

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Faktory ovlivňující složení mléčného tuku a
zdravotní nezávadnost mléka**

Ing. Jana Koubová

2016

Vypracovala:

Ing. Jana Koubová

Studijní program: Zootecnika

Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat

Školící pracoviště: Katedra kvality zemědělských produktů

Vedoucí školitel:

doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Školitel specialista:

doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat především **doc. Ing. Martinovi Kváčovi, Ph.D.** a **doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D.** za cenné rady, odborné vedení, pomoc a ochotu v celém průběhu studia.

Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu katedry Kvality zemědělských produktů a spoluautorům vydaných publikací za spolupráci.

Závěrem bych chtěla poděkovat své rodině a paní Kákové za velkou podporu v průběhu celého studia a především pak při psaní této disertační práce.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně podle pokynů vedoucích práce a za použití uvedené literatury.

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

.....
Ing. Jana Koubová

V Českých Budějovicích dne

Seznam zkratek

ARA	kyselina arachidonová
ACP	acyl-carrier protein
ALA	kyselina α -linolenová
ATP	adenosintrifosfát
BSE	bovinní spongiformní encefalopatie
CLA	konjugovaná linolová mastná kyselina
CoA	koenzym A
DGAT	diacylglycerol O-acyltransferáza
DHA	kyselina dokosaheptaenová
EFSA	Vvropský úřad pro bezpečnost potravin
EPA	kyselina eikosapentaenová
EU	Evropská Unie
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FMD	slintavka a kulhavka
GLC	metoda plynové chromatografie: plyn - kapalina
GLM	obecný lineární model
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
ICHS	ischemická choroba srdeční
KD	krmná dávka
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LA	kyselina linolová
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
NEL	netto energie laktace
OBCFA	mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků a rozvětvené mastné kyseliny
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPP	provozovatel potravinářského podniku
PSB	počet somatických buněk
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
PUFA <i>n-3</i>	polynenasycené mastné kyseliny řady <i>n-3</i>
PUFA <i>n-6</i>	polynenasycené mastné kyseliny řady <i>n-6</i>
SCD	stearoyl-CoA desaturáza
SCID	těžká kombinovaná imunodeficience
SFA	nasycené mastné kyseliny
TAG	triacylglyceroly
TFA	<i>trans</i> nenasycené mastné kyseliny
TLR	toll-like receptory
TVA	kyselina vakcenová
UFA	nenasycené mastné kyseliny
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
WHO	Světová zdravotnická organizace

Obsah

1	Úvod	9
2	Literární přehled	10
2.1	Mastné kyseliny mléčného tuku	11
2.1.1	Charakteristika a rozdělení mastných kyselin	11
2.1.2	Biosyntéza mastných kyselin mléčného tuku	14
2.1.3	Nasyčené mastné kyseliny (SFA)	17
2.1.4	Nenasycené mastné kyseliny (UFA)	17
2.1.4.1	Monoenové mastné kyseliny (MUFA)	17
2.1.4.2	Polyenové nenasycené mastné kyseliny (PUFA)	17
2.1.5	Minoritní skupiny mastných kyselin	18
2.2	Problematika zdravotního významu mastných kyselin	19
2.2.1	Pozitivní účinky mastných kyselin v organismu	21
2.2.2	Mastné kyseliny a onemocnění	22
2.2.2.1	Mastné kyseliny a cholesterol	22
2.2.2.2	Mastné kyseliny a inzulin	23
2.2.2.3	Mastné kyseliny a ostatní zdravotní komplikace	24
2.3	Legislativní požadavky ve vztahu k mastným kyselinám	25
2.3.1	Legislativa EU	26
2.3.2	Legislativa v rámci ČR	31
2.4	Faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku	32
2.4.1	Biologické faktory	32
2.4.1.1	Plemeno a individualita	32
2.4.1.2	Stádium a pořadí laktace	33
2.4.2	Faktory výživy	34
2.5	Zdravotní nezávadnost mléka	35
2.5.1	Priony	35
2.5.2	Viry	36
2.5.3	Plísně	37
2.5.4	Kvasinky	37
2.5.5	Bakterie	38
2.5.6	Paraziti	39
3	Cíl práce	41

4	Materiál a metodika	42
4.1	Zastoupení MK v mléčném tuku.....	42
4.1.1	Odběry vzorků	42
4.1.2	Charakteristika skladby a složení krmných dávek.....	43
4.1.3	Analýza vzorků	43
4.1.3.1	Analýza vzorků KD	43
4.1.3.2	Základní složení vzorků mléka a stanovení MK metodou MIR.....	43
4.1.3.3	Stanovení mastných kyselin metodou GLC.....	44
4.1.4	Statistické zpracování dat	45
4.2	Testování přítomnosti <i>Encephalitozoon cuniculi</i> v syrovém kravském mléce a jeho infektivitu po různém tepelném zpracování mléka	47
4.2.1	Materiál.....	47
4.2.1.1	Charakteristika chovu	47
4.2.1.2	Odběr materiálu v chovech skotu	47
4.2.1.3	Spory mikrosporidií pro experiment.....	47
4.2.1.4	Experimentální zvířata.....	48
4.2.2	Metody.....	48
4.2.2.1	Izolace DNA	48
4.2.2.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	48
4.2.2.3	Kvantifikace spor <i>E. cuniculi</i> v biologických vzorcích.....	49
4.2.2.4	Gelová elektroforéza.....	49
4.2.2.5	Sekvenování a genotypizace	49
4.2.2.6	Stanovení počtu somatických buněk v mléce	49
4.2.3	Ověření účinnosti různých metod tepelného ošetření mléka na viabilitu a infektivitu <i>E. cuniculi</i> genotype II.....	49
4.2.3.1	Příprava infekční dávky	49
4.2.3.2	Design experimentu	50
5	Výsledky a diskuze	51
5.1	Vliv výživy.....	51
5.2	Vliv individuality	57
5.3	Vliv plemene	61
5.4	Vlivy na zdravotní nezávadnost mléka	65
6	Závěry.....	68
7	Souhrn.....	69
8	Summary.....	70

9	Seznam literatury	71
10	Seznamy tabulek, grafů, obrázků.....	95
11	Prohlášení spoluautorů.....	97
12	Přílohy.....	98

1 Úvod

Spotřeba mléka a zejména mléčných výrobků celosvětově stoupá. Společně s tím se proto zvyšuje produkce mléka. Mléko poskytuje první výživu každému narozenému savci a je pro něj plnohodnotnou potravou. Tato svým složením unikátní potravina poskytuje organismu základní živiny, a to sacharidy, bílkoviny, minerální látky, vitamíny a v neposlední řadě také tuk.

Mléčný tuk je tvořen triacylglyceroly, tj. estery glycerolu a na něm navázaných mastných kyselin a právě mastné kyseliny určují technologický a nutriční význam mléčného tuku. Nutriční a zdravotní hledisko je v současnosti důležitým kritériem při výběru potravin spotřebitelem. Zatímco v dobách minulých většina populace trpěla zejména nedostatkem potravin, což se odráželo i na konstituci obyvatel, v dnešní době je tomu ve vyspělých zemích naopak. Nadváha až obezita či kardiovaskulární onemocnění jsou jedním z hlavních problémů současnosti. Mastné kyseliny přímo ovlivňují hladinu cholesterolu v krvi, řada výzkumů také potvrdila souvislost mastných kyselin s cukrovkou a celou řadou dalších onemocnění. V tomto ohledu jsou negativně hodnoceny především nasycené mastné kyseliny. Naopak nenasycené mastné kyseliny mají pozitivní účinky a některé z nich jsou pro organismus esenciální. Výzkumy se tedy často soustřeďují na postupy, které by vedly k cíleným změnám ve složení mléčného tuku. Spektrum mastných kyselin lze totiž ovlivnit celou řadou faktorů, z nichž k nejzásadnějším patří individualita každé dojnice a její výživa.

Kromě nutričních vlastností mléka je však důležitá i jeho zdravotní nezávadnost, zejména výskyt patogenních mikroorganismů. Přítomnost těchto mikroorganismů v mléce bezprostředně souvisí s nedodržováním hygienických zásad při získávání, manipulaci, přepravě či skladování. Závažnost pak spočívá ve skutečnosti, že takto kontaminovaná surovina/potravina může způsobovat alimentární nákazy. Proto je nutné toto hledisko neustále sledovat a zajišťovat tak produkci bezpečných potravin.

Cílem práce bylo posouzení změny spektra zdravotně významných mastných kyselin v mléce v závislosti na vybraných faktorech a vyhodnocení výskytu vybraných patogenních mikroorganismů ovlivňujících zdravotní nezávadnost mléka.

2 Literární přehled

Tuky jsou definovány jako přírodní sloučeniny obsahující vázané mastné kyseliny (MK) se 4 a více atomy uhlíku ve sloučenině (Homolka et Kudrna, 2007).

Podle chemického složení se lipidy třídí na:

- homolipidy (estery glycerolu a MK)
- heterolipidy (sloučeniny MK, alkoholů a další kovalentně vázané sloučeniny např. kyselina fosforečná ve fosfolipidech)
- komplexní lipidy (sloučeniny homolipidů, heterolipidů a dalších sloučenin vázaných kovalentními, nebo vodíkovými vazbami a hydrofobními interakcemi)
- volné MK a jejich soli.

Mléčný tuk se skládá z 97 – 98 % homolipidů (triacylglyceroly, diacylglyceroly, monoacylglyceroly), z 2 – 3 % heterolipidů (fosfolipidy, cerebrosidy a glykolipidy) a ostatních látek rozpustných v tucích, tzv. doprovodné látky lipidů (karotenoidy, lipofilní vitaminy, komplexní lipidy a steroidy včetně cholesterolu) – tabulka 1. Navíc se v mléčném tuku vyskytují v nepatrných množstvích také vonné látky (Jensen, 2002). Obsah mléčného tuku se může lišit, a to v rozpětí od 3 do 6 % (Velíšek et Hajšlová, 2009).

Tabulka 1: Složení mléčného tuku

Složky mléčného tuku	Zastoupení v %
triacylglyceroly	95,8
diacylglyceroly	2,25
monoacylglyceroly	0,08
fosfolipidy	1,11 ^a
glykolipidy (cerebrosidy)	0,09
cholesterol	0,48 ^b
volné mastné kyseliny	0,28

^a včetně sfingomyelinu; ^b včetně esterů cholesterolu

Zdroj: Jensen (2002), upraveno

2.1 Mastné kyseliny mléčného tuku

2.1.1 Charakteristika a rozdělení mastných kyselin

Mastná kyselina je organická látka složená z alifatického uhlovodíkového řetězce, kde na jednom konci je methylenová (CH_3-) a na druhém konci karboxylová ($-\text{COOH}$) skupina. Jednotlivé MK se od sebe liší délkou a charakterem uhlovodíkového řetězce a stupněm nasycenosti (Lichtenstein et Jones, 2012). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem mají C4 až C8 atomů uhlíku, MK se středně dlouhým řetězcem od C10 do C14 uhlíkových atomů a MK s dlouhým řetězcem se skládají z C16 či více atomů (Bauman et Griinari, 2003).

Podle výskytu a počtu dvojných vazeb lze MK klasifikovat jako nasycené (SFA), které neobsahují dvojnou vazbu a nenasycené (UFA) obsahující jednu (MUFA) nebo více dvojných vazeb (PUFA). Umístění dvojně vazby je počítáno z karboxylového uhlíku, který se označuje jako uhlík 1.

Pozice dvojně vazby může být počítána také od methylenové skupiny a pak je vyjadřována např. jako omega-3, n-3 nebo ω -3, přičemž v tomto případě se první dvojná vazba vyskytuje na třetím uhlíku od methylenové skupiny (Velíšek et Hajšlová, 2009). Polyenové MK se takto rozdělují na PUFA n-6 a n-3 (označováno také jako PUFA ω -6 a ω -3). U nenasycených MK se navíc rozlišuje prostorové uspořádání podle pozice dvojně vazby na konfiguraci *cis* nebo *trans*. Běžně v potravinách se délka uhlovodíkového řetězce MK pohybuje v rozmezí 4 až 22 uhlíků v konfiguraci *cis* (Lichtenstein et Jones, 2012).

