., Chessa, S., Castiglioni, B., Serra, A., Pagnacco, G., Secchiari, P. 2010. Diacylglycerol acyltransferase 1, stearoyl-CoA desaturase 1 and sterol regulatory element binding protein 1 gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Italian Brown cattle. *Journal of Dairy Science*, 93: 753-763.
15. Čítek, J., Hanuš, O., Večerek, L., Samková, E., Hanusová, L., Křížová, Z., Jelínková, I., Kala, R. 2018a. Certifikovaná metodika QJ1510339 CM 181 – Izolace bovinní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a Svazem výrobců mléka a.s. z 24. 9. 2018. Datum certifikace: 8. 10. 2018.*
16. Čítek, J., Večerek, L., Hanusová, L., Samková, E., Hanuš, O., Křížová, Z., Kávová, T., Kala, R. 2018b. Certifikovaná metodika QJ1510336 CM 1975 – Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Svazem výrobců mléka a.s. z 24. 9. 2018. Datum certifikace: 8. 10. 2018.*
17. Dvořák, L., Šustová, K., Mlček, J. 2016. Blízká infračervená spektroskopie jako pomocník při kontrole kvality potravin. *Chemické Listy*, 110: 868-873.
18. Fadzilillah, N.A., Rohman, A., Ismail, A., Mustafa, S., Khatib, A. 2013. Application of FTIR-ATR spectroscopy coupled with multivariate analysis for rapid estimation of butter adulteration. *Journal of Oleo Science*, 62: 555-562.
19. Ferrand-Calmels, M., Palhière, I., Brochard, M., Leray, O., Astruc, J.M., Aurel, M.R., Barbey, S., Bouvier, F., Brunschwig, P., Caillat, H., Douguet, M., Faucon-Lahalle, F., Gelé, M., Thomas, G., Trommenschlager, J.M., Larroque, H. 2014. Prediction of fatty acid profiles in cow, ewe, and goat milk by mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 97: 17-35.
20. Garnsworthy, P.C., Feng, S., Lock, A.L., Royal, M.D. 2010. Short communication: Heritability of milk fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase indices in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93: 1743-1748.
21. Hanusová, L., Čítek, J., Samková, E., Kala, R., Křížová, Z., Hanuš, O. 2018. Frekvence polymorfismů v genech *DGAT1*, *FASN*, *LEP* a *SCD1* v dojené populaci skotu v České republice. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 170: 31-34.
22. Hanuš, O., Samková, E., Křížová, Z., Hasoňová, L., Kala, R. 2018. Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability – A review. *Molecules*, 1636, 23: 1-32.

23. Hanuš, O., Samková, E., Špička, J., Hasoňová, L., Kala, R., Klímová, Z., Kopunecz, P., Kopecký, J. 2015. Porovnání metod používaných při stanovení zastoupení zdravotně významných mastných kyselin mléčného tuku v bazénových vzorcích mléka dojníc. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 151: 12-15.
24. Chebel, R.C., Susca, F., Santos, J.E.P. 2008. Leptin genotype is associated with lactation performance and health of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 2893-2900.
25. Inostroza, K.B., Scheuermann, E.S., Sepulveda, N.A. 2013. Stearoyl CoA desaturase and fatty acid synthase gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Chilean Black Friesian cows. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26: 263-269.
26. Jensen, R.G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85: 295-350.
27. Kadlecová, V., Němečková, D., Ječmínková, K., Stádník, L. 2014. The effect of polymorphism in the *DGAT1* gene on energy balance and milk production traits in primiparous Holstein cows during the first six months of lactation. *Bulgarian Journal of Animal Science*, 20: 219-225.
28. Kala, R., Samková, E., Čítek, J. 2016b. Selected candidate genes affecting milk fatty acids. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 19: 31-33.
29. Kala, R., Samková, E., Čítek, J., Hasoňová, L., Hanusová, L., Tothová, L. 2017. Association of selected genes with milk fat in two breeds of cattle. In: *24th International PhD Students Conference MendelNet 2017*. Brno, 8-9 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 696-701. ISBN 978-80-7509-529-9
30. Kala, R., Samková, E., Hasoňová, L., Špička, J., Pelikánová, T., Křížová, Z., Hladký, J. 2016a. Proportion of important fatty acids in cow and goat milk fat. In: *23th International PhD Students Conference MendelNet 2016*. Brno, 9-10 November. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, 582-587. ISBN 978-80-7509-443-8
31. Kala, R., Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J., Hanuš, O. 2018a. Nutritionally desirable fatty acids including CLA of cow's milk fat explained by animal and feed factors. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66: 69-76.
