

MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA V BRNĚ

Agronomická fakulta

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



VLIV POLYMORFISMU MLÉČNÝCH PROTEINŮ NA VÝROBU SÝRŮ

Bakalářská práce

Brno 2006

Vedoucí bakalářské práce:	Vypracovala:
prof. Ing. Josef Dvořák, CSc.	Marcela Košinová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Vliv polymorfismu mléčných proteinů na výrobu sýrů“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiloženém soupisu literatury.

Souhlasím, aby práce byla uložena v knihovně Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně a zpřístupněna ke studijním účelům.

V Brně.....

Podpis diplomanta.....

ANNOTATION

Traditionally, fluid milk and other dairy products have been essential components of the human diet in a variety of cultures, mainly because of the high quality of the protein contained in milk and the variety of minerals and vitamins. Today, the dairy industry has the technological ability to produce large quantities of a broad spectrum of dairy products. However, the dairy industry continually strives to improve the quality of its products. It has long been known that the manufacturing properties of milk are influenced by the relative composition of its proteins. As an example, cheese yield is related to the casein content in milk, particularly the ratio of casein to total protein (casein number). This ratio is partly controlled by the different genetic variants of the polymorphic milk proteins.

However, before the genetic variability of milk proteins can be used in selection programs, it needs to be established that no unfavorable associations exist between the economically interesting milk protein alleles and other traits of importance for milk production. The size and nature of the gene effects should be firmly established because implementation of poorly defined markers in existing breeding programs is likely to do more harm than good.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1 Složení mléka.....	7
2.2 Mléčné proteiny.....	8
2.3 Kasein.....	10
2.3.1 α_S -kaseiny.....	11
2.3.2 β -kasein.....	11
2.3.3 κ -kasein.....	13
2.3.4 Kaseinové micely.....	14
2.3.4.1 Složení a vlastnosti kaseinových micel.....	16
2.4 Syrovátkové bílkoviny.....	17
2.4.1 β -laktoglobulin.....	17
2.4.2 α -laktalbumin.....	18
2.4.3 Imunoglobuliny.....	19
2.4.4 Sérový albumin.....	20
2.4.5 Proteoso-pepton.....	20
2.5 Vlivy působící na množství a složení bílkovin mléka.....	20
2.6 Polymorfismus mléčných proteinů.....	21
2.6.1 Vliv polymorfismu mléčných proteinů na produkci mléka.....	23
2.6.1.1 Vliv polymorfismu κ -kaseinu.....	23
2.6.1.2 Vliv polymorfismu β -laktoglobulinu.....	24
2.6.1.3 Vliv polymorfismu β -kaseinu.....	25
2.6.1.4 Vliv polymorfismu α_{S1} -kaseinu.....	26
2.6.2 Vliv polymorfismu mléčných proteinů na výrobu sýrů.....	27
2.6.2.1 Vliv polymorfismu κ -kaseinu.....	28
2.6.2.2 Vliv polymorfismu β -kaseinu a α_{S1} -kaseinu.....	29
2.6.2.3 Vliv polymorfismu β -laktoglobulinu.....	30
2.6.3 Polymorfismus bílkovin mléka a selekční programy.....	30
2.6.4 Využití selekčních programů v chovu skotu.....	31
3. ZÁVĚR	32

4. LITERATURA.....	33
5. PŘÍLOHY.....	35

1. ÚVOD

Mléko a mléčné výrobky jsou součástí výživy člověka již od domestikace zvířat. Záhy bylo kyselé mléko zpracováváno na tvaroh, později na kyselé sýry a vyráběno máslo. Předpoklady pro průmyslové zpracování nastaly v 19. století v době zvýšené produkce mléka, která stačila pokrýt nejen vlastní potřebu zemědělců, ale vytvářely se přebytky mléka. Ke zprůmyslnění výroby přispěly nové vědecké a technické poznatky. V oblasti chemie a biologie to byly Pasteurovy objevy, které daly základy pasteraci a sterilaci mléka, rozvoji mikrobiologie, použití čistých kultur v mlékařství, studia mikroorganismů v mléčných výrobcích atd.

Výroba sýru je nejstarším odvětvím zpracování mléka. Patří také mezi technologicky nejnáročnější. V principu se jedná o koncentraci mléčných bílkovin, které společně s tukem a minerálními látkami jsou nejpodstatnějšími složkami sušiny sýrů.

Sýry jsou z nutričního hlediska plnohodnotnými výrobky obsahující esenciální aminokyseliny. Zdrojem využitelné energie jsou bílkoviny a mléčný tuk. Laktóza z mléka je zcela převedena na kyselinu mléčnou a další produkty kvašení. Velký význam má obsah vápníku ve výrobcích, což je závislé na technologii výroby jednotlivých skupin sýrů. S obsahem vápníku souvisí i obsah fosforu v sýrech. U tučných sýrů je přítomen vitamín A a D, u všech druhů sýrů pak vitamíny skupiny B. 100 g tvrdého sýra stačí na pokrytí denní potřeby vápníku, aminokyselin a uhradí polovinu denní dávky fosforu. Sýry jsou bohatší na bílkoviny než maso a zejména masné výrobky.

V současné době spotřeba tekutého mléka klesá a zvyšuje se spotřeba mléčných, zejména zakysaných výrobků a sýrů. Tím dochází i ke zvyšování nároků na kvalitu výrobků. Na výrobu sýrů je tedy potřeba kvalitní mléko od zdravých dojnic s vyšším obsahem bílkovin, kratší dobou sýření a vykazující co nejlepší jakost sýřeniny.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Složení mléka

Mléko je sekret mléčné žlázy savců, určený k výživě a ochraně mláďat. Obsahuje v dostatečném množství a optimálně vyváženém poměru všechny výživné a esenciální látky, které jsou nezbytné pro normální vývoj novorozenců. Vedle bílkovin, mléčného tuku a laktosy obsahuje mléko také imunoglobuliny, vitamíny, enzymy, hormony, minerální látky, dusíkaté látky nebílkovinné povahy, barviva a další látky, viz. **tab. č.1**.

Mléko je velmi komplikovaný disperzní systém, ve kterém kaseinové molekuly tvoří micelární disperze, globulární bílkoviny syrovátky koloidní disperze, tuk přítomný ve formě tukových kapek tvoří emulzi a nízkomolekulární látky (laktosa, minerální látky aj.) tvoří pravý roztok (VELÍŠEK 2002).

Průměrný obsah sušiny kravského mléka činí 12,5 %, na vodu pak připadá 87,5 %. Průměrný obsah tuku je 3,9 %, bílkovin 3,2 %, laktosy 4,7 % a minerálních látek 0,7 %. Obsah jednotlivých složek mléka podléhá působení mnoha vlivů z nichž plemenná příslušnost, stáří zvířete, stádium laktace, podmínky chovu, genové založení a zdravotní stav jsou ty nejvýznamnější.

Z nutričního hlediska jsou z nejcennějších složek mléka mléčné bílkoviny, které mají i charakteristické imunologické vlastnosti. Předností mléčných bílkovin je jejich vysoká biologická hodnota, která je dána obsahem velkého množství exogenních esenciálních aminokyselin. Kravské mléko obsahuje všech 14 esenciálních minerálních látek nutných pro výživu člověka. Mléko a mléčné výrobky jsou vynikajícím zdrojem vápníku a dobrým zdrojem fosforu.

Mléko obsahuje také všechny vitamíny, které jsou potřebné pro zdraví člověka a které se mají nacházet ve správné výživě. Mléko je z hlediska krytí potřeb lidského organismu výborným zdrojem vitamínu A, dobrým zdrojem ve vodě rozpustného vitamínu B₂ a zajišťuje i dostatečný přísun dalších vitamínů ze skupiny B. Mléko je poměrně chudé na vitamín C (GAJDŮŠEK, KLÍČNÍK 1993).

Tabulka č. 1 Složení 1 litru kravského mléka (ANONYM 2006)

1. Voda	860-880 g
2. Látky v emulzním stavu	
- mléčný tuk (směs TAG)	30-45 g
- fosfatidy	0,3 g
- steriny	0,1 g
- glyceridy	0,15-0,22 g
- vitaminy rozpustné v tucích	
- vitamin A	0,1-0,5 mg
- provitamin A (karoteny)	0,1-0,6 mg
- vitamin D	0,4 µg
- vitamin E	1,0 mg
3. Látky v koloidním stavu	
- kasein	28-32 g
- α-kasein	10,3 g
- β-kasein	9,1 g
- κ-kasein	3,9 g
- albuminy	5,2 g
- globuliny	0,8 g
- enzymy	
4. Látky v pravém roztoku	
- laktosa	47-48 g
- kationty	
- vápník	1,25 g
- hořčík, sodík, draslík	2,1 g
- anionty	
- fosforečnany, fosfáty, Cl ⁻	5,3 g
- vitaminy rozpustné ve vodě	
- vitamin B1	0,4 mg
- vitamin B2	1,3 mg
- vitamin B6	7 µg
- vitamin B12	0,7 mg
- vitamin C	20 mg
- nebílkovinné dusíkaté látky	
- plyny	
5. Stopové množství kovů	

2.2 Mléčné proteiny

Asi 95 % dusíku v mléce je ve formě proteinů. Mléčné proteiny tvoří komplikovanou směs, ze které jsou jednotlivé čisté složky těžce separovány (WALSTRA et al. 1991).