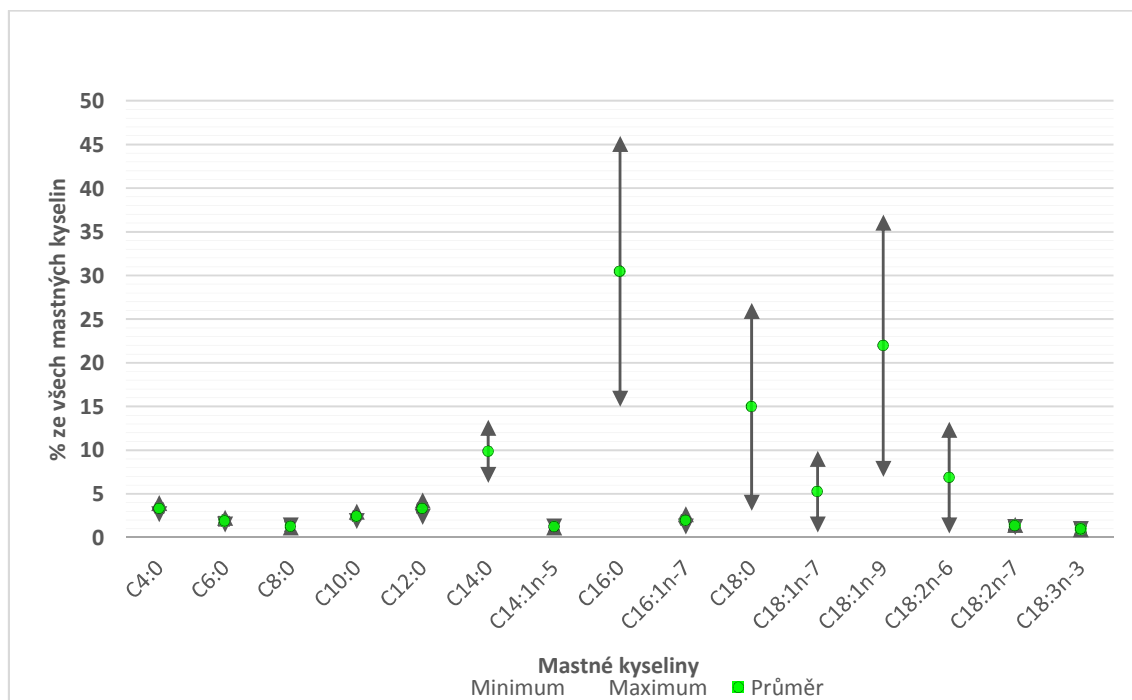
V mléčném tuku se objevuje více než 400 MK (Jensen, 2002; Parodi, 2004). Označování a zastoupení hlavních MK v mléčném tuku znázorňují tabulka 2 a graf 1.

Tabulka 2: Označování významných mastných kyselin mléčného tuku a jejich skupin

Skupina a zkratka	Triviální název	Systematický název
Nasyčené (SFA)		
C4:0	máselná	butanová
C6:0	kapronová	hexanová
C8:0	kaprylová	oktanová
C10:0	kaprinová	dekanová
C12:0	laurová	dodekanová
C14:0	myristová	tetradekanová
C16:0	palmitová	hexadekanová
C18:0	stearová	oktadekanová
C20:0	arachová	eikosanová
C22:0	behenová	dokosanová
Nenasycené monoenové (MUFA)		
C14:1n-5	myristolejová	9 <i>cis</i> -tetradecenová
C16:1n-7	palmitolejová	9 <i>cis</i> -hexadecenová
C18:1n-9	olejová	9 <i>cis</i> -oktadecenová
C18:1n-9	elaidová	9 <i>trans</i> -oktadecenová
C18:1n-7	vakcenová (TVA)	11 <i>trans</i> -oktadecenová
C22:1n-9	eruková	13 <i>cis</i> -dokosenová
C20:1n-11	gadolejová	9 <i>cis</i> -eikosenová
Nenasycené polyenové (PUFA)		
C18:2n-7	izomer konjugované linolové (CLA)	9,11 <i>cis</i> -, <i>trans</i> -oktadekadienová
Řada n-6		
C18:2n-6	linolová	9,12 <i>cis</i> -, <i>cis</i> - oktadekadienová
C18:3n-6	γ - linolenová	6,9,12 all- <i>cis</i> -oktadekatrienová
C20:4n-6	arachidonová (ARA)	5,8,11,14 all- <i>cis</i> -eikosatetraenová
Řada n-3		
C18:3n-3	α - linolenová (ALA)	9,12,15 all- <i>cis</i> -oktadekatrienová
C20:5n-3	timnodová (EPA)	5,8,11,14,17 all- <i>cis</i> -eikosapentaenová
C22:6n-3	cervonová (DHA)	4,7,10,13,16,19 all- <i>cis</i> -dokosahexaenová

Zdroj: Samková et al. (2008), upraveno

Graf 1: Zastoupení hlavních mastných kyselin (MK) mléčného tuku



Zdroj: Moate et al. (2007), upraveno

Vlastnosti a reakce MK komplexně popsali Velíšek et Hajšlová (2009), některé významné jsou uvedeny níže:

1) **Bod tání a varu** závisí na počtu atomů uhlíku, ale při počtu uhlíků nad 20 se již příliš nemění. Mastné kyseliny s lichým počtem uhlíku mají nižší bod tání než MK se sudým počtem uhlíku, nenasycené mají nižší bod tání než nasycené. Velký vliv na bod tání má *cis* vazba. *Cis*-izomery mají bod tání o několik desítek stupňů nižší než odpovídající *trans*-izomery. Bod tání závisí také na krystalické modifikaci dané různým sklonem řetězců MK ke krystalové rovině. Jak doplňují Walstra et al. (2006) bod tání MK je také ovlivněn pozicí dvojné vazby. Bod varu roste s rostoucím počtem atomů uhlíku, dvojné vazby mají vliv malý.

2) **Esterifikace** je vznik esterů MK s alkoholy za přítomnosti katalyzátorů - kyselin nebo enzymů. Walstra et al. (2006) popisují také transesterifikaci způsobující přesun zbytků MK přes pozice na molekulách triacylglycerolu (TAG). Tím se zabraňuje vzniku *trans*-izomerů MK, čehož se v současné době využívá k výrobě moderních rostlinných tuků.

3) **Enzymová hydrogenace** probíhá v bachoru za účasti bachorové mikroflóry. Dochází při ní k přeměně UFA na SFA. Walstra et al. (2006) k tomuto dodávají, že díky tomu většina MK přechází z trávicího traktu jako nasycená. Hydrogenace snižuje počet dvojných vazeb, a proto se zvyšuje podíl tuku tajícího při vyšších teplotách.

4) **Izomerace**, dochází ke změně dvojně vazby nenasycených MK svou sférickou konfigurací (geometrická izomerace) nebo se posouvá dvojná vazba (polohová izomerace). Kyseliny s vyšším stupněm nenasycenosti mají více geometrických izomerů a izomerace PUFA probíhá rychleji nežli u MUFA. Při polohové izomeraci dochází k posunu dvojně vazby směrem od karboxylu nebo k němu a probíhá často společně s geometrickou *cis-/trans-* izomerací za obdobných podmínek.

5) **Autooxidace** je nejvýznamnější reakce. Rychlost oxidace závisí na struktuře a koncentraci reagujících látek a na reakčních podmínkách (záhřev, ozáření, viditelné světlo, reakce s jiným volným radikálem, reakce s kovy, koncentrace kyslíku a aktivita vody). Při běžné teplotě (20 °C) jsou oxidovány jen nenasycené MK, přičemž čím více dvojných vazeb, tím probíhá oxidace rychleji. Méně stabilní jsou i *cis*-izomery, MK s konjugovanými vazbami a volné MK. Walstra et al. (2006) zmiňují význam oxidace ve vztahu ke vzniku cizího pachu mléka (např. po loji, tuku, rybách nebo kovový pach). Autooxidace mléčného tuku obvykle začíná na membráně tukové kuličky, kde jsou fosfolipidy.

6) **Rozpustnost**, MK jsou málo rozpustné ve vodě ve své nedisociované acidické formě, přičemž jsou poměrně hydrofilní jako draselné nebo sodné soli. Rozpustnost ve vodě klesá s přibývajícím počtem atomů uhlíku v molekule.

2.1.2 Biosyntéza mastných kyselin mléčného tuku

Triacylglyceroly mléčného tuku jsou syntetizovány v sekrečních buňkách mléčné žlázy z glycerolu a MK, které pochází ze dvou zdrojů, a to z krevních lipidů a dále jsou syntetizovány *de novo* v sekrečních buňkách mléčné žlázy (Navrátilová et al., 2012). Wiking et al. (2010) uvádějí, že MK s délkou uhlíkového řetězce C4:0-C14:0 a dále polovina z C16:0 jsou tvořeny *de novo*, zatímco druhá polovina C16:0 a MK s delším řetězcem pocházejí z krmiva a tkáňových rezerv. Z krve jsou využívány lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL=very low density lipoproteins), které jsou lipoproteinlipázou stěn krevních kapilár hydrolyzovány na volné MK,

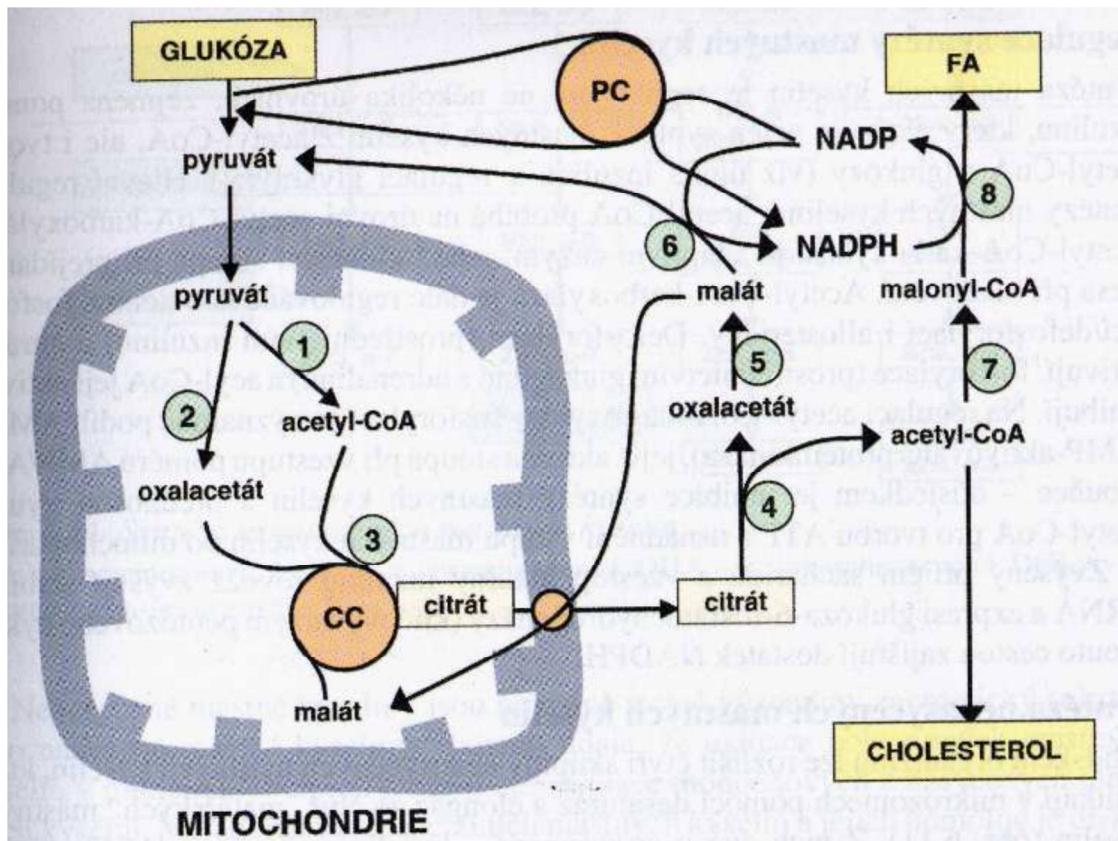
monoacylglyceroly, diacylglyceroly a glycerol. Vzniklé produkty jsou resorbovány a využity pro syntézu mléčného tuku. Základním prekursorem pro syntézu MK je acetyl-CoA, vznikající u přežvýkavců z kyseliny octové nebo oxidací kyseliny β -hydroxymáselné (Navrátilová et al., 2012). Obě kyseliny jsou produkovány mikrobiologickou fermentací celulózy v bacheru (Kepler et al., 1966; Jenkins et McGuire, 2006), přičemž hlavní úlohu plní především bakterie, zatímco role prvoků a anaerobních mikroskopických plísní je omezená (Chilliard et al., 2007).

Pro biosyntézu MK nezbytný acetyl-CoA vzniká v mitochondriích sekrečních buněk. Odtud se dostává pomocí specifického transportního systému do cytosolu, kde probíhá převážná část biosyntézy MK (Obrázek 1). Proces katalyzuje multienzymový komplex nazývaný syntáza MK. Jeho součástí je protein přenášející acylové skupiny (ACP= *acyl-carrier protein*). Ten obsahuje, podobně jako CoA, fosfopantotheinovou skupinu, která tvoří thioestery s ACP (Samková et al., 2008).

Mastné kyseliny pocházející z krve nebo ze syntézy v mléčné žláze mohou být desaturovány díky aktivitě stearoyl-CoA desaturázy (SCD), která je zodpovědná za endogenní produkci některých MUFA (zejména C18:1; C16:1 a C14:1) a všech blízkých izomerů konjugované linolové kyseliny (CLA) (Soyeurt et al., 2008). Arnould et Soyeurt (2009) doplňují, že až 90 % izomerů CLA vzniká díky aktivitě tohoto enzymu v mléčné žláze.