32. Kala, R., Samková, E., Pecová, L., Hanuš, O., Sekmokas, K., Riaukienė, D. 2018b. An overview of determination of milk fat: Development, quality control measures and application. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 105, 66: 1055-1064.
33. Kamal, M., Karoui, R. 2015. Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46: 27-48.
34. Karoui, R., de Baerdemaeker, J. 2007. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, 102: 621-640.

35. Kay, K., Weber, W.J., Moore, C.E., Bauman, D.E., Hansen, L.B., Chester-Jones, H., Crooker, B.A., Baumgard, L.H. 2005. Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acids composition in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 88: 3886-3893.
36. Kgwatalala, P.M., Ibeagha-Awemu, E.M., Mustafa, A.F., Zhao, X. 2009a. Stearoyl-CoA desaturase 1 genotype and stage of lactation influences milk fatty acid composition of Canadian Holstein cows. *Animal Genetics*, 40: 609-615.
37. Kgwatalala, P.M., Ibeagha-Awemu, E.M., Mustafa, A.F., Zhao, X. 2009b. Influence of stearyl-coenzyme A desaturase 1 genotype and stage of lactation on fatty acid composition of Canadian Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 92: 1220-1228.
38. Kirchnerová, K., Foltys, V., Špička, J. 2013. Impact of lactation stage on milk fat fatty acids profile in grazing dairy cows. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2: 1164-1174.
39. Komisarek, J., Dorynek, Z. 2009. Effect of *ABCG2*, *PPARGC1A*, *OLR1* and *SCD1* gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics*, 50: 125-132.
40. Kulig, H., Kmiec, M., Kowalewska-Luczak, I., Andziak, G. 2009. Effect of leptin gene polymorphisms on milk production traits of Jersey cows. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 33: 143-146.
41. Mele, M., Dal Zotto, R., Cassandro, M., Conte, G., Serra, A., Buccioni, A., Bittante, G., Secchiari, P. 2009. Genetic parameters for conjugated linoleic acid, selected milk fatty acids, and milk fatty acid unsaturation of Italian Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 92: 392-400.
42. Miglior, F., Muir, B.L., van Doormaal, B.J. 2005. Selection indices in Holstein cattle of various countries. *Journal of Dairy Science*, 88: 1255-1263.
43. Milanesi, E., Nicoloso, L., Crepaldi, P. 2008. Stearoyl CoA desaturase (*SCD*) gene polymorphisms in Italian cattle breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125: 63-67.
44. Molee, A., Duanghaklang, N., Na-Lampang, P. 2012. Effects of acyl-CoA:diacylglycerol acyl transferase 1 (*DGATI*) gene on milk production traits in crossbred Holstein dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 44: 751-755.
45. Morris, C.A., Cullen, N.G., Glass, B.C., Hyndman, D.L., Manley, T.R., Hickey, S.M., McEwan, J.C., Pitchford, W.S., Bottema, C.D., Lee, M.A. 2007. Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. *Mammalian Genome*, 18: 64-74.
46. Palmquist, D.L. 2006. *Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon*. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (eds.). *Advanced Dairy Chemistry: Lipids. Volume 2*. 3. vydání. New York: Springer, s. 43-92. ISBN 978-0-387-28813-0
47. Palmquist, D.L., Beaulieu, A.D., Barbano, D.M. 1993. Feed and animal factors influencing milk-fat composition. *Journal of Dairy Science*, 76: 1753-1771.

48. Pešek, M., Špička, J., Samková, E. 2005. Comparison of fatty acid composition in milk fat of Czech Pied cattle and Holstein cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 50: 122-128.
49. Poulsen, N.A., Eskildsen, C.E.A., Skov, T., Larsen, L.B., Buitenhuis, A.J. 2014. Comparison of genetic parameters estimation of fatty acids from gas chromatography and FT-IR in Holsteins. In: *Proceedings of the 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*. Vancouver, 17-22 August. Canada: ASAS, 1-3.