Mléčné bílkoviny kravského mléka (pokud není uvedeno jinak, je v dalším textu užíván termín „mléko“) jsou směsí dvou hlavních typů proteinů, a to **kaseinů** (tvoří zhruba 80 % z celkových mléčných proteinů) a **syrovátkových (sérových) bílkovin**, které tvoří asi 20 % z celkových proteinů mléka (VELÍŠEK 2002). Složení mléčných bílkovin uvádí **tab. č. 2.**

Tabulka č.2 Složení proteinů kravského mléka (VELÍŠEK 2002).

Proteiny	Podíl v %	Obsah v g.dm⁻³
Kaseiny celkem	80	25,6
α_S -kasein	42	13,4
β -kasein	25	8,0
γ -kasein	4	1,3
κ -kasein	9	2,9
Proteiny syrovátky celkem	20	6,4
α -laktalbumin	4	1,3
sérový albumin	1	0,3
β -laktoglobulin	9	2,9
imunoglobuliny	2	0,6
polypeptidy (proteosy, peptony)	4	1,3

V mléčné žláze je syntetizováno a dále merokrinním způsobem vylučováno šest hlavních mléčných proteinů: α_{S1} -kasein (α_{S1} -CN), α_{S2} -kasein (α_{S2} -CN), β -kasein (β -CN) a κ -kasein (κ -CN) a ze syrovátkových bílkovin β -laktoglobulin (β -LG) a α -laktalbumin (α -LA). Další proteiny přecházejí do mléka z krve – bovinní sérum albumin (SA) a imunoglobuliny (Ig). Dříve byly bílkoviny mléka klasifikovány na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli. V současnosti je kritériem rozdělení homologie jejich primární struktury.

Všechny bílkoviny mléka jsou polymorfní a bylo u nich doposud popsáno více než 30 genetických variant, lišících se sekvencí aminokyselin v důsledku substituce nebo delece aminokyselin v proteinovém řetězci. Jejich heterogenitu navíc stupňuje

o-fosforylace a o-glykosylace κ -kaseinu a částečná proteolýza plasminem. Ne všechny známé genetické varianty byly prokázány u plemen skotu (GAJDŮŠEK 2000).

Některé skupiny mléčných proteinů mohou být hydratovány, zvláště pak skupiny s nábojem a peptidové vazby. Bílkoviny obecně poutají 10-20 g vody na 100 g bílkoviny. Tato vlastnost je významná pro schopnost některých proteinů ve vodě bobtnat (WALSTRA et al. 1991).

2.3 Kasein

Kaseiny jsou definovány jako fosfoproteiny, které se při pH 4,6 (při 20 °C) vysráží z mléka. Mezi hlavní frakce kaseinů zahrnujeme α_{S1} -kasein, α_{S2} -kasein, β -kasein a κ -kasein (FARRELL et al. 2004). Jednotlivé frakce kaseinu spolu tvoří komplexy. Tyto komplexy jsou uspořádány do větších částic – micel (GAJDŮŠEK, KLÍČNÍK 1993).

Frakce kaseinu jsou syntetizovány v ribozomech endoplazmatického retikula buněk mléčné žlázy a transportovány do Golgiho aparátu, kde jsou fosforylovány (fosfor je vázán hlavně esterickou vazbou přes hydroxyl skupinu serinu a threoninu) (GAJDŮŠEK 2000).

Většina molekul κ -kaseinu je glykosylována, α_S -kasein a β -kasein jsou fosfoproteiny, které mají fosfátovou skupinu esterifikovanou serinem. V přítomnosti vápníku se α_S -kasein a β -kasein vysrážejí, κ -kasein jako jediný se v přítomnosti vápenatých iontů nevysráží. κ -kasein je nicméně snadno atakovatelný chymosinem, který jej štěpí na dvě části (para- κ -kasein a glykomakropeptid), tím κ -kasein ztrácí své ochranné vlastnosti. Následkem toho veškerý kasein precipituje v přítomnosti vápníku. Tato reakce je základem srážení mléka při výrobě sýrů.

Kasein je hydrofobní, má poměrně vysoký náboj, velké množství prolinových a málo cysteinových zbytků. Relativně vysoký náboj je potřebný k udržení kaseinu v roztoku. Vysoký náboj kaseinu je částečně způsoben fosfátovými skupinami, které jsou z velké části esterifikovány serinovými zbytky (WALSTRA et al. 1991).

2.3.1 α_S -kaseiny

Hlavní složkou kaseinové frakce mléka jsou α_S -kaseiny. V mléce se vyskytuje α_{S1} -kasein a α_{S2} -kasein. Oba typy α_S -kaseinu se v mléce vyskytují v různých genetických variantách (**tab. č. 3**) lišících se od sebe primární strukturou. Nejobvyklejší variantou v mléce je varianta B (VELÍŠEK 2002).

α_{S1} -Kasein tvoří až 40 % celkových frakcí kaseinu. Má nejvyšší náboj a nejvyšší obsah fosfátů (WALSTRA et al. 1991). V současnosti je známo osm genetických variant. α_{S1} -kaseiny obsahují ve variantě B polypeptidové řetězce složené ze 199 aminokyselin. Obsahují 8 fosfoserinových zbytků lokalizovaných převážně v polohách 43-80, díky nimž je tato část molekuly polární. Nepochární postranní řetězce aminokyselin jsou situovány v polohách 100-199. V přítomnosti vápenatých iontů tvoří α_{S1} -kasein nerozpustnou vápenatou sůl. Fragmenty α_{S1} -kaseinu se považují za λ -kasein (VELÍŠEK 2002).

α_{S2} -kasein tvoří až 10 % z celkového kaseinu mléka. Je složen z 207 aminokyselin a obsahuje 11 fosfoserylových zbytků. Existují 4 genetické varianty α_{S2} -kaseinu (A, B, C a D). α_{S2} -kasein je nejvíce hydrofilní ze všech kaseinů. Počet aniontových skupin a hydrofilní povaha se také odráží ve vlastnostech α_{S2} -kaseinu při vázání vápníku. α_{S2} -kaseiny mají podobnou strukturu jako kaseiny α_{S1} , nejsou však tak citlivé k přítomnosti vápenatých iontů (FARRELL et al. 2004).

2.3.2 β -kasein

β -kasein představuje až 45 % celkového kaseinu. Polypeptidové řetězce β -kaseinů se skládají z 209 zbytků aminokyselin. Řadí se stejně jako α_{S1} -kaseiny mezi fosfoproteiny, neboť obsahují 5 fosfoserinových zbytků v poloze 1-40. Nepochární postranní řetězce aminokyselin jsou soustředěny v polohách 136-209. S vápenatými ionty poskytují sůl rozpustnou při teplotách 1 °C a nižších, při vyšších teplotách pak sůl nerozpustnou (VELÍŠEK 2002). β -kasein je nejvíce hydrofobní ze všech kaseinů. Neobvyklé rozložení aminokyselin vede k uvolnění β -kaseinu z kaseinových micel v chladu (FARRELL et al. 2004).

Za produkty degradace β -kaseinů proteolytickými enzymy mléka jsou považovány γ -kaseiny. Odštěpením zbytku s aminokyselinami 1-28 vznikne γ_1 -kasein, γ_2 -kasein vzniká

odštěpením zbytku 1-105 a γ_3 -kasein odštěpením zbytku 1-107 (VELÍŠEK 2002). Množství γ -kaseinu ve mléce se velice liší v závislosti na stáří a udržování teploty mléka (WALSTRA et al. 1991).

Tabulka č. 3 Mléčné proteiny a některé jejich charakteristiky (FARRELL et al. 2004).

Protein	Obsah v syrovém mléce (g/l)	Genetická varianta	Molekulární hmotnost	Isoelektrický bod
α_{S1}-CN	12-15	A	22 068	4,28
		B	23 615	4,35
		C	23 542	4,38
		D	23 724	
		E	23 542	
		F, G, H		
α_{S2}-CN	3-4	A	25 226	4,98
		B, C, D		
β-CN	9-11	A ¹	24 023	4,82
		A ²	23 983	4,72
		A ³	23 974	4,62
		B	24 092	4,95
		C	23 944	5,13
		D	23 944	
		E	23 982	
		F, G, H ¹ , H ² , I		
κ-CN	2-4	A	19 037	5,62
		B	19 006	5,83
		C, E, F ¹ , F ² , G ¹ , G ² , H, I, J		
β-LG	2-4	A	18 363	4,77
		B	18 277	4,85
		C	18 286	4,95
		D	18 276	
		E	18 205	
		F	18 243	
		G	18 233	
		H, I, J, W		
α-LA	0,6-1,7	A	14 147	
		B	14 178	4,76
		C		

Tabulka č. 4 Vlastnosti některých mléčných proteinů (WALSTRA et al. 1991).