Mastných kyselin vytvořených *de novo* je v průměru 40 % ze všech MK mléčného tuku, zatímco MK pocházejících z krmiva je kolem 60 % (Chilliard et al., 2000; tabulka 3).

Obrázek 1: Transport acetyl-CoA z mitochondrií do cytosolu cestou citrátu a hlavní zdroje NADPH pro syntézu mastných kyselin



1 – pyruvátdehydrogenáza, 2 – pyruvátkarboxyláza, 3 – citrátsyntáza, 4 – ATP-citrátlyáza, 5 – malátdehydrogenáza, 6 – NADP-malátdehydrogenáza, 7 – acetyl-CoA-karboxyláza, 8 – syntéza MK, CC – citrátový cyklus, PC – pentózový cyklus

Zdroj: Holeček (2006)

Tabulka 3: Původ mastných kyselin pro syntézu mléčného tuku

Mastná kyselina - počet uhlíků v molekule	Syntéza <i>de novo</i> v mléčné žláze (%)	Krevní lipoproteiny (%)
C4:0-C10:0	100	0
C12:0	80-90	10-20
C14:0	30-40	60-70
C16:0	20-30	70-80
C18:0	0	100

Zdroj: Navrátilová et al. (2012)

2.1.3 Nasycené mastné kyseliny (SFA)

Nasycené MK obsahují 4 až 60 atomů uhlíku a zpravidla mají rovný nerozvětvený řetězec nejčastěji o sudém počtu atomů uhlíku. Dle počtu atomů uhlíku, tj. délky řetězce, se rozeznávají nižší nasycené MK (C4 – C6), MK se středně dlouhým řetězcem (C8 – C12), s dlouhým řetězcem (C14 – C18), velmi dlouhým řetězcem (C20 – C26) a ultra dlouhým řetězcem (C28 – C38). Nasycené MK mléčného tuku představují 53 až 72 % z celkového množství MK. Mezi nejdůležitější kyseliny patří palmitová, stearová a myristová (Velíšek et Hajšlová, 2009). Jak dodávají někteří autoři (Jensen, 2002; Mensink, 2005; Belitz et al., 2009), zastoupení kyseliny palmitové je vysoké, a to 26 až 35 %, kyselina stearová je zastoupena 5 – 15 % a kyselina myristová cca 10 %.

2.1.4 Nenasycené mastné kyseliny (UFA)

2.1.4.1 *Monoenové mastné kyseliny (MUFA)*

Monoenové MK C14 – C18 tvoří v mléčném tuku 26 – 42 % všech MK. Nejběžnější MUFA je kyselina olejová, která tvoří zhruba 20 až 30 % všech MK mléčného tuku. Jedná se o *cis*-izomer s polohou dvojně vazby na 9. uhlíku - 9 *cis*- C18:1, v menším množství se v mléčném tuku vyskytují kyseliny myristolejová a palmitolejová. Ostatní MK s jednou dvojnou vazbou jsou zastoupeny v množství zpravidla menším než 1 % (Samková et al., 2008).

Monoenové MK vznikají zavedením dvojně vazby do polohy Δ 9 od uhlíkového atomu karboxylové skupiny, za katalýzy enzymem SCD. Desaturací kyseliny stearové (C18:0) vzniká kyselina olejová (18:1 n-9), z kyseliny palmitové (C16:0) je to kyselina palmitolejová (16:1 n-7). Monoenové MK řady n-9 s 20 až 24 uhlíky jsou elongačními produkty kyseliny olejové a MK řady n-11 jsou desaturační a elongační produkty kyseliny arachové (C20:0) (Žák et al., 2011).

2.1.4.2 *Polyenové nenasycené mastné kyseliny (PUFA)*

Polyenové MK se obvykle nazývají jako „zdravé tuky“, zvláště pro jejich účinek na obsah cholesterolu v krvi (Haug et al., 2007; Arnould et Soyeurt., 2009). Řadí se sem například kyselina α -linolenovou (C18:3n-3), která v organismu přechází na kyselinu eikosapentaenovou (EPA) a dokosahexaenovou (DHA). Kyselina linolová (C18:2n-6) v organismu konvertuje na kyselinu arachidonovou (ARA) (Grofová, 2010). Bachorové

bakterie mají extrémně vysokou úroveň biohydrogenační aktivity ve vztahu k PUFA, a proto zastoupení PUFA v mléčném tuku a následně v mléčných produktech je velmi nízké (Dewhurst, 2013). V mléčném tuku se PUFA vyskytují nejčastěji s počtem uhlíku C16 až C20 v množství zhruba 2 – 6 % (Welch et al., 1997). Obsahově nejvíce zastoupené jsou v mléčném tuku kyselina linolová a α -linolenová (Samková et al., 2008).

Jednou z nejvíce studovaných PUFA je CLA. Souhrnný název je označením pro polohové a geometrické izomery kyseliny linolové. Dvojně vazby v molekule CLA nejsou odděleny methylenovou skupinou, jako je tomu u kyseliny linolové, ale jsou konjugované, tzn. dvojně vazby jsou odděleny jednou jednoduchou vazbou. Teoreticky by dvojně vazby mohly existovat v jakémkoliv místě od 2 do 18 atomů uhlíku, a tudíž by vytvářely řadu možných izomerních struktur. Izomery CLA zahrnují *cis-cis*, *cis-trans*, *trans-cis* a *trans-trans* formy s konjugovanými dvojnými vazbami v polohách 7 a 9, 8 a 10, 9 a 11, 10 a 12, 11 a 13 nebo 12 a 14 (počítáno od koncové karboxylové skupiny), což celkem zahrnuje 28 možných izomerů CLA (Kopečný, 2004; Kelley et al., 2006). Walstra et al. (2006) popisují původ CLA z bacherové fermentace, ale obsah jejich prekurzorů v krmivu je značně proměnlivý. Z tohoto důvodu se i její zastoupení v mléčném tuku liší v závislosti na krmivu. Velíšek et Cejpek (2008) popisují studie, které prokázaly, že izomer CLA *cis-9*, *trans-11* zastupuje v mléčném tuku více než 90 % všech izomerů CLA. Zastoupení CLA se v mléčném tuku pohybuje od 2 do 28 mg.g⁻¹, Kopečný (2004) udává hodnoty od 3 do 6 mg.g⁻¹.

2.1.5 Minoritní skupiny mastných kyselin

V mléčném tuku se nacházejí MK s lichým počtem uhlíků a rozvětvené MK ve velmi malém množství. Mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků C5:0 až C11:0 byly nalezeny jako oxidační produkty MK s dlouhým řetězcem, nikoli však v esterifikované formě. Rozvětvené MK spolu s MK s lichým počtem uhlíků C13:0 až C19:0 jsou někdy označovány zkratkou OBCFA (odd- and branched chain fatty acids) a jsou syntetizovány bakteriemi žijícími v bacheru (Velíšek et Hajšlová, 2009; Vlaeminck et al., 2006). Minoritními MK jsou rovněž volné MK, které se v mléčném tuku vyskytují do 0,1 % (Jensen, 2002). Zastoupení volných MK v mléce je ukazatelem výživy dojníc a jejich vyšší zastoupení způsobené lipolýzou může poškodit kvalitu mléčných výrobků (Hanuš et al., 2008).

2.2 Problematika zdravotního významu mastných kyselin

Mastné kyseliny plní v organismu řadu funkcí, především strukturálních a regulačních. Jsou součástí fosfolipidů buněčných membrán, mají vliv na jejich permeabilitu, fluiditu a funkci membránových receptorů. Mastné kyseliny dále působí na genovou expresi pomocí ovlivnění aktivity transkripčních faktorů. Mastné kyseliny jsou také ligandy několika nukleárních receptorů, které kontrolují řadu metabolických pochodů na subcelulární úrovni. Hydroxy MK zodpovídají za expresi prozánětlivých cytokinů a adhezivních molekul, navíc jsou aktivátory některých nukleárních faktorů (Dlouhý, 2007; Tvrzická et al., 2008). Jejich důležitost pro lidský organismus je dána jednak účastí na životně důležitých metabolických procesech a jednak jako součást TAG jsou zdrojem energie, poněvadž 1 g TAG poskytuje tělu 37 kJ. Je třeba mít na paměti, že skladba MK ve stravě je velmi významným faktorem působícím při vzniku různých, především srdečně cévních (kardiovaskulárních) onemocnění (KVO). Některé MK jsou výrazně škodlivé, avšak jiné jsou zase výrazně protektivní (Steinhausarová et al., 2010). Triacylglyceroly potravy jsou nejprve štěpeny slinnými lipázami dutiny ústní a dále žaludečními lipázami (Parodi, 2004). Lipázy přednostně hydrolyzují sn-3 pozici MK a proto selektivněji uvolňují kratší kyseliny. Výsledkem je průchod 4:0 – 10:0 žaludeční stěnou do žil a transport do jater, kde jsou oxidovány. Kolem 25 – 40 % TAG je zpracováno v žaludku (Jensen, 2002). Holeček (2006) dodává, že zbývající a to většinová část je štěpena v tenkém střevě, konkrétně dvanáctníku, pomocí pankreatických enzymů.

Člověk však neumí vytvořit MK s více dvojnými vazbami (esenciální MK). Aby se zabránilo jejich nedostatku, a tím vzniku patologických stavů, je třeba přijímat je v potravě. Jedná se o kyselinu linolovou a kyselinu α -linolenovou (Pánek et al., 2002).

Příjem jednotlivých MK ve stravě se má řídit jejich zastoupením. Obecně se předpokládá, že by měl být poměr SFA : MUFA : PUFA = 1 : 1,4 : 0,6 (Pánek et al., 2002). Podle doporučení WHO et FAO (1998) by měl být poměr 1,3 : 2 : 1. Jak zdůrazňuje Komprda (2003), tento poměr v potravě ovlivňuje složení esterů cholesterolu a tedy zda budou přednostně vázány na LDL (*low density lipoproteins*) nebo HDL (*high density lipoproteins*).

Výživová doporučení týkající se zdravotních problémů souvisejících s výživou jsou postavena především na příjmu rostlinných tuků s nízkým zastoupením SFA. Bylo

prokázáno, že při nižším příjmu plnotučných mléčných výrobků a vyšším příjmu rostlinných olejů a margarínů bohatých na MUFA a PUFA se zlepšuje citlivost na inzulin. Dále se omezuje KVO, a to díky změně poměru HDL/LDL-cholesterolu a TAG v krevním séru (Risérus et al., 2009; Astrup et al., 2011). Společnost pro výživu (2005) občana ČR nabádá k omezení podílu nasycených tuků ve stravě – přívod SFA by měl klesnout pod 10 % energetického příjmu, optimum 7 – 8 % energetického příjmu. Jak doplňuje Müllerová (2003) maximální denní doporučená dávka pro SFA je 5,6 – 7,0 g. Tomuto v případě plnotučného mléka odpovídá jedna větší sklenice (tabulka 4). Tabulka 5 dále uvádí složení MK u másel dostupných v tržní síti.

Pro PUFA bylo stanoveno minimum spotřeby na 3 % z celkové denní kalorické hodnoty naší stravy, čemuž odpovídá 8 g denně, z nichž by minimálně 6 g mělo být ve formě kyseliny linolové (WHO et FAO, 1998).

Tabulka 4: Obsah tuku a zastoupení nasycených mastných kyselin (SFA) v konzumním mléce

Typ mléka	% tuku	g tuku v 200 ml	g SFA v 200 ml
Plnotučné	3,50	7,00	4,41
Polotučné	1,50 – 1,80	3,00 – 3,60	1,89 – 2,27
Odtučněné	0,50	1,00	0,63

Zdroj: Müllerová (2003)

Tabulka 5: Složení mastných kyselin másel dostupných na českém trhu

Výrobek (% obsah tuku)	SFA (%)	MUFA (%)	n-3 (%)	n-6 (%)	TFA (%)
Euroshopper (60 %)	70,9	22,3	0,5	1,8	1,9
Máslo se smetanovým zákysem (75 %)	74,6	18,6	0,3	1,9	2,3
Jihočeské nedělní máslo (77 %)	69,2	23,6	0,5	2,1	2,3
Jihočeské máslo (82 %)	69,9	23,1	0,5	2,0	2,2
Máslo (82 %)	70,4	22,3	0,5	1,9	2,3
Máslo PRESIDENT (82 %)	71,7	21,4	0,5	1,5	2,0
Stolní máslo jihočeské (82 %)	71,8	21,5	0,5	1,7	2,1
Šumava tradiční máslo (82 %)	72,1	21,1	0,4	1,9	2,0

Zdroj: Brát et Dostálová (2007)

2.2.1 Pozitivní účinky mastných kyselin v organismu

Pozitivní vliv některých MK je možno spatřovat zejména ve snižování hladiny cholesterolu a TAG v krvi, tedy jako prevence vzniku KVO. Dalšími zmiňovanými jsou např. účinky antimikrobiální, antikarcinogenní nebo protizánětlivé.