50. Pujolras, M.P., Ayvaz, H., Shotts, M.L., Pittman Jr., R.A., Herringshaw, S., Rodriguez-Saona, L.E. 2015. Portable Infrared Spectrometer to Characterize and Differentiate Between Organic and Conventional Bovine Butter. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92: 175-184.
51. Roy, R., Gautier, M., Hayes, H., Laurent, P., Osta, R. 2001. Assignment of the fatty acid synthase (*FASN*) gene to bovine chromosome 19 (19q22) by *in situ* hybridization and confirmation by somatic cell hybrid mapping. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 93:141-142.
52. Roy, R., Ordovas, L., Zaragoza, P., Romero, A., Moreno, C., Altarriba, J., Rodellar, C. 2006. Association of polymorphisms in the bovine *FASN* gene with milk fat content. *Animal Genetics*, 37: 215-218.
53. Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Kala, R., Koubová, J., Smetana, P., Hasoňová, L., Křížová, Z., Klímová, Z., Kopunecz, P., Kopecký, J. 2015. Porovnání metod stanovení mastných kyselin v mléce. *Náš chov*, 75: 74-76.
54. Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Klimešová, M., Hasoňová, L., Jedelská, R., Trávníček, J., Kopecký, J., Kala, R., Elich, O. 2017. Certifikovaná metodika QJ1510336 RO1417 CM 35 – Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku. *Tato CM je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Českomoravskou společností chovatelů a.s. z 27. 9. 2017. Datum certifikace: 22. 12. 2017.*
55. Samková, E., Kala, R., Hasoňová, L., Pecová, L., Hanuš, O. 2018b. Využití rutinního stanovení mastných kyselin při odhadu heritability. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 168, 29: 13-16.
56. Samková, E., Koubová, J., Hasoňová, L., Hanuš, O., Kala, R., Kváč, M., Pelikánová, T., Špička, J. 2018a. Joint effects of breed, parity, month of lactation, and cow individuality on the milk fatty acids composition. *Mljekarstvo*, 68: 98-107.
57. Schennink, A., Heck, J.M.L., Bovenhuis, H., van Visker, M.H.P.W., Valenberg, H.J.F., van Arendonk, J.A.M. 2008. Milk fatty acid unsaturation: Genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) and acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGAT1*). *Journal of Dairy Science*, 91: 2135-2143.
58. Schwendel, B.H., Wester, T.J., Morel, P.C.H., Tavendale, M.H., Deadman, C., Shadbolt, N.M., Otter, D.E. 2015. Invited review: Organic and conventionally produced milk – An evaluation of influence factors on milk composition. *Journal of Dairy Science*, 98: 721-746.

59. Soyeurt, V., Dardenne, P., Gillon, A., Croquet, C., Vanderick, S., Mayeres, P., Bertozzi, C., Gengler, N. 2006a. Variation in fatty acid content of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science*, 89: 4858-4865.
60. Stoop, W.M., Bovenhuis, H., Heck, J.M.L., van Arendonk, J.A.M. 2009a. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 92: 1469-1478.
61. Taniguchi, M., Utsugi, T., Oyama, K., Mannen, H., Kobayashi, M., Tanabe, Y., Ogino, A., Tsuji, S. 2004. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*, 15: 142-148.
62. Toušová, R., Stádník, L., Ducháček, J. 2013. Effect of season and the time of milking on spontaneous and induced lipolysis in bovine milk fat. *Czech Journal of Food Science*, 31: 20-26.
63. Useni, B.A., Muller, C.J.C., Cruywagen, C.W. 2018. Pre- and postpartum effects of starch and fat in dairy cows: A review. *South African Journal of Animal Science*, 48: 413-426.
64. van Haelst, Y.N.T., Beeckman, A., van Knegsel, A.T.M., Fievez, V. 2008. Short communication: Elevated concentrations of oleic acid and long-chain fatty acids in milk fat of multiparous subclinical ketotic cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 4683-4686.
65. Wakil, S.J. 1989. Fatty-acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*, 28: 4523-4530.
66. Winter, A., Krämer, W., Werner, F.A.O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J.E., Thaller, G., Fries, R. 2002. Association of lysine-232/alanine polymorphism in bovine gene encoding acylCoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGATI*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 9300-9305.
67. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432.