	Molekulární hmotnost	Počet AK	Fosfoserylové zbytky	cystein	-S-S-	Ca-senzitivní
α_{S1} -CN (B)	23 614	199	8	0	0	++
α_{S2} -CN (A)	25 230	207	11	2	1	++
β -CN (A ²)	23 983	209	5	0	0	+
κ -CN (A)	19 023 ¹	169	1	2	-	-
β -LG (B)	18 283	162	5	5	2	-
α -LA (B)	14 176	123	8	8	4	-
SA	66 267	582	35	35	17	-

¹ bez sacharidu

2.3.3 κ -kasein

Ve dvou běžných genetických variantách A a B se ve mléce vyskytují κ -kaseiny (kromě κ -CN A a κ -CN B jsou v mléce přítomny ještě další genetické varianty κ -CN, které jsou uvedeny v **tab. č. 3**). Molekula běžnější varianty B se skládá ze 169 zbytků aminokyselin. Molekuly κ -kaseinu se vyskytují jako trimetry a vyšší oligomery spojené vzájemně disulfidovými vazbami. Na rozdíl od předchozích kaseinů jsou v molekulách κ -kaseinů přítomny sacharidy D-galaktopyranosa, N-acetyl-D-galaktosamin a N-acetylneuraminová kyselina.

Hlavní složkou κ -kaseinů (56,0 %) je rozvětvený tetrasacharid v menším množství se vyskytují κ -kaseiny s vázaným rozvětveným trisacharidem (18,5 %), s lineárním trisacharidem (18,4 %), disacharidem (6,3 %) a N-acetyl-D-galaktosaminem (0,8 %). Sacharidy jsou na protein (na threonin s pořadovým číslem 133) vázány glykosidovou vazbou prostřednictvím N-acetyl- β -D-galaktosaminu. S vápenatými ionty tvoří κ -kaseiny rozpustné soli stabilizující α_{S1} -kasein a β -kasein v mléce v přítomnosti vápenatých iontů.

Působením enzymu chymosinu na molekulu κ -kaseinu dochází ke specifické hydrolýze κ -kaseinu a to téměř výhradně v určité peptidové vazbě (mezi Phe 105 a Met 106), molekula se rozštěpí na dvě části: **para- κ -kaseinu** a **κ -kaseinmakropeptid**. Vzniklý para- κ -kasein (protein složený z 105 aminokyselin) obsahuje hydrofobní část molekuly

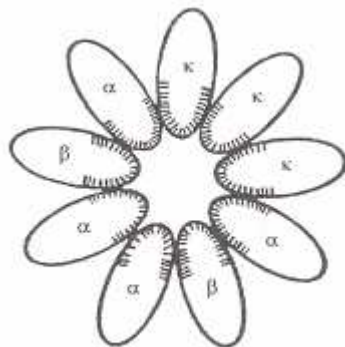
κ -kaseinu. Zůstává proto součástí kaseinových micel, ale na rozdíl od nativního κ -kaseinu zde již nemá ochrannou funkci. Mezi micelami vznikají silné vazby a za účasti vápenatých iontů dojde k vysrážení kaseinů. Zbytek molekuly κ -kaseinmakropeptid je glykopeptid složený ze 64 zbytků aminokyselin. Obsahuje hydrofilní část molekuly κ -kaseinu s vázanými oligosacharidy, a proto přechází do syrovátky (VELÍŠEK 2002).

κ -kasein je velice odlišný od ostatních druhů kaseinů. Má dva cysteinové zbytky, které mohou tvořit mezimolekulové disulfidové vazby. Následkem toho κ -kasein je ve mléce přítomen jako oligomer obsahující 5-11 monomerů. Kolem dvou třetin molekul κ -kaseinu obsahuje sacharidovou skupinu (WALSTRA et al. 1991).

2.3.4 Kaseinové micely

Kaseiny nejsou v mléce ve formě monomerů, ale jsou agregovány do kaseinových komplexů a micel. Kaseiny β - a γ - při teplotě okolo 20 °C snadno asociují do polymerních struktur, naopak při teplotách nižších než 8 °C zpětně disociují na monomery. K agregaci molekul α_s -, β - a κ -kaseinů do sférických částic zvaných micely dochází při teplotách vyšších než 5 °C.

Molekuly α_s -, β - a κ -kaseinů jsou uspořádány nejprve do tzv. submicel tvaru rotačního elipsoidu po 25 molekulách, viz. **obr. č. 1** (VELÍŠEK 2002).

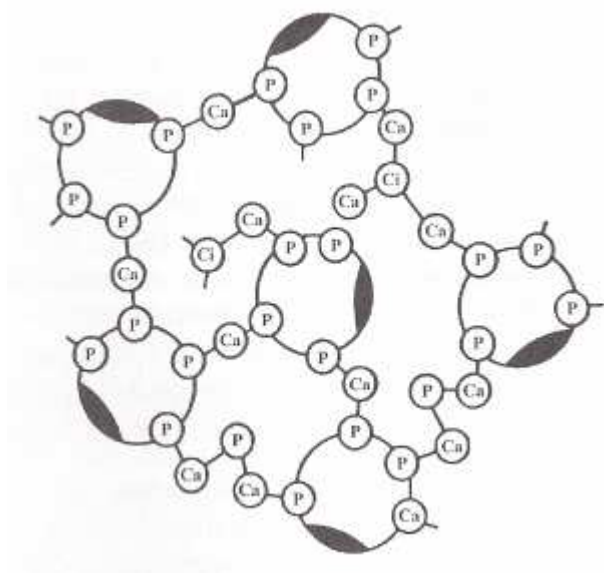


Obrázek č.1 Příčný řez typickou submicelou (čárkovaně jsou vyznačeny hydrofobní části molekul) (VELÍŠEK 2002).

Ne všechny submicely mají stejné složení. V podstatě jsou dva hlavní typy submicel, s a bez (nebo malým množstvím) κ -kaseinu. To, že existují dva typy submicel není překvapující vzhledem k tomu, že submicely obsahují nanejvýš 25 molekul bílkovin, poměr molekul $\alpha_{S1} : \alpha_{S2} : (\beta+\gamma) : \kappa \approx 4 : 1 : 4 : 1,6$ a také proto, že κ -kasein existuje ve mléce jako polymer, průměrně skládající se ze 6 molekul, které jsou navzájem spojeny disulfidovými vazbami (WALSTRA et al. 1991).

Nepolární části jednotlivých molekul jsou orientovány do centra submicely, kde se uplatňují hydrofobní interakce. Polární části molekul kaseinů, tzv. fosfoserinové zbytky molekul α_S - a β -kaseinů a threoninový zbytek s vázanými oligosacharidy v molekule κ -kaseinu, integrují s vápenatými ionty a vodou.

Jednotlivé submicely se vzájemně spojují do micel prostřednictvím fosfátových (fosfoserinových) skupin α_S - a β -kaseinů (κ -kasein nemá v molekule vazebnou oblast) a vápenatých iontů buď přímo nebo prostřednictvím volných fosfátů a citrátů (VELÍŠEK 2002). Vzájemné spojení submicel prostřednictvím fosfátů, vápenatých iontů a citrátů je znázorněno na **obr. č. 2**.



Obrázek č. 2 Vzájemné spojení submicel prostřednictvím fosfátů (P), vápenatých iontů (Ca) a citrátů (Ci); plně je vyznačena ne vazebná oblast s molekulami κ -kaseinu (VELÍŠEK 2002).