Ve vztahu k prevenci KVO lze jmenovat zejména kyselinu stearovou, omega-3 PUFA, CLA, MUFA a omega-6 PUFA. Kyselina stearová snižuje podle řady autorů (Kris-Etherton et al., 2005; Mensink, 2005; Bauman et al., 2006) hladinu rizikových lipidových ukazatelů – LDL-cholesterolu, celkového cholesterolu a TAG v krevní plazmě a zároveň působí na zvyšování hladiny HDL-cholesterolu. Omega-3 PUFA podle Grofové (2010) snižují hladinu TAG v krvi.

Podle Dostálové (2011) snižují hladinu celkového a LDL-cholesterolu i MUFA. Stránský (2007) zmiňuje především kyselinu olejovou, jejíž vyšší příjem ve stravě snižuje aterogenní efekt.

Patrně nejvíce ze všech MK snižují hladinu LDL-cholesterolu omega-6 PUFA, nevýhodou je však současné snížení hladiny HDL-cholesterolu (Dlouhý, 2007). Zejména kyselina linolová má silný hypocholesterolemický efekt na hladinu cholesterolu v krevní plazmě (Suchánek et Poledne, 2001). Jak potvrzují Thijssen et al. (2005), Merchant et al. (2008) a Siri-Tarino et al. (2010) náhradou 5 % energie ze SFA za energii z omega-6 PUFA se sníží riziko KVO o 42 %.

V souvislosti s antimikrobiálními účinky jsou to především některé MK ze skupiny SFA, jejichž vliv potvrzují např. Topping et al. (2001). Sun et al. (2002) upřesňují, že tento vliv mají MK C6:0 až C12:0, případně jejich monoacylglyceroly. Inhibiční účinky byly potvrzeny nejen např. na koliformní mikroorganismy (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*), ale také na patogenní mikroorganismy způsobující záněty mléčné žlázy dojníc (např. *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*) či alimentární nákazy u člověka (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*) (Samková et al., 2008).

Jako antikarcinogenní se pak projevují omega-3 PUFA (Felix, 2007), některé SFA s lichým počtem uhlíků a rozvětvené SFA (OBCFA) (Samková et al., 2008), přírodní TFA živočišného původu (Brát et Dostálová, 2007) a také kyseliny olejová a α -linolenová (Haug et al., 2007). Jak uvádí Grofová (2010), protizánětlivé účinky mají

omega-3 PUFA. Dastych (2012) doplňuje, že u septických pacientů snižují omega-3 PUFA komplikace a zkracují dobu hospitalizace.

Dalšími vlastnostmi omega-3 PUFA jsou podle Grofové (2010) antiarytmické nebo antitrombotické účinky. Felix (2007) ještě uvádí jejich účinek proti vysušování pokožky, neboť zadržují vodu uvnitř buňky a jsou také tzv. „potravinou“ pro mozek, protože jsou součástí šedé kůry mozku. Pozitivní efekt na odbourávání tukové tkáně má CLA (Thom et al., 2001), a jak Mills et al. (2011) dodávají, právě mléčný tuk je jejím hlavním zdrojem.

2.2.2 Mastné kyseliny a onemocnění

V celosvětovém zájmu současné medicíny je tzv. metabolický syndrom, jehož vznik je ovlivněn také stravou. Metabolický syndrom je charakterizován celou řadou rizikových faktorů jako např. centrální obezitou, inzulinovou rezistencí, KVO, dyslipidemií, hypertenzí nebo aterosklerózou (Miranda et al., 2005; van Dijk et al., 2009; Svačina et al., 2011). Odhaduje se, že metabolickým syndromem trpí 20 – 30 % dospělé evropské populace a ve vyšších věkových kategoriích je to až 40 %. V České republice je výskyt metabolického syndromu ve věkové kategorii 24 – 65 let u mužů přibližně 32 % a u žen 24 % (Bošanská, 2010).

Kardiovaskulární onemocnění jako jeden z nejrizikovějších faktorů metabolického syndromu způsobují v České republice i v Evropě nejvíce úmrtí. Nejčastější příčinou KVO je mj. pokles hladiny HDL-cholesterolu, zvýšení hladiny LDL-cholesterolu, arteriální hypertenze, diabetes mellitus a nově navíc rizikové faktory související s inzulinovou rezistencí (Woodside et al., 2008; Svačina et al., 2011).

Metabolický syndrom tedy ovlivňují i MK a to zejména ve vztahu k cholesterolu a inzulinu.

2.2.2.1 *Mastné kyseliny a cholesterol*

Velkým rizikovým faktorem vzniku KVO je zvýšená hladina cholesterolu, který se hromadí v cévách v podobě tzv. aterosklerotických plátů (Parodi, 2009; Badimon et Vilahur, 2012). K tomuto hromadění přispívají i některé SFA, zejména kyseliny palmitová, myristová a laurová, a dále pak TFA.

Kyselina palmitová zvyšuje hladinu celkového a LDL-cholesterolu. Velký vliv na vzrůst hladiny cholesterolu v krevní plazmě má dobrá vstřebatelnost této kyseliny ze stravy, a to až v 95 – 98 % (German et Dillard, 2004; Fernandez et West, 2005).

Největší vliv na zvýšení koncentrace cholesterolu má kyselina myristová (Fernandez et West, 2005; Crupkin et Zambelli, 2008; Lottenberg et al., 2012), která v porovnání s kyselinou laurovou a palmitovou výrazně zvyšuje hladinu LDL-cholesterolu, a tedy i hladinu celkového cholesterolu v krevní plazmě (Suchánek et Poledne, 2001). Bradbury et al. (2010) uvádějí, že kyselina myristová je jednou z hlavních SFA, která je spojována se zvýšeným rizikem ischemické choroby srdeční (ICHS).

Také kyselina laurová je podle Bradbury et al. (2010) spojena s vysokou hladinou cholesterolu v krevní plazmě. Údaje o míře vlivu působení této MK však nejsou jednotné. Předpokládá se, že nepatrně zvyšuje hladinu celkového a LDL-cholesterolu, ale nemá žádný vliv na hladinu HDL-cholesterolu (Suchánek et Poledne, 2001). Rovněž podle autorů Crupkin et Zambelli (2008); Fernandez et West (2005); Lottenberg et al. (2012) je kyselina laurová ve vztahu k hladině cholesterolu dokonce o dvě třetiny méně „účinná“ než kyselina palmitová.

Jak zjistili např. Thijssen et al. (2005), Merchant et al. (2008) a Siri-Tarino et al. (2010), hladiny celkového cholesterolu zvyšují také TFA. Prospektivní kohortové studie hodnotící obvyklou konzumaci TFA ve vztahu ke KVO zjistily, že při příjmu 2 % energie z TFA se zvýší riziko KVO o 24 % (Mozaffarian et Clarke, 2009; Uauy et al., 2009). Toto tvrzení podporuje i jedna z největších a nejdůkladnějších studií, v níž se v průběhu 14 let sledovalo přes osmdesát tisíc amerických žen (Dlouhý et Anděl, 2006).

2.2.2.2 Mastné kyseliny a inzulin

Existuje stále více důkazů, že zvýšené množství SFA ve stravě hraje důležitou roli ve vývoji inzulinové rezistence. Inzulinová rezistence je vlastně podkladem zmíněného metabolického syndromu. Inzulin jako hormon působí na vstup glukózy do buněk (svalových, jaterních, tukových), čímž se snižuje hladina krevní glukózy. V jaterních buňkách se z glukózy syntetizuje zásobní glykogen, který je v případě nutnosti využit. Pokud buňky neodpovídají/či málo odpovídají na inzulin, v krvi se zvyšuje hladina glukózy, snižuje se syntéza glykogenu v játrech, v tukové tkáni se zvyšuje odbourávání TAG a dochází k uvolňování MK do krevní plazmy. Pankreas reaguje zvýšenou

produkcí inzulínu, čímž se současně zvýší hladina inzulínu i krevní glukózy. V konečném důsledku dochází k rozvoji diabetes mellitus 2. typu. Proto také mnohé studie naznačují, že strava s vyšším podílem SFA a relativně nižším podílem kyseliny linolové může jeho rozvoj predikovat (Crupkin et Zambelli, 2008; Montecucco et al., 2008; Riséus et al., 2009).

2.2.2.3 *Mastné kyseliny a ostatní zdravotní komplikace*

Mastné kyseliny (zejména SFA a TFA) figurují i v řadě dalších zdravotních komplikací a onemocnění jako např. v zánětlivých procesech, Alzheimerově chorobě, rakovině, hypertenzi či vývoji plodu.

Strava bohatá na SFA vede k prozánětlivému profilu v tukové tkáni (Riccardi et al., 2004; Grassi et al., 2009; van Dijk et al., 2009). Studie *in vitro* ukázaly, že zejména SFA (nejvíce kyselina laurová) iniciují TLR4 (TLR- Toll-Like receptory zprostředkovávající spojení mezi MK, zánětem a inzulínovou rezistencí) signalizaci v makrofázích, které spustí zánětlivou reakci. Signalizační dráha TLR4 byla také označena za klíčový mediátor škodlivých účinků kyseliny palmitové na zánět, poruchy endotelové signalizace a přenos inzulínového signálu (Funaki, 2009; Kennedy et al., 2009; Riséus et al., 2009).

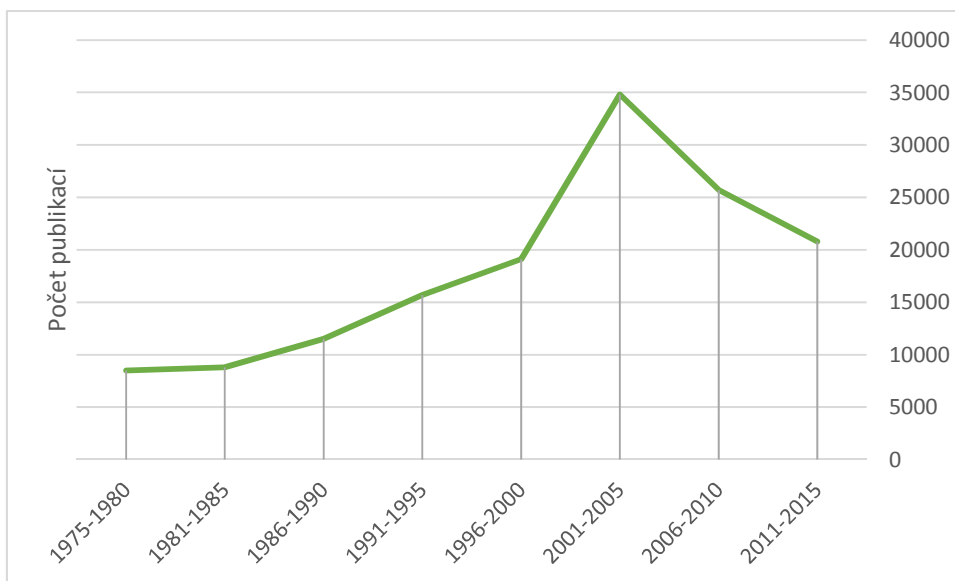
Dále současné studie ukazují, že zvýšený příjem SFA může hrát ústřední roli v patologické hyperfosforylaci tau proteinu u Alzheimerovy choroby (Mattson, 2004; Patil et Chan, 2005) nebo ve zvýšení hodnoty krevního tlaku (Miranda et al., 2005; Svačina et al., 2011).

Podle některých studií mohou TFA negativně ovlivňovat vývoj plodu. Tento vliv je způsoben jejich zasahováním do metabolismu vysoce nenasycených MK, tedy kyselin ARA a DHA, které jsou pro vývoj plodu velice důležité (Larque et al., 2001; Dalainas et Ioannou, 2008). Někteří autoři (Mozaffarian, 2006; Kris-Etherton, 2010) dávají do souvislosti příjem TFA se zvýšeným rizikem rozvoje nádorových onemocnění.

2.3 Legislativní požadavky ve vztahu k mastným kyselinám

Celosvětový výzkum v problematice MK za posledních 40 let zaznamenal jasný růst. Pokud zadáme do internetového vyhledávače <https://scholar.google.cz/> požadavek s vyhledáním klíčových slov: „fatty acids milk“, zjistíme největší počet vydaných vědeckých článků v období mezi lety 2000-2005 (graf 2).

Graf 2: Počet vydaných vědeckých článků týkajících se mastných kyselin v mléce za uplynulých 40 let



S tímto vývojem patrně souvisí i prvotní impulzy a požadavky na označování potravin ve vztahu k MK. V roce 2003 vydala dánská vláda finální verzi předpisu a stala se tak první zemí na světě, která zahájila omezování množství *trans*-izomerů MK. Po opakovaných jednáních v Evropské komisi tak Dánsko vyhlásilo, že od 1. června 2003 všechny margaríny v maloobchodní síti musí obsahovat méně než 2% *trans* nenasyčených MK (TFA) a od 1. ledna 2004 musí být také sníženy na stejné množství i obsahy u margarínů pro průmyslové použití. K Dánsku se téhož roku připojily i Spojené státy americké, které vydaly požadavky na uvádění množství TFA společně s ostatními nutričními hodnotami. Toto opatření se stalo součástí zákona o označování potravin a vstoupilo v platnost roku 2006. V říjnu 2004 se otázka TFA dostala na půdu kanadského parlamentu, kde byl prosazován návrh zákona limitovat obsah TFA na hodnotu 2 g na 100 g oleje či tuku. Podle šetření CIAA12 (Konfederace potravinářského

a nápojového průmyslu), které se uskutečnilo v EU v roce 2006, jedna ze tří společností uvedla, že v letech 2005 a 2006 změnila složení u nejméně 50 % svých výrobků. K této změně složení došlo u řady potravin, včetně snídaňových cereálií, nápojů, sušenek, cukrovinek, mléčných výrobků, omáček, polévek, koření, olejů, svačinek a sladkostí (Evropská Komise, 2007).