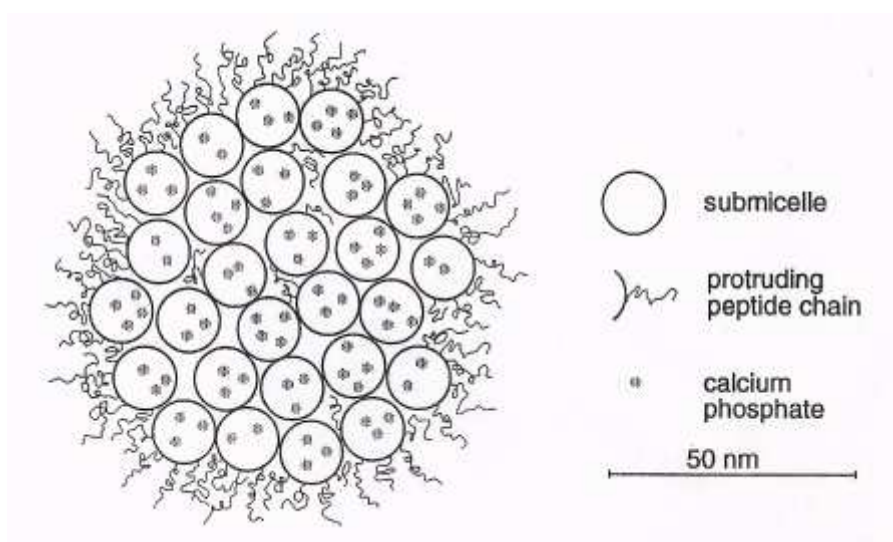
2.3.4.1 Složení a vlastnosti kaseinových micel

Typická micela kravského mléka obsahuje asi 20 000 molekul kaseinů. Příčný řez kaseinovou micelou je zobrazen na **obr. č. 3**. Micelu tvoří zhruba z 93 % kaseiny, asi 3 % hmotnosti je vápenatých iontů, 3 % anorganického (volného) fosfátu, 2 % fosfátu vázaného jako fosfoserin, 0,4 % citrátu a do 0,5 % bývá sodných, draselných a hořečnatých iontů (VELÍŠEK 2002).

Povrchová vrstva kaseinové micely, tenká 5-10 nm, je bohatá na κ -kasein, který svojí hydrofilní povahou a záporným nábojem stabilizuje ostatní hydrofobní frakce kaseinu proti vysrážení Ca^{2+} ionty. Jádro je tvořeno převážně hydrofobními frakcemi α - a β -kaseinu a vápenatými a fosforečnatými ionty (GAJDŮŠEK 2000).

Průměr vzniklých micel se pohybuje mezi 50-300 nm, nejvíce bývá micel o průměru 150 nm. Jejich velikost závisí na obsahu α_s - a κ -kaseinu. Nejmenší částice obsahují asi 50 % molekul α -kaseinu a 15 % κ -kaseinu, zatímco největší částice obsahují kolem 42 % α -kaseinu, 26 % κ -kaseinu a obsah β -kaseinu je zhruba 30 %. Počet micel bývá asi $1 \cdot 10^{12}$ v 1 ml mléka (VELÍŠEK 2002).

Micely nejsou všechny stejné. Složení proteinů je také variabilní. Zejména podíl κ -kaseinu se mění (WALSTRA et al. 1991).



Obrázek č. 3 Příčný řez kaseinovou micelou (WALSTRA et al. 1991).

Během skladování mléka se kaseinové micely mění, i když jen velice pomalu. Hlavní změnou je pravděpodobně proteolýza β -kaseinu. Působením plasminu se β -kasein štěpí na γ -kasein a proteoso-pepton.

To, že kaseiny nejsou ve mléce přítomny v roztoku, ale v micelách má významný vliv na vlastnosti mléka. Velikost kaseinových micel určuje fyzikální stabilitu mléčných produktů např. během tepelného zpracování. Jejich funkce je nezbytná v prvním stupni výroby sýrů. Micely významně ovlivňují reologické vlastnosti mléka při srážení (WALSTRA et al. 1991).

2.4 Syrovátkové bílkoviny

Po vysrážení kaseinu z mléka zůstávají v mléčném séru syrovátkové bílkoviny. Představují asi 17-20 % z celkových bílkovin mléka. Do skupiny syrovátkových bílkovin řadíme β -laktoglobulin, α -laktalbumin, imunoglobuliny a sérový albumin.

Syrovátkové bílkoviny denaturují při zahřevu do 100 °C. Při okyselení na pH 4,6 zůstávají v roztoku, teprve až po denaturaci teplem se sráží. Pro svůj vysoký obsah cysteinu mají syrovátkové bílkoviny vyšší nutriční hodnotu než frakce kaseinu (GAJDŮŠEK, KLÍČNÍK 1993). Bílkoviny syrovátky řadíme mezi globulární bílkoviny, které jsou relativně vysoce hydrofobní (WALSTRA et al. 1991).

2.4.1 β -laktoglobulin

Syrovátkové (sérové) proteiny tvoří asi z 50 % globulární protein β -laktoglobulin. Z celkových bílkovin mléka pak představuje 7-12 %. Jeho polypeptidový řetězec je tvořen 162 aminokyselinami. Při zahřevu (také v přítomnosti vysokých koncentrací vápenatých iontů a v prostředí o pH > 8,6) nevratně denaturuje. Termicky částečně denaturovaný protein reaguje prostřednictvím zpřístupněné jediné thiolové skupiny s dalšími mléčnými proteiny (κ -kaseinem a α -laktalbuminem) za vzniku dimerů spojených disulfidovou vazbou (VELÍŠEK 2002).

β -laktoglobulin je velice hydrofobní podobně jako kasein, ale obsahuje neesterově vázaný fosfát a velmi malé množství prolinu. Má pouze dvě –S–S– vazby a jednu volnou sulfhydrylovou skupinu, která je velmi reaktivní. Rozpustnost silně závisí na pH a na iontové síle, ale nevysráží se při okyselení mléka. β -laktoglobulin není rozpustný v čisté vodě. Ve mléce je přítomen jako dimer. Obě molekuly jsou pevně vázány k sobě navzájem. Dimer se rozpadá při vysoké teplotě (WALSTRA et al. 1991).

Genetické varianty A a B β -LG se hojně vyskytují u většiny plemen skotu. Přítomnost jedné nebo druhé varianty výrazně ovlivňuje vlastnosti mléka, částečně kvůli rozdílným fyzikálně-chemickým vlastnostem β -laktoglobulinových molekul.

Jiným významným rysem bovinního β -laktoglobulinu je schopnost vázat hydrofobní a amfifilní molekuly. Značná pozornost je věnována vázání retinolu (vitamin A) na β -betalaktoglobulin (FARRELL et al. 2004).

2.4.2 α -laktalbumin

Dalším významným proteinem syrovátky je α -laktalbumin, který má i určitou biologickou funkci jako součást některých enzymů. Tvoří asi 30 % proteinů syrovátky, z celkových bílkovin mléka pak představuje asi 2-5 %.

α -laktalbumin je globulární protein složený ze 123 aminokyselinových zbytků. Existuje ve třech genetických variantách A, B, a C. Varianty A a B jsou převládající. Varianta A obsahuje Glu v pozici 10. U varianty B je v této pozici Glu zaměněn za Arg. Obě varianty A a B obsahují 4 disulfidové vazby. α -laktalbumin obsahuje velmi vysoký počet esenciálních aminokyselin. Aminokyselinové složení bovinního α -laktalbuminu ze 72 % odpovídá lidskému α -LA, proto je bovinní α -LA ideálním proteinem pro výživu dětí (FARRELL et al. 2004).

α -laktalbumin je stejně jako β -laktoglobulin syntetizován v mléčné žláze a je přítomen v každém mléce, které obsahuje laktózu, poněvadž je nezbytný pro její syntézu (GAJDŮŠEK, KLÍČNÍK 1993). Struktura proteinu, sekvence aminokyselin i sekvence DNA je velice podobná c-typu lysozymu (FARRELL et al. 2004). Chemicky je tedy α -laktalbumin podobný lysozymu, ale nemá jeho baktericidní účinek. Jeho biologickou funkcí je působit jako koenzym v syntéze laktosy (WALSTRA et al. 1991).

Malé procento α -laktalbuminu nalezené v mléce je glykosylováno na Asn zbytku. Důvod proč pouze malá část proteinu je glykosylována není znám a potenciální důležitost glykosilace nebyla určena (FARRELL et al. 2004).

2.4.3 Imunoglobuliny

Imunoglobuliny tvoří kolem 1 % z celkových proteinů mléka nebo kolem 6 % proteinů syrovátky. Základní struktura Ig nalezeného u skotu je podobná lidskému. Existuje pět typů Ig: IgG (IgG1, IgG2 a IgG3) IgA a IgM. Všechny byly identifikovány u skotu. Obsah jednotlivých imunoglobulinů v mléce je uveden v **tab. č. 5** (FARRELL et al. 2004).

Imunoglobuliny jsou ojedinělé mezi mléčnými bílkovinami pokud se jedná o molekulární genetiku jejich syntézy, heterogenitu a funkci. Zajišťují přenos imunity z matky na mládě, a proto jsou ve zvýšené koncentraci především v kolostru (až 12 g.l⁻¹) (GAJDŮŠEK, KLÍČNÍK 1993). Imunoglobuliny jsou protilátky, které jsou tvořeny na základě odezvy na stimulaci specifickými antigeny. Jsou to velké bílkovinné molekuly různorodého složení (WALSTRA et al. 1991).

Tabulka č. 5 Množství imunoglobulinů v kravském mléce (FARRELL et al. 2004).

Ig	koncentrace mg/ml		
	kolostrum	mléko	syrovátka
IgG1	46,4	0,58	11,2
IgG2	2,87	0,05	9,2
IgG3	NA	NA	NA
IgA	5,36	0,1	0,37
IgM	6,77	0,09	3,1

NA = není k dispozici

2.4.4 Sérový albumin

V menším množství je v syrovátce zastoupen sérový albumin (sérumalbumin). Představuje 0,7-1,3 % z celkových bílkovin mléka. Byla prokázána jeho imunologická totožnost s albuminem krevního séra. Jedná se o heterogenní bílkovinu. Zvýšená hladina tohoto proteinu je zjišťována při zánětech mléčné žlázy (GAJDŮŠEK, KLÍČNÍK 1993).

Sérový albumin je hlavním proteinem nalezeným v krvi. Jeho hlavní úloha je transport, metabolismus a distribuce ligandů, má také podíl na osmotickém tlaku krve. Bovinní SA nalezený v mléce je totožný s SA nalezeným v krvi. Sérový albumin je složen z 583 zbytků aminokyselin se 17 disulfidovými vazbami. (FARRELL et al. 2004).

2.4.5 Proteoso-pepton

Proteoso-peptony tvoří malý podíl bílkovin mléka. Jsou to fosfoglykoproteiny, které jsou tepelně stálé do 100 °C a jsou rozpustné při pH 4,6. Jedná se o heterogenní bílkovinu, jejíž obsah v kravském mléce se pohybuje v intervalu od 2 do 6 % z celkových bílkovin mléka. Některé z těchto komponent jsou součástí kaseinových micel (GAJDŮŠEK, KLÍČNÍK 1993).

2.5 Vlivy působící na množství a složení bílkovin mléka

Stavba jednotlivých bílkovinných frakcí mléka je dána geneticky, proto nelze předpokládat změny v primární struktuře, tj. v zastoupení aminokyselin. Významné změny však mohou nastat v zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin, z nichž z technologického hlediska je nejvýznamnější změna poměru kaseinu a sérových bílkovin.

Nejvýznamnější fyziologický faktor je stadium laktace. V kolostru převládají bílkoviny mléčného séra, zejména imunoglobuliny. K přechodu na normální mléko dochází velmi rychle, již za 5 až 6 dnů odpovídá zastoupení většiny bílkovinných frakcí normálu. Některé bílkovinné frakce kolostra však mohou být v mléce zjištěny ještě po 10 až 20 dnech po otelení. Před zaprahnutím dochází opět k poklesu obsahu kaseinu a

vzestupu sérových bílkovin. V průběhu laktace byla pozorována negativní korelace mezi produkcí mléka a obsahu bílkovin, i když méně výrazná než u tuku.

Druhým nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím zastoupení bílkovinných frakcí v mléce je zdravotní stav dojnic. Již lehká onemocnění mají negativní vliv. Většinou dochází k poklesu obsahu bílkovin. Dochází však ke snížení obsahu kaseinu a vzestupu obsahu sérových bílkovin, především imunoglobulinů. Kromě toho dochází i ke změnám ve struktuře kaseinových micel, změnám v poměru vápníku a fosforu, a tím i ke zhoršení syřitelnosti mléka a jeho technologické využitelnosti.

Vliv výživy a krmení se projevuje jak na celkové produkci, tak i na obsahu jednotlivých složek. Nedostatečná výživa způsobuje pokles obsahu bílkovin, z nichž klesá obvykle především obsah kaseinu.

Plemenná příslušnost ovlivňuje podstatným způsobem složení a vlastnosti mléka. Kromě rozdílů v celkovém obsahu bílkovin mezi plemeny byly zjištěny i významné rozdíly v obsahu některých frakcí dané genetickými variantami. Poněvadž genetické varianty bílkovin se liší i nepatrnými rozdíly v zastoupení aminokyselin a fyzikálně-chemických vlastností, byly pozorovány i rozdíly v chování mléka při jeho technologickém zpracování (termostabilita, syřitelnost mléka apod.).

Ostatní vlivy se projevují výrazně především ve změně celkového obsahu bílkovin mléka, i když obsah bílkovin v mléce kolísá v mnohem menší míře než kupříkladu obsah tuku. Málo výrazný je vliv denní doby, počtu, případně intervalu dojení. Výraznější rozdíly v obsahu bílkovin jsou dány individualitou dojnice (GAJDŮŠEK, KLÍČNÍK 1993).

2.6 Polymorfismus mléčných proteinů

Vztah mezi genotypem alel kódujících mléčné bílkoviny a kvantitativní i kvalitativní parametry mléčné užitkovosti byl studován mnoha autory prakticky od padesátých let, kdy Aschaffengurg a Drewery (1955) popsali první výskyt polymorfismu u β -laktoglobulinu – nejdůležitější bílkoviny syrovátky, tedy výskyt dvou forem této bílkoviny, které se liší pořadím aminokyselin v řetězci.

Postupně byly identifikovány polymorfní varianty i u ostatních genů kódujících mléčné proteiny (κ -kasein, β -kasein a α_{S1} -kasein) jak u komerčně chovaných plemen, tak i u nedomestikovaných druhů. Alelické formy těchto mléčných proteinů běžně se

vyskytující u evropských dojených plemen a jejich mutované alelické sekvence jsou shrnuty v **tab. č. 6**.

Tabulka č. 6 Alelické formy mléčných proteinů běžně se vyskytující u evropských dojených plemen a jejich mutované alelické sekvence (JANDEROVÁ et al. 2002).

Lokus	Varianty alel	Alela původní a mutovaná	Pořadí a změna aminokyseliny v řetězci
α_{S1} -CN	B, C	C > B	192: Gly > Glu
	A1, A2, A3	A2 > A1	67: Pro > His 67: Pro > His
β -CN	B	A2 > B	122: Ser > Arg 136: Thr > Ile
κ -CN	A, B, E	A > B	148: Asp > Ala
		A > E	155: Ser > Gly
β -LG	A, B	B > A	64: Gly > Asp
			118: Ala > Val

Jak již bylo zmíněno, první práce na této problematice se soustředily na detekci nových polymorfních variant a na rozdíly ve frekvenci jednotlivých alel u různých plemen. Analýza vztahů mezi lokusy κ -CN a β -LG, u kterých byl poměrně brzy objeven vztah k technologické kvalitě mléka a kvantitativními ukazateli mléčné užitkovosti však přinášela u různých plemen rozporné výsledky. Důvody obtížné interpretace exprese totožných alel u různých plemen jsou již známé. Je třeba si uvědomit, že ani jeden z lokusů mléčných bílkovin nemůže být samostatně a výhradně použit jako marker produkce a kvality mléčné bílkoviny univerzálně u všech plemen. Kaseinové geny jsou v absolutní vazbě a navíc se všechny mléčné proteiny syntetizují ve stejném období. Jejich výsledné kvantitativní zastoupení je dáno interakcemi uvnitř kaseinového bloku a interakcí mezi genotypy pro kaseiny a β -laktoglobuliny. Proto se novější práce zabývají již nikoli samotnými genotypy pro κ -kasein a β -laktoglobulin, ale úplným genotypem pro všechny mléčné bílkoviny. Rozdíly ve frekvencích alel mléčných bílkovin u našich domácích a u některých evropských plemen dojeného skotu jsou patrné z **tab. č. 7**.

Tabulka č. 7 Rozdíly ve frekvencích alel mléčných bílkovin u našich domácích a u některých evropských plemen dojeného skotu (JANDEROVÁ et al. 2002).

Plemena	α_{S1} -CN		κ -CN			β -LG	
	B	C	A	B	E	A	B
České strakaté	88,91	11,09	60,45	36,70	2,85	51,85	48,15
Slovenské strakaté	67,64	32,36	35,34	64,66		37,90	62,10
Slovenské pincgavské	85,00	15,00	66,00	33,00	1,00	23,10	76,90
Německé strakaté	98,00	2,00	75,00	13,50	7,50	51,00	49,00
Švédské strakaté	100,00		84,65	15,35		32,60	67,40
Finský ayshire	100,00		62,30	8,57	29,23	71,50	25,50
Dánský jersey	78,00	22,00	51,20	48,80		46,30	53,70
Holštýn Švédsko	88,35	1,65	83,35	16,65		49,75	50,25
Holštýn Německo	97,10	2,90	70,50	27,40	2,10	85,50	14,50

Uvedené hodnoty frekvencí alel mléčných bílkovin jsou určitou charakteristikou plemene, ale v jednotlivých chovech se mohou značně lišit v důsledku používání býků vybraných pro inseminaci (JANDEROVÁ et al. 2002).

2.6.1 Vliv polymorfismu mléčných proteinů na produkci mléka

2.6.1.1 Vliv polymorfismu κ -kaseinu

Publikované výsledky účinku genotypů κ -kaseinu na vlastnosti mléčné produkce byly často protichůdné. Ačkoli příznivý účinek B varianty κ -CN na obsah a výtěžnost bílkovin byl nalezen, ve většině případech jsou výsledky ohledně vztahu mezi polymorfismem κ -CN a dalšími vlastnostmi mléčné produkce rozporné (TSIARAS et al. 2005).