30. května 2007 vydala Komise EU tzv. Bílou Knihu, kde byla stanovena strategie pro Evropu týkající se zdravotních problémů souvisejících s výživou, nadváhou a obezitou. Mj. se v ní uvádí, že některé členské státy podpořily změnu složení potravin, např. pokud jde o úroveň tuku, SFA a TFA, soli a cukru. Dne 16. července 2009 se Evropský hospodářský a sociální výbor rozhodl vypracovat stanovisko k tématu „Budoucí strategie pro mlékárenský průmysl EU v období 2010-2015 a dále“. V jeho závěrech bylo uvedeno, že k zajištění větší účinnosti mlékárenského průmyslu na úrovni producentů i na úrovni zpracovatelů mléka je třeba vynaložit značné prostředky na inovace, výzkum, vývoj a chov. Na úrovni producentů je třeba zahrnout lepší využití pícnin a krmiv a na úrovni zpracovatelů je třeba vyvíjet nové výrobky. Na obou úrovních je rovněž zapotřebí zavádět nové a lepší technologie, což přinese rozsáhlé investiční náklady (Evropský hospodářský a sociální výbor, 2010).

Zastoupení a označování MK u potravin a dále zdravotní nezávadnost potravin jsou v rámci EU řízeny jednotně evropskými předpisy a dále v rámci každého členského státu je legislativa doplněna vlastními zákony a vyhláškami. Při aplikaci evropského práva se uplatňuje tzv. zásada nadřazenosti, jež v praxi znamená, že evropské právo má vyšší váhu než vnitrostátní právní předpisy daného členského státu.

V následujících podkapitolách jsem se snažila co nejkomplexněji a nejstručněji pojmut legislativní úpravu potravin ve vztahu k mléku, mléčným výrobkům a MK.

2.3.1 Legislativa EU

Obecným, ale nejstěžejnějším nařízením EU ve vztahu ke všem potravinám je **Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002**, které mj. ukládá provozovatelům potravinářského podniku (PPP) povinnost neuvádět na trh potraviny, která není bezpečná. Potravina se nepovažuje za bezpečnou, je-li škodlivá pro zdraví nebo nevhodná k lidské spotřebě. Dalším nařízením z tzv. „hygienického balíčku“, je **Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004**, o hygieně potravin, jež

mj. ukládá povinnost zavést alespoň jeden nebo více stálých postupů založených na zásadách systému stanovení kritických kontrolních bodů, tzv. systém HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*). Ve vztahu k zdravotní nezávadnosti potravin bylo vytvořeno **Nařízení Komise (ES) 2073/2005**, o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Toto nařízení stanovuje limity pro výskyt některých patogenních mikroorganismů, jejich metabolitů a toxinů, jako např. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, stafylokokové enterotoxiny, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, koagulázopozitivní stafylokoky nebo *Bacillus cereus*.

Zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu řeší **Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004**. V tomto nařízení jsou definovány požadavky na PPP, kteří vyrábějí či svážejí syrové mléko a mlezivo; požadavky týkající se mléčných výrobků a výrobků z mleziva; označení a identifikační označení. **Nařízením Komise (ES) č. 1662/2006** se mění příloha III Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, která se týká mléka a mléčných výrobků.

Kontroly živočišných produktů, a tedy i mléka, jsou prováděny zejména v souladu s **Nařízením Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004**, o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat, a dále s **Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 854/2004**, kterým se stanoví zvláštní pravidla pro organizaci úředních kontrol produktů živočišného původu určených k lidské spotřebě. **Nařízením Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1308/2013** se stanovuje společná organizace trhů se zemědělskými produkty. V tomto dokumentu se mléku a mléčným výrobkům věnuje zejména příloha VII, část III; příloha I, část XVI a IV, a hlava II, kapitola II, oddíl 3.

Stěžejním nařízením ve vztahu k označování MK je **Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1169/2011**, o poskytování informací o potravinách spotřebitelům. Článek 30, odstavec 1 mj. stanovuje povinný výživový údaj - obsah SFA, dále odstavec 2 tohoto článku umožňuje poskytnutí doplňujících informací pro spotřebitele na obale potraviny, a to o informaci o množství MUFA a PUFA. Dále příloha I, odstavec 1 objasňuje pojem „výživový údaj“ nebo „výživové označení“, a to ve vztahu k energetické hodnotě u tuků, které jsou charakterizovány skupinami SFA, MUFA a PUFA. V rámci této přílohy jsou jasně uvedeny definice SFA, MUFA, PUFA

a TFA. Nařízení definuje jako referenční hodnotu příjmu u dospělé osoby pro SFA 20 g a také ukládá, že SFA, MUFA a PUFA musejí být na obale uvedeny v gramech. Označování nutričních údajů bude ale použitelné až od 13. prosince 2016.

V poslední době se na trhu s potravinami začal objevovat nový trend. Tím je označování potravin informacemi o různých účincích na organismus. Aby byl spotřebitel chráněn před mylnými informacemi, které by mnohdy mohly sloužit k „zatraktivnění“ prodeje výrobků, EU zavedla celou řadu legislativních opatření. Výživová a zdravotní tvrzení jsou zastřešena **Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006** ze dne 20. prosince 2006. Nařízení bylo přijato i vzhledem k tomu, že existuje celá řada živin a jiných látek, jež mají výživový nebo fyziologický účinek, např. vitamíny, minerální látky včetně stopových prvků, aminokyseliny, esenciální MK, vláknina, různé rostliny a bylinné výtažky, které se mohou vyskytovat v potravinách, a které mohou být předmětem tvrzení. V příloze tohoto nařízení jsou definována výživová tvrzení a podmínky, které se vztahují k MK. Jedná se o tvrzení:

- „s nízkým obsahem nasycených tuků“, které lze použít pouze tehdy, pokud celkový obsah SFA a TFA v produktu nepřesahuje 1,5 g na 100 g v případě potravin pevné konzistence nebo 0,75 g na 100 ml v případě tekutin, přičemž v žádném z těchto případů nesmí celkový obsah SFA a TFA představovat více než 10 % energetické hodnoty.
- „bez nasycených tuků“ lze použít pouze tehdy, pokud celkový obsah SFA a TFA nepřesahuje 0,1 g nasycených tuků na 100 g nebo 100 ml.

Nařízením Komise (EU) č. 116/2010 se seznam výživových tvrzení ve vztahu k MK významně rozrostl. Výživová tvrzení označující potraviny, jež jsou zdrojem těchto živin nebo jsou na tyto živiny bohaté, by proto mohla pomoci spotřebitelům ve výběru zdravějších potravin:

- „zdroj omega-3 mastných kyselin“ znamená potravinu, která je zdrojem omega-3 MK, a jakékoli tvrzení, které má pro spotřebitele pravděpodobně stejný význam, lze použít pouze tehdy, obsahuje-li produkt alespoň 0,3 g kyseliny α -linolenové na 100 g a na 100 kcal nebo alespoň 40 mg celkového obsahu EPA a DHA na 100 g a na 100 kcal.

- „s vysokým obsahem omega-3 mastných kyselin“ označuje potravinu s vysokým obsahem omega-3 MK, a jakékoli tvrzení, které má pro spotřebitele pravděpodobně stejný význam, lze použít pouze tehdy, obsahuje-li produkt alespoň 0,6 g kyseliny α -linolenové na 100 g a na 100 kcal nebo alespoň 80 mg celkového obsahu EPA a DHA na 100 g a na 100 kcal.
- „s vysokým obsahem mononenasycených tuků“ značí potravinu s vysokým obsahem mononenasycených tuků, a jakékoli tvrzení, které má pro spotřebitele pravděpodobně stejný význam, lze použít pouze tehdy, je-li alespoň 45 % MK přítomných v produktu odvozených od mononenasycených tuků, a představují-li mononenasycené tuky více než 20 % energetické hodnoty produktu.
- „s vysokým obsahem polynenasycených tuků“ značí, že se jedná o potravinu s vysokým obsahem polynenasycených tuků, a jakékoli tvrzení, které má pro spotřebitele pravděpodobně stejný význam, lze použít pouze tehdy, je-li alespoň 45 % MK přítomných v produktu odvozených od PUFA, a představují-li polynenasycené tuky více než 20 % energetické hodnoty produktu.
- „s vysokým obsahem nenasycených tuků“ označuje potravinu s vysokým obsahem nenasycených tuků, a jakékoli tvrzení, které má pro spotřebitele pravděpodobně stejný význam, lze použít pouze tehdy, je-li alespoň 70 % MK přítomných v produktu odvozených od UFA, a představují-li nenasycené tuky více než 20 % energetické hodnoty produktu.

Další rozšíření seznamu vychází z **Nařízení Komise (EU) č. 1047/2012**, a jedná se o tato tvrzení:

- „se sníženým obsahem nasycených tuků“ a jakékoli tvrzení, které má pro spotřebitele pravděpodobně stejný význam, lze použít pouze v těchto případech:

a) pokud je celkový obsah SFA a TFA v produktu označeném tímto tvrzením alespoň o 30 % nižší než celkový obsah SFA a TFA v podobném produktu a

b) pokud je obsah TFA v produktu označeném tímto tvrzením stejný jako u podobného produktu nebo nižší.

Schválenými, příp. zamítnutými zdravotními tvrzeními se zabývá mj. **Nařízení Komise (ES) č. 983/2009**, přičemž o schválení či zamítnutí stanovisek rozhoduje EFSA

(*European Food Safety Authority*). V příloze č. 1 nařízení jsou uvedena schválená zdravotní tvrzení, jako např. tvrzení (na žádost společnosti Unilever PLC) pro kyselinu α -linolenovou a kyselinu linolovou:

- „esenciální MK jsou potřebné pro normální růst a vývoj dětí.“ K tomuto tvrzení jsou dále doplněny podmínky užívání tohoto tvrzení.

V příloze č. 2 jsou pak uvedena zamítnutá tvrzení, např.

- „DHA a ARA podporují neurologický vývoj mozku a očí.“

Nařízení Komise (ES) č. 440/2011 rozšířilo seznam schválených zdravotních tvrzení o:

- „DHA přispívá k normálnímu vývoji zraku kojenců do 12 měsíců věku“,
- „příjem DHA z těla matky přispívá k normálnímu vývoji očí plodu v těle matky a kojenců vyživovaných mateřským mlékem“,
- „příjem DHA z těla matky přispívá k normálnímu vývoji mozku plodu v těle matky a kojenců vyživovaných mateřským mlékem“.

Nařízení Komise (EU) č. 432/2012 obsahuje seznam schválených zdravotních tvrzení při označování potravin jiných než tvrzení o snížení rizika onemocnění a o vývoji a zdraví dětí. Dle tohoto seznamu byla schválena následující tvrzení:

- „EPA a DHA přispívají k normální činnosti srdce“,
- „nahrazení SFA UFA ve stravě přispívá k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi. Kyselina olejová je nenasycený tuk“,
- „ALA přispívá k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi“,
- „nahrazení SFA UFA ve stravě přispívá k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi [MUFA a PUFA jsou UFA]“,
- „snížená konzumace SFA přispívá k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi“.

Nařízením Komise (EU) č. 1226/2014 se seznam schválených zdravotních tvrzení v rámci MK rozšířil o tvrzení:

- „bylo prokázáno, že nahrazení SFA ve stravě UFA snižuje hladinu cholesterolu v krvi. Vysoká hladina cholesterolu je rizikovým faktorem pro vznik ischemické choroby srdeční.“

2.3.2 Legislativa v rámci ČR

Pro všechny potraviny uváděné na trh v rámci ČR je klíčový **Zákon č. 110/1997 Sb.**, o potravinách a tabákových výrobcích. Tento zákon je harmonizován s evropskou legislativou a ukládá mj. povinnosti PPP a podnikatelům, kteří vyrábí nebo uvádí na trh potraviny. Potraviny živočišného původu jsou zde definovány jako potraviny, jejichž hlavní surovinou při výrobě jsou těla nebo části těl živočichů, mléko, mlezivo, vejce nebo včelí produkty. V zákoně jsou dále uvedeny povinnosti pro označování potravin a dále povinnosti PPP ve vztahu k zdravotní nezávadnosti potravin.