Genotypy κ -CN výrazně ovlivňují výtěžnost i obsah bílkovin (genotyp AB > genotyp AA) (TSIARAS et al. 2005). Některé studie našly spojitost mezi κ -CN BB a vyšším procentem bílkovin, ale v jiných studiích bylo uvedeno, že genotyp BB má pouze spojitost s vyšším procentem kaseinů bez zvýšení celkového procenta bílkovin (ALEANDRI et al.

1990). Tento faktor může být z ekonomického hlediska důležitý pro výrobu sýrů, protože výtěžnost sýrů je pozitivně spojena s obsahem kaseinu ve mléce (NG-KWAI-HANG et al. 1990). κ -CN BB má také určitou spojitost s výtěžností bílkovin (ALEANDRI et al. 1990).

Genotypy κ -CN významně ovlivňují produkci mléka. Dojnice s κ -CN BB vyprodukovaly menší množství mléka než dojnice s κ -CN AA. Alela B κ -CN je spojena s nižší výtěžností tuku (BOVENHUIS et al. 1992). Tendence ke zvyšování výtěžnosti mléka a tuku byla nalezena u genotypu AB κ -CN. Obsah tuku, obsah a výtěžnost laktosy nebyly genotypem κ -CN ovlivněny (TSIARAS et al. 2005).

2.6.1.2 Vliv polymorfismu β -laktoglobulinu

Genotyp β -laktoglobulinu vykazuje významný účinek na výtěžnost bílkovin. U mléka získaného od dojnic nesoucí variantu β -LG BB byla výtěžnost bílkovin nižší než u mléka od dojnic s AA nebo AB variantou (BOVENHUIS et al. 1992).

Původní zpráva Aschaffengurga a Dreweryho (1957) naznačuje, že mléko s β -LG AA obsahuje více bílkovin než mléko s β -LG AB nebo BB, což bylo potvrzeno několika dalšími pracemi (NG-KWAI-HANG et al. 1990).

Obecně platí, že genotyp β -LG BB je spojen s vyšším obsahem kaseinů v mléce a β -LG AA souvisí se zvyšující se frakcí syrovátkových proteinů (ALEANDRI et al. 1990). Zvýšení množství β -laktoglobulinu ve mléce obsahující β -LG AA je zřejmě kompenzováno snížením obsahu kaseinu a α -laktalbuminu. Vyšší koncentrace β -LG nebo přítomnost varianty β -LG A potlačuje syntézu dalších významnějších syrovátkových proteinů. Jak přítomnost β -LG A potlačuje jiné proteiny mléka není známa (HILL 1993).

McLean et al. ve své práci naznačil, že vyšší množství kaseinu spojené s B variantou β -LG, nebylo v důsledku zvýšené tvorby kaseinu, ale spíše snížením tvorby β -LG, hlavního proteinu syrovátky v mléce od dojnic s alelou B.

Z **Tab. č. 8** vyplývá, že mléko obsahující β -LG AA obsahuje významně více syrovátkových (o 28 %) a méně kaseinových proteinů (o 6,8 %) než mléko s β -LG BB. Celkový obsah proteinů je velmi podobný u obou typů mlék. Mléko s β -LG AA také obsahovalo méně tuku (o 11 %) a sušiny (o 6 %) než mléko s β -LG BB (HILL 1993).

Tabulka č. 8 Vztah mezi fenotypy β -LG a vybranými složkami mléka (HILL 1993)

Složky mléka	AA	BB
Syrovátkové bílkoviny	0,64	0,50
Kasein	2,49	2,66
Celkové bílkoviny	3,13	3,16
Tuk	4,12	4,62
Sušina	12,46	13,23

Genotyp β -LG také významně ovlivňuje výtěžnost tuku. Dojnice s AB a BB genotypem β -LG produkovaly více tuku ve srovnání s dojnicemi s genotypem AA. Alela B je tedy příznivá pro produkci mléčného tuku. Další výzkumy nicméně naznačují nevýznamnou souvislost mezi výtěžností tuku a genotypem β -LG.

Genotyp AB β -LG je spojován s významně vyšší produkcí laktosy ve mléce ve srovnání s genotypem AA. Pravděpodobně se zde odráží účinek genotypu β -LG AB na výtěžnost mléka. Z jiného hlediska významná spojitost genotypu β -LG s výtěžností a obsahem laktosy nebyla nalezena (TSIARAS et al. 2005).

Ve studiích účinku genotypu β -laktoglobulinu na výtěžnost mléka několik autorů uvádí, že mezi nimi není žádný významný vztah. Nicméně existují zprávy kde genotyp AA, AB nebo BB β -LG má pozitivní vliv na výtěžnost mléka (NG-KWAI-HANG et al. 1990). Dojnice s genotypem AB β -LG produkovaly více mléka než dojnice s genotypem AA nebo BB (TSIARAS et al. 2005).

2.6.1.3 Vliv polymorfismu β -kaseinu

Genotypy β -kaseinu mají významný účinek na produkci mléka, procento tuku, procento bílkovin a na výtěžnost bílkovin a to v důsledku spojení alely A³ a B β -CN. Nižší frekvence těchto alel u většiny populace může vysvětlit nepřítomnost významného účinku β -CN v jiných studiích (BOVENHUIS et al. 1992). Ze všech známých genetických variant β -CN mají tedy nejvyšší četnost alely A¹ a A² a to u všech běžných plemen skotu. Četnost alely B β -CN je naopak velmi nízká (BARANYI et al. 1993).

Varianta A β -CN byla spojena s vyšší produkcí mléka (NG-KWAI-HANG et al. 1990). Dojnice s β -CN A¹B a BB produkovaly méně mléka než dojnice s β -CN A¹A¹. Nicméně dojnice s β -CN A¹B a BB produkovaly mléko s vyšším obsahem tuku a bílkovin než dojnice nesoucí β -CN A¹A¹.

Alela A³ β -CN byla spojena s nižším obsahem tuku a vyšším obsahem bílkovin ve mléce. Dojnice s β -CN A¹A³, A²A³ nebo A³B produkovaly mléko s nižším obsahem tuku a vyšším obsahem bílkovin (BOVENHUIS et al. 1992).

2.6.1.4 Vliv polymorfismu α_{S1} -kaseinu

Účinek genotypu α_{S1} -CN na obsah a výtěžnost bílkovin je významný (BOVENHUIS et al. 1992). V porovnání s α_{S1} -CN AB a BB byl genotyp BC spojen s vyšším obsahem a výtěžností bílkovin (NG-KWAI-HANG et al. 1990). Příznivý účinek je spojen s alelou C. Nižší četnost této alely u většiny plemen skotu může vysvětlit nepřítomnost významného účinku v některých studiích (BOVENHUIS et al. 1992).

Podle některých studií obsah i výtěžnost tuku není ovlivněna genotypem α_{S1} -CN, ale jiné studie uvádějí, že varianta α_{S1} -CN BC zvyšuje obsah tuku v mléce. Také výsledky týkající se výtěžnosti mléka jsou rozporuplné. Zatímco některé studie uvádí, že α_{S1} -CN má vliv na výtěžnost mléka (AB>BB>BC), jiné zde nenašly žádnou souvislost (NG-KWAI-HANG et al. 1990).

Výsledky týkající se účinku polymorfismu α_{S1} -CN, β -CN, κ -CN a β -LG na vlastnosti produkovaného mléka jsou často protichůdné. Může to být způsobeno v důsledku rozdílného krmného režimu, různých plemen a velikosti populací, četnosti výskytu určitých genetických variant, stáří dojnic, ročního období, stádia laktace, zdravotního stavu dojnic, stejně tak jako v dostupnosti a přesnosti dat v různých studiích. Z tohoto důvodu je potřebné překonat všechny potenciální zdroje variability.

2.6.2 Vliv polymorfismu mléčných proteinů na výrobu sýrů

V 60. letech se objevily první práce upozorňující na vztah některých genetických variant mléčných bílkovin ke kvalitativním vlastnostem mléka jako je výtěžnost a kvalita sýřeniny při zpracování. Protože tyto vlastnosti mohou ve značné míře ovlivnit ekonomiku výroby sýrů, byly tyto vazby v popředí zájmu mnoha výzkumných pracovišť. Většina autorů přisuzuje rozhodující vliv na sýrařské vlastnosti bílkovině κ -kaseinu. Ta se vyskytuje ve čtyřech genetických variantách – A, B, C a E. Varianty C a E se vyskytují velmi zřídka (HAVLÍČEK, HYNKOVÁ 1996).

Odlišnosti jednotlivých genetických variant mléčných proteinů ovlivňují i jejich vlastnosti. Srovnání sýrařsky významných vlastností alel mléčných proteinů s nejvyššími frekvencemi výskytu je uvedeno v **tab. č. 9** (GAJDŮŠEK 2000).