Dalším důležitým zákonem ve vztahu k mléku je **Zákon č. 166/1999 Sb.**, o veterinární péči. I tento zákon je harmonizován s legislativou EU. Dle tohoto zákona lze uvádět do oběhu pouze mléko, které bylo získáno od zvířat, jejichž zdravotní stav, způsob chovu a výživy neovlivňují nepříznivě jeho zdravotní nezávadnost, a které bylo mlékárensky ošetřeno, jakož i výrobky z tohoto mléka. Požadavek výroby mléčných výrobků z mlékárensky ošetřeného mléka však neplatí, pokud schválený technologický postup vyžaduje se zřetelem na vlastnosti výrobku, aby bylo při jeho výrobě použito mlékárensky neošetřené mléko.

V současné době jsou stále platné požadavky harmonizované **Vyhláškou č. 77/2003 Sb.**, pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Jak uvádí Svaz obchodu a cestovního ruchu ČR (2014), tato vyhláška by měla být ale v blízké době nahrazena novou komoditní vyhláškou. Hlavním důvodem předložení nové vyhlášky je přizpůsobení požadavků na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje přímo použitelným předpisům EU, vědeckým poznatkům a technologickému vývoji v potravinářství. Nezbytnost navrhované právní úpravy vychází ze zkušeností získaných při praktické aplikaci Vyhlášky č. 77/2003 Sb.

Dalšími souvisejícími vyhláškami ve vztahu k mléku jsou **Vyhláška č. 289/2007 Sb.**, o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství a dále **Vyhláška č.**

291/2003 Sb., o zákazu podávání některých látek zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí, a o sledování (monitoringu) přítomnosti nepovolených látek, reziduí a látek kontaminujících, pro něž by živočišné produkty mohly být škodlivé pro zdraví lidí, u zvířat a v jejich produktech.

Mastné kyseliny jsou také jako součást některých potravin pro zvláštní výživu. Těmito potravinami se zabývá harmonizovaná **Vyhláška č. 54/2004 Sb.** V přílohách vyhlášky se mj. pojednává o MK ve vztahu k základnímu složení kojenecké a pokračovací výživy připravené podle pokynů výrobce, a o požadavcích na složení potravin pro redukční diety.

2.4 Faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku

Zastoupení jednotlivých MK i jejich skupin je ovlivněno celou řadou faktorů, které jsou autory převážně rozdělovány do dvou skupin na faktory biologické a na faktory výživy (Palmquist et al., 1993; Jensen, 2002). Z první skupiny patří mezi významné faktory např. plemeno a individualita dojnice, stádium a pořadí laktace (Samková et al., 2012), z druhé skupiny faktorů je důležitá zejména úroveň výživy a skladba krmné dávky (KD), případně poměr mezi objemnými a jadrnými krmivy (Dewhurst et al., 2006).

Podle Baera (1991) a Kelsey et al. (2003) se jednotlivé faktory vzájemně ovlivňují, což vede ke změnám zastoupení MK. Schwendel et al. (2015) ale připomíná, že vzájemné působení faktorů je zatím stále opomíjeno.

2.4.1 Biologické faktory

2.4.1.1 *Plemeno a individualita*

V rámci vědeckých studií jsou v souvislosti se složením mléčného tuku nejčastěji posuzována mléčná plemena. Celosvětově je bezpochyby nejvíce zmiňováno plemeno holštýnské. Z autorů, kteří v nedávné době vyhodnocovali vliv holštýnského plemene, jsou to např. Pilarczyk et al. (2015), Thanh et Suksombat (2015) a Tábăran et al. (2015). Nejčastěji je mezi sebou porovnáváno složení mléčného tuku plemen holštýn a jersey (Morales et al., 2000; White et al., 2001; Palladino et al., 2010; Nantapo et al., 2014;

Kristensen et al., 2015). Mléčný tuk jerseyjských dojnic má vyšší zastoupení kyseliny kapronové, kaprylové, kaprinové, laurové, myristové a stearové a méně kyseliny olejovou v porovnání s mléčným tukem holštýnských krav (Beaulieu et Palmquist, 1995). Jiní autoři se zajímali o porovnání holštýnského a dalších plemen jako brown swiss, montbeliard, belgické modré, tarentaise a normandské (Lawless et al., 1999; Kelsey et al., 2003; Ferlay et al., 2006; Soyeurt et al., 2006a).

Někteří autoři zkoumali také vliv kříženců na profil MK, jako např. Goni et al. (2015) nebo testují klonované jedince jako Bernard et al. (2015), kteří zjistili, že mléčný tuk od klonovaných dojnic měl téměř shodné zastoupení MK jako u neklonovaných jedinců, ale vykazoval vyšší hodnoty u minoritních MK *cis-9 C10:1* and *C17:0*.

Podle Arnoulda et Soyeurt (2009) by genetická variabilita ve složení mléčného tuku mohla být částečně vysvětlitelná polymorfismem některých genů zodpovídajících za syntézu MK. U polymorfismů v *SCD1* a *DGATI* (diacylglycerol O-acyltransferáza 1) genech byla potvrzena spojitost se zastoupením MK. Oba tyto geny se podílejí na zastoupení UFA v mléčném tuku. *SCD1 V* alela má vliv na syntézu UFA z kyselin palmitové a stearové a *DGATI A* alela je spojena s kyselinou stearovou. Wang et al. (2015) dodávají, že molekulární mechanismy syntézy *cis-9*, *trans-11 CLA* v mléčné žláze ještě nejsou plně prozkoumány. Například se domnívají, že fosfoglycerát mutáza negativně ovlivňuje *SCD1* a je zahrnutá do syntézy *cis-9*, *trans-11 CLA* tak, že usnadňuje absorpci *trans-11 C18:1* v mléčné žláze.

Individualitu jedince tak lze využít pro cílenou selekci k dosažení nutričně hodnotnějšího mléka.

2.4.1.2. Stádium a pořadí laktace

Profil MK se liší v průběhu laktace. Během první laktační periody, kdy jsou dojnice často v negativní energetické bilanci, je v mléčném tuku zastoupeno více MK s 18 atomy uhlíku a méně kyselin *C14:0*, *C14:1* a *C16:0*. Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem jsou mobilizovány z tukových zásob a mohou inhibovat elongaci v mléčné žláze (Secchiari et al., 2003). Jak pozorovali Bilal et al. (2014), MK s krátkým a středním řetězcem (*C6:0* až *C14:0*) měly své zastoupení nízké na počátku laktace, ale poté se jejich zastoupení zvyšovalo. Opačný trend vykazovaly MK s dlouhým řetězcem (zvláště kyseliny stearová a olejová) (Bilal et al., 2014). Nantapo et al. (2014) dodávají,

že na začátku laktace bylo pozorováno vyšší zastoupení CLA. Podle Jelínek et Koudela (2003), na konci laktace nastává pozitivní energetická bilance a lipogeneze je tedy mnohem důležitější než lipolýza, což odpovídá odběru cirkulujících MK pro rekonstrukci tkáňových rezerv.

Stoop et al. (2008) doplňují, že stádium laktace výrazně ovlivňuje všechny MK, kromě rozvětvených MK a *trans*-10, *cis*-12 CLA.

Výzkumy byla také zjištěna interakce mezi stádiem laktace a pořadím laktace ($p < 0,01$) (Miller et al., 2006). Dostupná data ukazují, že prvotelky produkují nutričně hodnotnější mléko s vyšším zastoupením UFA, zatímco dojnice na druhé a dalších laktacích mají mléko s vyšším zastoupením SFA (Bilal et al., 2014). Rani et al. (2011) rozdělili dojnice do 3 skupin (1. skupina: 1. – 5. laktace, 2. skupina 6. – 9. laktace a 3. skupina 10. – 13. laktace). Pokusy bylo zjištěno, že 3. skupina měla významně ($p < 0,05$) vyšší hodnoty celkových SFA, MUFA, PUFA, PUFA n-3 a také poměr n-6/n-3 než ostatní skupiny dojnic. Secchiari et al. (2003) či Castillo et al. (2006) se domnívají, že efekt pořadí laktace není významný.

2.4.2 Faktory výživy

Zastoupení MK v mléčném tuku je široce studováno, protože profil MK se rychle a velmi citlivě mění v závislosti na KD (Schwendel et al., 2015). Krmná dávka dojnic se obvykle skládá ze směsi čerstvé píce, konzervované píce a jadrného krmiva, přičemž složení se odvíjí podle ročního období a od konkrétní oblasti (Elgersma et al., 2006).

Čerstvá píce obsahuje průměrně 1 až 3 % MK v sušině, v závislosti na druhu trav, nejvyšší zastoupení MK se obvykle vyskytuje na jaře a na podzim (Bauchart et al., 1984). Kalač et Samková (2010) dodávají, že zastoupení a složení MK v píci je také ovlivňováno podnebím, délkou dne, srážkami, hnojením a fází růstu rostlin.

Wiking et al. (2010) se zaměřili na vliv pastvy čerstvých luskovin (vojtěška a jetel) a krmení kukuřičnou/travní siláží a zjistili, že dojnice pasoucí se na čerstvé luskovině produkují více vakcenové kyseliny (TVA) a CLA než dojnice krmené siláží. Zkrmování rané vojtěško-travní směsi také doporučují Morel et al. (2006), kteří ji upřednostňují před zkrmováním zeleného krmení. Autoři se shodují, že pro redukci MK s krátkým a středním řetězcem je zapotřebí zvýšení čerstvé pastvy v rámci krmné dávky (Bargo et al., 2006; Nantapo et al., 2014). Pastva obecně zvyšuje množství kyseliny olejové,

PUFA a zvláště 18:3n-3 a *cis-9 trans-11* CLA a snižuje SFA se střední délkou řetězce (Chilliard et al., 2007). Podle Hanuše et al. (2010) je však také možné zvýšit např. zastoupení kyseliny olejové, popř. PUFA pomocí krmných tuků a olejů bohatých na UFA s dlouhým řetězcem. Rovněž KD s nižším podílem objemných krmiv a s vyšším podílem koncentrovaných krmiv zvyšují podíl C18:1 v mléčném tuku.

Odborníci se snaží vylepšit nutriční vlastnosti mléka několika způsoby. Z nedávné doby např. Brito et al. (2015) zkoumali interakci mezi kukuřičným krmivem nebo molázou (nestrukturální karbohydrátové doplňky) se směsí ze sóje a slunečnice nebo lněného semínka (bachorem štěpitelné proteinové doplňky). Oba tyto doplňky změnilly profil MK pravděpodobně rozdílným příjmem MK, indexem SCD a bachorovou biohydrogenací. Lerch et al. (2015) prokázali, že dlouhodobé krmení s přidavkem olejnatých semen nahrazuje MK z tkáňových rezerv a může tak ovlivnit složení MK mléčného tuku během rozsáhlé tukové mobilizace tak jako je tomu na počátku laktace.

2.5 Zdravotní nezávadnost mléka

Zdravotní nezávadnost mléka je poměrně širokým pojmem. Tento literární přehled byl pojednán s ohledem na příslušnou publikaci, která vznikla v průběhu studia, a proto je následující kapitola zaměřena pouze na vybrané skupiny mikroorganismů či biologických entit, které představují potencionální biologické riziko.

2.5.1 Priony

Prion (z anglického Proteinaceous Infectious Particle) je fyziologický glykoprotein a má označení PrP^C (c jako cell) (Hořín, 2002). Dormont (2002) uvádí, že je exprimován především v mozku, kde je jeho množství asi padesátkrát vyšší než v případě jiných tkání. Hořín (2002) prion charakterizuje jako strukturu obsahující 210 aminokyselinových zbytků, 2 místa pro glykosilaci, nejméně 4 oktapeptidová místa vázající ionty Cu²⁺ a glykofosfatidylinozitolový (GPI) zbytek, umožňující ukotvení proteinu k buněčné membráně.

Podle Novakofski et al. (2005) je tzv. aberantní forma prionu původcem známých nervových onemocnění člověka a zvířat. Tato forma prionu se označuje zkratkou PrP^{Sc} (Sc jako scrapie- spongiformní onemocnění ovcí a koz). Tento typ prionu je charakterizován autokatalickou podporou přeměny PrP^C molekul na PrP^{Sc} a jeho

kumulace v organismu vede k nervovému poškození a spongiformním změnám v mozku. Např. podle Collinge (2001) a Campana et al. (2005) prion PrP^{Sc} přímým kontaktem mění prion PrP^C na prion PrP^{Sc} a jak doplňuje Gazdová (2004), pokusy bylo prokázáno, že pouhá část matricové molekuly PrP^{Sc} dá vzniknout miniprionům, které dokáží indukovat přetransformování PrP^C. Dormont (2002) k jeho vlastnostem doplňuje, jeho rezistenci k proteáze K, fosfolipáze C, metabolickou stálost, nerozpustnost v detergentech a jeho tendenci k agregaci a polymerizaci. Jak uvádějí Heppner et al. (2001), z důvodu rezistence k proteáze jsou priony označovány jako Prp-res. Pomocí proteinu feritinu prostupují přes střevní sliznici, a dochází tak k překonání mezidruhové bariéry. Prionový protein je velmi odolný i k působení vysokých teplot. Podle Petra (2002) bylo zjištěno, že ačkoliv byly priony vystaveny na 10 minut suchému teplu (600 °C), tak vzniklý popel si z části uchoval schopnost vyvolávat onemocnění. Treml et al. (2014) uvádějí, že vzhledem k tomu, že je prion tvořený bílkovinou tělu vlastní, imunitní mechanismus tuto změnu nepoznává, a proto infekce nevede ke tvorbě specifických protilátek.