Tabulka č. 9 Vztah mezi genetickým polymorfismem mléčných bílkovin a sýrařsky významnými vlastnostmi mléka - jakost sýřeniny (GAJDŮŠEK 2000).

Lokus	Alela			
	A	B	C	E
α_{S1}-kasein - jakost sýřeniny	měkká	-	tuhá	
B-kasein - doba sýření - syneréze - pevnost sýr. zrna - výtěžnost	- - - -	kratší rychlejší pevnější vyšší	kratší pevnější	
κ-kasein - obsah bílkovin - kaseinové číslo - doba sýření - syneréze - pevnost sýr. zrna - výtěžnost	- - - - - -	vyšší vyšší kratší rychlejší vyšší vyšší		jako A jako A
β-laktoglobulin - obsah kaseinu - obsah syrov. bílkovin - kaseinové číslo - pevnost sýr. zrna - výtěžnost	- - - - -	vyšší nižší vyšší vyšší vyšší		

Z přehledu je zřejmé, že jak u κ -CN, tak i u β -LG se jeví technologicky vhodnější alely B. Tyto poznatky byly zjištěny u syrového mléka, bylo však prokázáno, že zůstávají zachovány i u mléka pasterovaného.

Zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin mléka je dáno geneticky a je tedy u každé dojnice neměnné. Celkový obsah bílkovin, nebílkovinného dusíku, poměrové zastoupení syrovátkových bílkovin a kaseinu, velikost kaseinových micel i vlastnosti mléka jsou však ovlivněny řadou dalších faktorů a jejich vliv může zcela překrýt vlivy genetického polymorfismu bílkovin mléka. Z chovatelského hlediska nejvýznamnějšími faktory jsou zdravotní stav a výživa zvířat (GAJDŮŠEK 2000).

I přes specifické odlišnosti plemen ve frekvenci jednotlivých alel je možné již nyní zobecnit a využít v praxi vztahy mezi některými alelami a technologickou kvalitou, či kvantitativní produkcí jednotlivých mléčných složek (JANDEROVÁ et al. 2002).

2.6.2.1 Vliv polymorfismu κ -kaseinu

Množství κ -CN v mléce významně souvisí s tuhostí sýřeniny (ALEANDRI et al. 1990). Alela B κ -CN má příznivý účinek na koagulační vlastnosti mléka a je spojena s nejvyšší hodnotou pevnosti sýřeniny (viz. **tab. č. 10**), kdežto alely A a E κ -CN byly spojeny s hodnotami nejnižší (IKONEN et al. 1999).

Genetické varianty κ -CN také ovlivňují dobu sýření. Pro šlechtění zvířat byla již dříve vybírána právě příznivá alela B. Naneštěstí však existuje určité spojení mezi alelou B κ -CN a produkcí mléka. Selekcí této alely se tedy produkce mléka negativně ovlivňuje (BOVENHUIS et al. 1992).

Alela B κ -CN je známa svým spojením s vhodnějšími koagulačními vlastnostmi a složením proteinů mléka než alela A (IKONEN et al. 1999). Protein typu κ -CN AA je proto méně vhodný pro výrobu sýrů (ALEANDRI et al. 1990). Alela κ -CN B zvyšuje produkci κ -kaseinové frakce a celkový obsah bílkovin. Snižuje podstatně dobu denaturace, sýřenina má jemnější micely a konzistenci, zvyšuje se i obsah iontů, především vápníku. Přítomnost alely κ -CN B také snižuje ztráty laktoglobulinové frakce záhřevem, a tím zvyšuje výtěžnost sýřeniny (JANDEROVÁ et al. 2002). Jedinou nevýhodou příznivé alely B κ -CN může být tedy spojitost s nízkou výtěžností mléka a bílkovin (IKONEN et al. 1999).

Alela E κ -CN snižuje obsah kaseinů i β -LG a zhoršuje fyzikální vlastnosti sýřeniny i její výtěžnost, protože vytváří hrubší micely. Nebyl však prokázán negativní vliv na úroveň produkce mléka za laktaci nebo celkového obsahu bílkovin. V homozygotním stavu (EE) se projevuje technologicky velmi negativně, protože mléko od krav tohoto genotypu se tepelně nesráží (JANDEROVÁ et al. 2002).

Tabulka č. 10 Forma genu a jeho efekt (PAZDERA et al. 1994).

Forma genu (alela)	Projeví se v mléčné bílkovině κ -kaseinu následující změnou	Chovatel zaregistruje
A	V řetězci aminokyselin je na 136. místě aminokyselina treonin a na 148. místě je kyselina asparagová	Nižší obsah proteinů v mléce, horší syřitelnost,...
B	Řetězci aminokyselin jsou na 163. a na 148. místě leucin a alanin	Vyšší obsah proteinů v mléce, při zpracování na sýr až o 10 % vyšší výtěžnost, možnost výroby kvalitních sýrů typu parmezán, gouda,...
C	Na 97. místě řetězce je místo argininu histidin	Efekt zatím není znám
E	Na 155. místě řetězce je místo aminokyseliny serinu glycin	Efekt zatím není znám

Poznámka: K největšímu pozitivnímu efektu dochází u zvířat s homozygotní kombinací (genotyp BB).

2.6.2.2 Vliv polymorfismu β -kaseinu a α_{S1} -kaseinu

β -kasein ovlivňuje tuhost sýřeniny. Alela B β -CN je spojena s kratší dobou sýření, vyšší tuhostí sýrového zrna a vyšší výtěžností sýra, viz **tab. č. 9**. β -CN A_1A_1 je spojován s oběma, teoretickou i skutečnou výtěžností sýra.

Genetická varianta α_{S1} -CN BB je spojena s vyšší výtěžností sýra. Pozitivní účinek α_{S1} -CN BB na výtěžnost sýrů je spřízněný s pozitivním efektem této varianty α_{S1} -CN na výtěžnost mléka, tuku a bílkovin (ALEANDRI et al. 1990). Z **tab. č. 9** vyplývá, že alela C α_{S1} -CN je spojena s dobrou tuhostí sýřeniny, naopak z mléka obsahující alelu A α_{S1} -CN

byla vyrobena měkká sýřenina. V některých studiích však nebyl objeven významný vztah mezi α_{S1} -CN a výrobními vlastnostmi mléka (ALEANDRI et al. 1990).

2.6.2.3 Vliv polymorfismu β -laktoglobulinu

Obecně platí, že genotyp β -LG BB je spojen s vyšším procentem kaseinů v mléce a β -LG AA byl spojen se zvyšující se frakcí syrovátkových proteinů. Alela B β -LG má tedy pozitivní účinek na množství kaseinu v mléce (ALEANDRI et al. 1990). Pro zpracování mlék na sýry je výhodou kratší doba denaturace, pevnější sýřenina s menšími póry a nižší ztráty bílkovin. Současně je ale genotyp BB pro β -LG spojen vždy s nižšími hodnotami kvantitativních parametrů užitkovosti, především s nižší produkcí kg mléka za laktaci (JANDEROVÁ et al. 2002).

2.6.3 Polymorfismus bílkovin mléka a selekční programy

Genetický polymorfismus mléčných proteinů je tedy způsoben substitucí nebo delecí aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Protože tyto polymorfní formy, někdy známé jako genetické varianty, se snadno odhalí pomocí elektroforetických metod a odpovídající geny se jednoduše dědí podle Mendelova zákona o dědičnosti, by geny bílkovin mléka mohly být využívány jako ukazatelé ekonomicky významných vlastností (NG-KWAI-HANG et al. 1990).

Zpracovatelské vlastnosti budoucího mléka mohou být zlepšeny zavedením selekčního chovu na požadované alely mléčných proteinů. Tento druh selekce se liší od tradiční selekce na zlepšení kvantitativních znaků. Proveditelnost chovného plánu týkajícího se selekce specifických alel jednotlivých genů však závisí na frekvenci těchto alel v populaci. Jestliže je alela vzácná, pak je selekce omezená. Jestliže je všudypřítomná, pak je malá šance na zvýšení její četnosti (VAN EENENNAAM, MEDRANO 1991).

Dříve než se převezme takový chovný program, musí se vzít v úvahu možná spojitost genetických variant s dalšími faktory mléčné produkce a s ekonomickými změnami, které by mohly podpořit chovatele k selekci specifických genů mléčných proteinů (VAN EENENNAAM, MEDRANO 1991). Dále by se mělo vědět, zda neexistuje nepříznivé

spojení mezi ekonomicky zajímavými alelami mléčných bílkovin a dalšími vlastnostmi důležitými pro produkci mléka (LUNDÉN et al. 1997).

2.6.4 Využití selekčních programů v chovu skotu

Polymorfismus mléčných bílkovin je velmi významný z hlediska toho, že je možné nejen nekompromisně volit vysokou produkci mléka, ale také poskytnout proteiny, které jsou vhodnější pro výrobu sýrů. Vhodnou kombinací je např. α_{S1} -CN BB s κ -CN BB, kdy dojnice produkují více mléka s vyšším obsahem bílkovin. Další z vhodných kombinací je kombinace κ -CN BB s β -LG BB, kdy získáme mléko bohaté na bílkoviny i tuk (ALEANDRI et al. 1990). Výhodná je i kombinace β -LG B, β -CN B a κ -CN B, která by zvýšila obsah kaseinu, zlepšila koagulační vlastnosti mléka, a tím zvýšila i objem vyrobeného sýra. Při selekci alely B β -CN se ale musí vzít v úvahu vztah, který existuje mezi geny κ -CN a β -CN. Selektce alely B β -CN by mohla být v rozporu se selekcí alely B κ -CN. Účinek κ -CN B na zlepšení výrobních vlastností mléka je významnější než u alely B β -CN, proto by měl mít κ -CN přednost, selekční prioritu. Pro zlepšení vlastností mléka na výrobu sýrů má tedy největší dopad selektce alely B u β -LG a κ -CN (VAN EENENNAAM, MEDRANO 1991).

V důsledku těchto asociací je zájem o selekci příznivých genotypů mléčných proteinů značný. A to zejména v zemích, kde je významná část mléka použita na výrobu sýrů (BOVENHUIS et al. 1992). Vezmeme-li v úvahu současné trendy šlechtění na kvalitní surovinu, a to z hlediska dietetického i technologického, je jistě informace o genotypech alel mléčných bílkovin u plemenných zvířat významným faktorem, který by měl být zohledněn při šlechtění plemene, zejména při strategii výběru býků pro stádo. Z tohoto důvodu by chovatel měl mít úplnou informaci o genotypu býka, kterého používá ve stádě a nekompromisně ji vyžadovat (JANDEROVÁ et al. 2002).

3. ZÁVĚR

Mým úkolem v této bakalářské práci bylo zjistit, jaký vliv má polymorfismus mléčných proteinů na výrobu sýrů. Jak už bylo řečeno, bílkoviny mléka jsou polymorfní a v mléce se tedy vyskytují ve více genetických variantách, lišících se od sebe substitucí nebo delecí aminokyselin v proteinovém řetězci. Frekvence výskytu jednotlivých variant je závislá nejen na genetickém založení zvířete, ale také na řadě dalších faktorů, jejichž vliv může zcela překrýt vliv genetického polymorfismu bílkovin. Z chovatelského hlediska je nejvýznamnější zdravotní stav a výživa zvířat.

Z přehledu je zřejmé, že nejvýznamnější účinek na koagulační vlastnosti mléka má κ -kasein. Alela B κ -CN nejen zvyšuje obsah bílkovin a kaseinové číslo v mléce, ale také pozitivně ovlivňuje rychlost utváření sýřeniny, pevnost sýrového zrna, rychlost syneréze a výtěžnost sýrů.

Významný vliv na výrobu sýrů má i β -laktoglobulin s β -kaseinem. Alela B β -LG v mléce zvyšuje obsah kaseinů, snižuje obsah syrovátkových bílkovin, pevnost sýrového zrna a výtěžnost sýrů jsou vyšší. Mléko obsahující alelu B β -CN má kratší dobu sýření, syneréze je rychlejší, pevnost sýrového zrna je dobrá a výtěžnost sýrů je vyšší.

α_{S1} -kasein má na výrobu sýrů menší vliv než dříve uvedené proteiny. Alela B však pozitivně ovlivňuje výtěžnost sýrů a alela C poskytuje tuhou sýřeninu.

Jestliže vezmeme v úvahu současné trendy šlechtění, které jsou zaměřeny hlavně na kvalitní surovinu, a to z hlediska dietetického i technologického, je jistě informace o genotypch alel mléčných bílkovin plemenných zvířat významným faktorem, který by měl být zohledněn při šlechtění plemene.

4. LITERATURA

- ALEANDRI, R., BUTTAZZONI, G. L., SCHNEIDER, J. C., CAROLI, A., DAVOLI, R. 1990. The effects of milk protein polymorphism on milk components and cheese-producing ability. *J. Dairy Sci.* 73: 241-255
- ANONYM. *Mlieko.cz* [online]. c1998, poslední revize 30. 4. 2006 [cit. 2006-02-16]. Dostupné z < http://www.mlieko.sk/zlozenie_m.php>.
- BARANYI, M., BŐSZE, Z. S. 1993. Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian spotted and Hungarian grey cattle: A possible new genetic variant of β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 76: 630-636
- BOVENHUIS, H., van ARENDONK, J. A. M., KORVER S. 1992. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J. Dairy Sci.* 75: 2549-2559
- FARRELL, H. M. et al. 2004. Nomenclature of the protein of cows' milk – Six revision. *J. Dairy Sci.* 87: 1641-1674
- GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství II.* 1. vydání. MZLU, Brno, 2000. ISBN 80-7157-342-6
- GAJDŮŠEK, S., KLÍČNÍK, V. *Mlékařství.* 2. vydání. MZLU, Brno, 1993. ISBN 80-7157-073-7
- HILL, J. P. 1993. The relationship between β -lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 76: 281-286
- HYNKOVÁ, L., HAVLÍČEK, Z. Co ovlivňují genetické varianty mléčných bílkovin? *Náš chov.* 1996. ročník LVI, číslo 8. s. 12.
- IKONEN, T., AHLFORS, K., KEMPE, R., OJALA, M., RUOTTINEN, O. 1999. Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 205-214
- JANDUROVÁ, O., ŠTÍPKOVÁ, M., KOTTOVÁ, B. Polymorfismus alel mléčných bílkovin u skotu a šlechtění na kvalitu mléčné bílkoviny. *Náš chov.* 2002. ročník LXII, číslo 8. s. 27-30
- McLEAN, D. M., GRAHAM, E. R. B., PONZONI, R. W., MONARDES, H. G. 1986. Relationship between milk protein polymorphism and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 69: 22
- NG-KWAI-HANG, K. F., MONARDES, H. G., HAYES, J. F. 1990. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *J. Dairy Sci.* 73: 3414-3420

- PAZDERA, J. et al. Kapa-kazeín a jeho testace molekulárně genetickou metodou. Náš chov. 1994. ročník LIV, číslo 11. s. 15-16
- TSIARAS, A. M., BARGOULI, G. G., BANOS, G., BOSCOS, C. M. 2005. Effect of kappa-kasein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of holstein cos. J. Dairy Sci. 88: 327-334
- VAN EENENNAAM, A., MEDRANO, J. F. 1991. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. J. Dairy Sci. 74: 1730-1742
- VELÍŠEK, J. Chemie potravin I. 2. vydání. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-00-3
- WALSTRA, P., GEURTS, T. J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., van BOEKEL, M. A. J. S. Dairy technology: principles of milk properties and processes. 1st printing. New York: Dekker, 1999. ISBN 0-8247-0228-X

5. PŘÍLOHY

SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tab. č. 1 Složení 1 litru kravského mléka

Tab. č. 2 Složení proteinů kravského mléka

Tab. č. 3 Mléčné proteiny a některé jejich charakteristiky

Tab. č. 4 Vlastnosti některých mléčných proteinů

Tab. č. 5 Množství imunoglobulinů v kravském mléce

Tab. č. 6 Alelické formy mléčných proteinů běžně se vyskytující u evropských dojených plemen a jejich mutované alelické sekvence

Tab. č. 7 Rozdíly ve frekvencích alel mléčných bílkovin u našich domácích a u některých evropských plemen dojeného skotu

Tab. č. 8 Vztah mezi fenotypy β -LG a vybranými složkami mléka

Tab. č. 9 Vztah mezi genetickým polymorfismem mléčných bílkovin a sýrařsky významnými vlastnostmi mléka - jakost sýřeniny

Tab. č. 10 Forma genu a jeho efekt

Obr. č. 1 Příčný řez typickou submicelou

Obr. č. 2 Vzájemné spojení submicel prostřednictvím fosfátů (P), vápenatých iontů (Ca) a citrátů (Ci)

Obr. č. 3 Příčný řez kaseinovou micelou

SEZNAM ZKRATEK

Ala – alanin

Arg – arginin

Asn – asparagin

Asp – kyselina asparagová

Glu – kyselina glutamová

Gly – glycin

His – histidin

Ig – imunoglobuliny

Ile – isoleucin

Met – methionin

Phe – fenylalanin

Pro – prolin

SA – sérum albumin

Ser – serin

Thr – threonin

Val – valin

α -CN – α -kasein

β -CN – β -kasein

γ -CN – γ -kasein

λ -CN – λ -kasein

κ -CN – κ -kasein

α -LA – α -laktalbumin

β -LG – β -laktoglobulin