Díky všem těmto vlastnostem mohou být priony schopné přenosu ze zvířete na člověka a to i skrze mléko. Weissenbacher (2002) uvádí, že v roce 1993 byly v Anglii evidovány případy chovatelů dojníc, kteří pili mléko od svých krav, které byly nakažené BSE. Po několika letech chovatelé zemřeli na Creutzfeldt-Jakobovu chorobu. Podle Sigurdson et Miller (2003) a Imran et Mahmood (2011) ale epidemiologické a přenosové studie nepotvrdily žádné důkazy o výskytu BSE infekčních PrP^{Sc} v mléce, spermatu ani u embryí.

2.5.2 Víry

Víry jsou nebuněčné organismy, které jsou zcela závislé na hostitelské buňce. Jedná se v podstatě o infekční nukleovou kyselinu (DNA či RNA) obalenou bílkovinnou kapsidou (Treml et al., 2014).

Víry se do mléka dostávají z krve dojnice, fekálním znečištěním nebo z vody. Pokud je mléko ošetřeno pasterizací, dochází k jejich inaktivaci. Víry jsou vysoce infekční, k vyvolání infekce stačí nízký počet virových částic. Nejvýznamnější skupiny virů izolované z mléka jsou rotaviry, polioviry, virus hepatitidy A nebo virus FMD (Foot and Mouth Disease), původce slintavky a kulhavky (Bhunja, 2007) a jak doplňují Kříž et al. (2009), mléko je potenciálním zdrojem viru klíšťové encefalitidy.

2.5.3 Plísně

Plísně jsou ubikvitní mikroorganismy nacházející se ve velké části potravin. Mají vysokou metabolickou aktivitu a mohou mít pozitivní a negativní vliv (Tornadijo et al., 1998). Vlková et al. (2009) plísně řadí do vícebuněčných mikroorganismů (vláknité houby), které tvoří mycelium (podhoubí). Kulturní plísně se používají v sýrařství k uzrávání sýrů, ale divoké v mlékárenských výrobcích škodí. Oproti bakteriím jsou schopny snášet extrémnější podmínky, rostou při nižších hodnotách pH, teplotách a snáší i nižší vlhkost prostředí.

Skrinjar et al. (1995) v syrovém mléce detekovali následující rody: *Absidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gliocladium*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Siemphiliium*, *Trichoderma*, *Ulocladium* a *Verticillium*. Bhunia (2007) k tomuto zjištění doplňuje, že v mléce jsou nejzávažnějšími rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*, které mohou produkovat mykotoxiny přímo do mléka. Skrinjar et al. (1995) v mléce nejvíce nacházeli rody *Aspergillus* a *Penicillium*.

Přítomnost rodu *Aspergillus* v syrovém mléce může být zapříčiněna znečištěným vemenem, struky, vzduchem, ale především samotným krmivem (Ghiasian a Maghsood, 2011). Leila et al. (2010) uvádějí, že plísně tohoto rodu mohou způsobovat invazivní onemocnění, aflatoxikózy a alergické reakce u člověka. Němcová et Kalhotka (2010) uvádí, že nejčastějšími zjišťovanými druhy v syrovém mléce jsou *A. flavus* a *A. parasiticum*. V případě rodu *Penicillium* jsou nejčastěji prokazovány druhy *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum* a *P. commune* (Samson et al., 2004).

Jak ale konstatuje Lavoie et al. (2012), zatím je o diverzitě plísní v syrovém mléce velice málo poznatků.

2.5.4 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotické mikroorganismy patřící do říše hub (*Fungi*) (Bhunia, 2007). Kvasinkami oportunně patogenními, které se v mléce a mléčných výrobcích nejčastěji vyskytují, jsou zástupci *Candida* spp., *Filobasidiella neoformans* nebo *Cryptococcus* spp. Z uvedených patogenů jsou nejobávanější *Candida albicans* a *Filobasidiella neoformans* (Büchl a Seiler, 2011). Snášelová (2011) uvádí ještě kvasinku *Candida lusitanae*, která působí jako mastitidní patogen a způsobuje biochemické změny syrového mléka. Navrátilová et al. (2012) doplňují, že kvasinky i

plísňe přítomné v syrovém mléce lze účinně devitalizovat pasterací. Avšak jimi vyprodukované mykotoxiny i po pasteraci v mléce zůstávají, jak potvrzují např. pro aflatoxin M1 Behfar et al. (2010).

2.5.5 Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické organismy, které se v mléce a mléčných výrobcích běžně vyskytují (Fernandes, 2009). Kromě normální mikroflóry syrového mléka, může být mléko kontaminováno buď primárně či sekundárně i bakteriemi, které mohou způsobit alimentární infekce či intoxikace, jako jsou rody: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Brucella* a dále druhy *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* (Němcová et Kalhotka, 2010). Ryšánek et al. (2009) detekovali nejčastěji v bazénových vzorcích mléka *Enterococcus faecalis* a *Streptococcus uberis*.

Salmonella spp. jsou gramnegativní fakultativně anaerobní peritrichální tyčinky, které netvoří spory. Salmonely byly na základě somatického (O), flagelárního (H) a kapsulárního (Vi) antigenu rozděleny do dvou druhů (*S. enterica* a *S. bongori*), které zahrnují více než 2 tisíce sérovarů (Bhunia, 2007). Poppe (2011) uvádí, že k vylučování salmonel do mléka může dojít, pokud dojnice trpí salmonelózou či je pouze bacilonosičem. Cupáková et al. (2001) zmiňují jako hlavní zdroj těchto agens v prvovýrobě mléka pravděpodobně trávicí ústrojí zvířat a prostředí. Fernandes (2009) dodává, že pasterační teploty salmonely běžně nepřežívají a teploty nad 60 °C po dobu 1 – 10 minut je spolehlivě ničí.

Listeria monocytogenes je ubikvitárně se vyskytující fakultativně anaerobní grampozitivní nesporotvorná bakterie. Jedná se o psychrotrofní bakterii rostoucí v rozmezí teplot 1 – 45 °C, při pH od 4,3 do 10 a při koncentraci NaCl do 10 % (Ryser, 2011). Cupáková et al. (2001) uvádějí, že ve většině případů je příčinou přítomnosti této bakterie v syrovém mléce sekundární kontaminace z prostředí. Byly prokázány kmeny odolné k pasteračním teplotám (Fernandes, 2009).

Staphylococcus aureus je grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie, rostoucí při teplotách od 7 °C do 48 °C, při pH od 4 do 10 a při koncentraci NaCl až 15 % (Fernandes, 2009). Snášelová (2011) uvádí, že enterotoxigenní kmeny *S. aureus* v syrovém mléce představují možné zdravotní riziko pro spotřebitele. Podle Aspergera a Zangerla (2011) se do mléka nejčastěji dostává přímo od dojnice, která trpí

stafylokokovou mastitidou. Další možnost přenosu je od personálu, který může být jeho nosičem a kontaminovat přímo mléko nebo různé vybavení. Do mléka se může bakterie dostat také z okolního prostředí. Fernandes (2009) zmiňuje vysokou termorezistenci jeho enterotoxinu A, který se ničí tepelným záhřevem 130 °C po dobu 2 až 4 sekund.

Bacillus cereus je grampozitivní sporulující tyčinka, fakultativně anaerobní nebo aerobní. Nejnižší teplota pro růst většiny kmenů je 5 – 6 °C, i když z mléka a mléčných výrobků byly izolovány i kmeny rostoucí při 4 °C. Roste při pH od 4,3 až do 9,3 a při koncentraci do 7 % NaCl (Fernandes, 2009). Cupáková et al. (2001) uvádějí, že nejčastěji ke kontaminaci syrového mléka dochází ze znečištěných vemen řetězcem postupných kontaminací: půda → krmivo → zažívací trakt dojnice → hnůj → vemeno → dojení → mléko. V syrovém mléce může být *B. cereus* přítomen ve vegetativní formě i ve formě spor. Fernandes (2009) uvádí, že vegetativní formy nepřežívají pasterační teploty, ale spory jsou proti tepelnému záhřevu velmi odolné.

2.5.6 Paraziti

Na rozdíl od bakterií jsou paraziti v syrovém mléce méně zkoumaní. Podle Navrátilové et al. (2012) se v souvislosti s parazity mléka nejčastěji zmiňují *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis* a *Entamoeba histolytica*. Rinder et al. (2000) detekovali u skotu mikrosporidii *Enterocytozoon bieneusi* a Halánová et al. (1999) jako první potvrdili výskyt mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* na Slovensku. *Encephalitozoon cuniculi* je nejvíce studovanou savčí mikrosporidií, která infikuje celou řadu obratlovců, včetně člověka (Didier et al., 1995). Mikrosporidie jsou jednobuněční paraziti, náleží do říše hub nebo jsou s nimi v úzkém příbuzenském vztahu (Volf et Horák, 2007). Didier et al. (1995) uvádějí, že primárními místy infekce jsou nejčastěji epitelové buňky gastrointestinálního a respiračního traktu a také makrofágy. Claeys et al. (2013) doplňují, že syrové mléko může být kontaminováno již v mléčné žláze díky probíhající infekci anebo v průběhu dojení.

Toxoplasma gondii je velmi rozšířená intracelulární kokcidie, jejímž definitivním hostitelem je kočka. Ačkoliv přirozeným mezihostitelem jsou myšovití, může jím být i člověk, kočka a mnoho dalších živočišných druhů (zjištěno více než 200 druhů). Člověk může být infikován jednak tkáňovými cystami při konzumaci nedostatečně tepelně upraveného masa s tkáňovými cystami, nebo oocystami, které kontaminují vnější prostředí a mohou tedy kontaminovat i např. mléko. Klinické příznaky onemocnění jsou

u lidí vzácné, vyjma imunokompromitovaných jedinců, u nichž se může rozvinout závažné onemocnění pod obrazem zánětu plic nebo encefalitid (Tenter et al., 2000).

Kryptosporidióza je onemocnění způsobené zástupci rodu *Cryptosporidium*. Syrové mléko může být kontaminováno oocystami (*Cryptosporidium parvum*) vylučovanými infikovaným skotem (Navrátilová et al., 2012). Jak dokázali Harper et al. (2002), pitím takto kontaminovaného mléka dochází k nákaze i u člověka.

3 Cíl práce

Cílem práce bylo posouzení změny spektra zdravotně významných mastných kyselin v mléce v závislosti na vybraných faktorech a dále vyhodnocení výskytu vybraných patogenních mikroorganismů ovlivňujících zdravotní nezávadnost mléka.

Disertační práce vznikla jako součást řešení následujících projektů:

- **MZe QH81210:** Analýza možnosti zvýšení hladiny zdraví prospěšných mastných kyselin v syrovém mléce prostřednictvím cílených chovatelských postupů.
- **MZe KUS QJ1510336:** Výzkum a podpora produkce zdravotně a spotřebitelsky benefičních mléčných výrobků cílenou selekcí a modifikací profilu mastných kyselin mléčného tuku.
- **MŠMT ČR MSM 6007665806:** Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním.
- **OP VK CZ.1.07/2.3.00/09.0081:** Komplexní vzdělávání lidských zdrojů v mlékařství.
- **GAJU 011/2013/Z:** Zdraví hospodářských zvířat a zdravotní bezpečnost potravin – genetické, parazitární a nutriční aspekty.
- **GAČR 15-01090S:** Rozkrývání rozmanitosti kryptosporidií: propojení studia genetické variability a biologie parazitů

4 Materiál a metodika

4.1 Zastoupení MK v mléčném tuku

Publikace k danému tématu

1. Samková, E., Čertíková, J., Hasoňová, L., Smetana, P., Špička, J., & Hanuš, O. (2013). Vliv individuality v rámci plemene na složení mléčného tuku skotu. *Mlékařské listy*, 141, 25-28. **viz příloha 1**
2. Samková, E., Čertíková, J., Špička, J., Hanuš, O., Pelikánová, T., & Kváč, M. (2014). Eighteen-carbon fatty acids in milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows following feeding with fresh lucerne (*Medicago sativa* L.). *Animal Science Papers and Reports*, 32 (3), 209-218. **viz příloha 2**
3. Koubová, J., Samková, E., Hasoňová, L., Kala, R., Špička, J., Kváč, M., & Hanuš, O. (2014). Vliv zkrmování čerstvé vojtěšky na zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku dojnic. *Mlékařské listy*, 147, 41-44. **viz příloha 3**
4. Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Kala, R., Koubová, J., Smetana, P., Hasoňová, L., Křížová, Z., Kopunecz, P., & Kopecký, J. (2015). Porovnání metod stanovení mastných kyselin v mléce. *Náš chov*, 9, 74-76. **viz příloha 4**

4.1.1 Odběry vzorků

Publikace 1 až 3

Vzorky mléka pro posouzení vybraných faktorů byly odebrány od dojnic plemene české strakaté (kombinované užitkové zaměření) a holštýnské (mléčné užitkové zaměření) v rámci pravidelné kontroly užitkovosti (Vyhláška MZe 211/2004, ČSN 57 0529). Odběry se uskutečnily na farmě Čejkovice Zemědělské společnosti Dubné a.s.. Od každé ze sledovaných dojnic byly odebrány dva vzorky - jeden na stanovení základního chemického složení mléka, druhý pro stanovení MK v mléčném tuku. Počty odebraných vzorků mléka jsou uvedeny v jednotlivých publikovaných studiích.

Publikace 4

Vzorky mléka pro porovnání metod stanovení MK byly odebrány na farmě Týnice ZD Přeštěnice (plemeno české strakaté) a na farmách Líbivá společnosti Mohelnická

zemědělská a.s. a Medlov společnosti Mespol Medlov a.s. (plemeno holštýnské). Od každé ze sledovaných dojnic byly odebrány dva vzorky. Jeden vzorek na stanovení základního chemického složení mléka včetně rutinního stanovení MK metodou MIR-FT (dále jen MIR), druhý vzorek pro stanovení MK referenční metodou pomocí plynové chromatografie (dále je GLC).

4.1.2 Charakteristika skladby a složení krmných dávek

Na farmě Čejkovice Zemědělské společnosti Dubné a.s. byla základní KD na kus a krmný den sestavována na živou hmotnost 650 kg, denní užitkovost 25 kg, s obsahem tuku 4,2 % a bílkovin 3,5 %. Výpočet KD byl proveden dle DLG- Fütterwerttabellen, specifikace KD je uvedena v příložených studiích (viz Přílohy 1 až 3). Obecně byla KD tvořena kukuřičnou siláží, travní siláží, senem a byla doplněna mačkaným ovsem, produkční krmnou směsí (pšenice, ječmen, oves, extrahovaný sójový šrot, extrahovaný řepkový šrot, sůl, vitamíny a minerální látky) a minerální a vitamínovou krmnou směsí.

4.1.3 Analýza vzorků

4.1.3.1 Analýza vzorků KD

Analýzy krmiv včetně hodnocení siláží byly provedeny v laboratoři "AGRO-LA" se sídlem v Jindřichově Hradci v souladu s Vyhláškou č. 451/2000 a Vyhláškou č. 124/2001. Obsah dusíkatých látek v krmné dávce byl stanoven metodou podle Kjeldahla ($N \times 6,25$), hodnota NEL (netto energie laktace) byla vypočítána podle Sommera et al. (1994).

4.1.3.2 Základní složení vzorků mléka a stanovení MK metodou MIR

Chemické složení mléka (obsah tuku, bílkovin a laktózy) včetně rutinního stanovení MK bylo provedeno v laboratoři pro rozbor mléka v Buštěhradě (Českomoravská společnost chovatelů, a.s.). Pro analýzy byly využity: infračervený absorpční analyzátor MilkoScan 4000 (Foss Electric, Hillerød, Dánsko) a přístroj CombiFoss FT+ (MilkoScan FT+ 76150, Fossomatic FC 79910), 500 vzorků/hod (Foss Analytical A/S, Denmark).

4.1.3.3 Stanovení mastných kyselin metodou GLC

Analýza složení a zastoupení MK mléčného tuku byla provedena na Katedře aplikované chemie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Mastné kyseliny byly ve vzorcích mléka stanoveny po předchozí lyofilizaci vzorku, extrakci tuku a derivatizaci MK.

1) Lyofilizace

Vzorek mléka o objemu 30 ml byl vložen do kádinky o objemu 150 ml a následně byl zmražen při teplotě -18°C . Poté byla provedena samotná lyofilizace při teplotě -46°C a tlaku 0,07 mbar po dobu 48 hodin na přístroji Alpha 1-4 LD (Christ, Německo). Lyofilizovaný materiál byl převeden do plastových vzorkovnic a uchováván při -18°C do vlastní analýzy.

2) Extrakce tuku

Ke vzorku lyofilizovaného mléka ve vialce o objemu 8 ml bylo přidáno 5 ml petroletheru. Poté byly vialky vloženy na 3 hodiny při laboratorní teplotě do třepačky, kde došlo k sedimentaci. Následně byl petroletherový extrakt použit k derivatizaci.

3) Derivatizace mastných kyselin

Mastné kyseliny byly převedeny na methylestery reesterifikací petroletherového extraktu tuku methanolem roztokem hydroxidu draselného (KOH). K 1,5 ml petroletherového extraktu mléka bylo přidáno 200 μl 2M roztoku KOH v methanolu a směs byla zahřívána 2 minuty ve vodní lázni o teplotě 60°C . Do vychlazené směsi bylo přidáno 400 μl 1M HCl v methanolu k neutralizaci KOH a 1 ml petroletheru. K analýze plynovou chromatografií byl odebíráán 1 μl petroletherového roztoku.

4) Stanovení MK

Stanovení MK bylo provedeno na přístroji Varian 3300 (*Publikace 1 až 3*), resp. Varian 3800 (*Publikace 4*), parametry jsou uvedeny v tabulce 6. K identifikaci MK v mléčném tuku byly použity standardy od firmy Supelco. Zastoupení jednotlivých vybraných MK

bylo stanoveno prostřednictvím poměru ploch píků těchto vybraných MK k celkové ploše píků všech zjištěných MK.

Tabulka 6: Parametry chromatografických analýz

Parametr		Hodnoty	
		Varian 3300	Varian 3800
Kolona		Omegawax 250, 30 m	SelectFAME (Varian), 50 m/0,25 mm
Detektor		FID (plamenově ionizační)	FID (plamenově ionizační)
Teplota	kolona	70 °C/ 3 min; 30 °C/min do 150 °C; 3,0 °C/min do 240 °C	55 °C – 5 min, 40 °C/min – 170 °C, 2 °C/min – 196 °C, 10 °C/min – 210°C – 8 min
	injektor	250 °C	250 °C
	detektor	250 °C	250 °C
Průtok helia		1,5 ml/min	1,8 ml/min
Nástřík		1 µl	1µl, split 10

4.1.4 Statistické zpracování dat

Při statistickém zpracování získaných dat byly využity programy Microsoft Excel a Statistica CZ 6.1 (StatSoft CR, s. r. o.). Prostřednictvím programu MS Excel byla ze zastoupení identifikovaných MK vypočtena celková zastoupení vybraných skupin MK, (tabulka 7).

Pro účely statistického vyhodnocení naměřených dat byly jako nezávislé proměnné (faktory) použity následující zootechnické ukazatele:

- plemeno- třídění: 1 (české strakaté plemeno); 2 (holštýnské plemeno)
- individualita dojnice- počty dojnic
- pořadí laktace- třídění: 1 (1. laktace); 2 (2. laktace); 3 (3. laktace); 4 (4. laktace)
- stadium laktace- třídění: <100 dní; 100-200 dní; >200 dní
- krmná dávka- třídění: Samková et al. (2014) a Koubová et al. (2014)

Sledované ukazatele u vzorků mléka (závislé proměnné)

- množství nadojeného mléka (kg)
- obsah tuku, bílkovin a laktózy (%)
- zastoupení MK mléčného tuku (%; g/100g MK)

Tabulka 7: Přehled významných skupin mastných kyselin mléčného tuku

Název skupiny mastných kyselin	Identifikované a rozříděné mastné kyseliny
nasycené (SFA)	C4:0; C6:0; C8:0; C10:0; C11:0; C12:0; C13:0; C14:0; C15:0; C16:0; C17:0; C18:0; C20:0; C22:0; C24:0
těkavé (VFA)	C4:0; C6:0; C8:0; C10:0
nenasycené (UFA), z toho:	
 monoenové (MUFA)	C10:1; C12:1; C14:1; C16:1; C18:1; C20:1
 polyenové (PUFA)	C16:2n-4; C16:3n-4; C18:2n-6; C18:3n-6; C18:3n-4; C18:3n-3; CLA; C20:3n-6; C20:4n-6; C20:4n-3; C20:5n-3; C22:4n-6; C22:5n-3
PUFA n-3	C18:3n-3; C20:4n-3; C20:5n-3; C22:5n-3
PUFA n-6	C18:2n-6; C18:3n-6; C20:4n-6; C22:4n-6
CLA	izomery konjugované kyseliny linolové ($\Delta^{9,11}$ <i>cis</i> -, <i>trans</i> -; $\Delta^{9,11}$ <i>trans</i> -, <i>cis</i> -oktadekadienová)
Σ C18	C18:0; C18:1; C18:2n-6; C18:3n-3

Pro statistické výpočty byly u souboru vyhodnoceny předpoklady pro užití parametrických metod a k analýze jednotlivých vlivů nezávislých proměnných (faktorů) byly využity příslušné vhodné testy: jednofaktorová analýza rozptylu, případně vícefaktorová analýza rozptylu – pokročilý obecný lineární model (GLM), jejímž principem je rozklad celkové variability závislé proměnné na části vysvětlitelné nezávislými proměnnými (faktory) a na variabilitu nevysvětlenou. Dále byly využity Studentův t-test a pro posouzení závislosti mezi skupinami (post-hoc testy) Fisherův LSD test.

4.2 Testování přítomnosti *Encephalitozoon cuniculi* v syrovém kravském mléce a jeho infekivity po různém tepelném zpracování mléka

Publikace k danému tématu

1. Kváč, M., Tomanová, V., Samková, E., **Koubová, J.**, Kotková, M., Hlásková, L., & Sak, B. (2016). *Encephalitozoon cuniculi* in raw cow's milk remains infectious after pasteurization. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13 (2), 77-79. **viz příloha 5**

4.2.1 Materiál

4.2.1.1 Charakteristika chovu

Byly odebírány vzorky mléka, trusu a moči od 50 ks dojnic na farmě s 490 ks holštýnského skotu. Zvířata byla chována ve volném skupinovém ustájení s vodními matracemi, krmena dvakrát denně krmnou směsí. Odklizení hnoje probíhalo průběžně po celý den pomocí robotického odklízeče. Dojnice byly dojeny dvakrát denně v poloautomatizovaných dojárnách.

4.2.1.2 Odběr materiálu v chovech skotu

Odběry mléka a trusu byly provedené u každé dojnice a to v průběhu 5-ti po sobě jdoucích dojeních. Vzorky mléka byly získány z prvních odstříků ještě před tím, než bylo nasazeno dojící zařízení, a to jak při ranním, tak večerním dojení. Vzorky trusu byly odebírány při defekaci zvířete nebo odběrem z rekta. Vzorek moči byl zachycen při močení zvířete. Pro diagnostiku bylo odebíráno 50 ml mléka (12,5 ml z každé čtvrti), 50 ml moči a 3 g trusu. Materiál byl uložen do plastových sterilních odběrových kelímků, následně řádně označen a skladován při 4 °C do doby vyšetření.

4.2.1.3 Spory mikrosporidií pro experiment

Pro experiment byly použity spory mikrosporidií druhu *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II, které byly izolovány z myši domácí (*Mus musculus*) na Parazitologickém ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky.

4.2.1.4 Experimentální zvířata

Pro testování infekitivity spor po ošetření různými typy pasterizace (tabulka 8) byly použity 8-týdenní SCID (Severe Combined Immunodeficient) myši od dodavatele Charles River, Sulzfeld, Německo. Zvířata byla rozdělena do 6-ti testovaných skupin po třech zvířatech v každé skupině. Myši byly chovány v plastových nádobách se sterilním stelivem a nucenou ventilací (Techniplast, Buguggiate, Italy) vybavenou vzduchovým filtrem. Myši byly krmeny sterilní krmnou dávkou (TOP-VELAZ, Praha) a napájeny *ad libitum* sterilní vodou.

4.2.2 Metody

4.2.2.1 Izolace DNA

Izolace DNA z trusu, moči i mléka byla prováděna pomocí komerčního kitu QIAamp[®] DNA Stool Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Izolace DNA z tkání byla prováděna pomocí komerčního kitu QIAamp[®] DNA Stool Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Před izolací DNA dle návodu výrobce byl vzorek homogenizován pomocí homogenizátoru Fast Prep[®]- 24 Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) 1 minutu při rychlosti 5 m/s. Před homogenizací byly ke vzorkům přidány kuličky o průměru 0,5 mm (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) a 0,8 – 1,2 ml Lysis Buffer P (součást kitu). Vyizolovaná DNA byla skladována při -20 °C.

4.2.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Detekce přítomnosti specifické DNA mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* byla provedena pomocí nested PCR amplifikující ITS (Internal Transcribed Spacer) malé ribozomální podjednotky dle protokolu Katzwinkel-Wladarsch et al. (1996). Celkový objem reakčních směsí byl pro primární i sekundární PCR reakci 25 µl. Ke každé sadě vyšetřovaných vzorků byla zařazena pozitivní (vzorek pozitivní na *E. cuniculi*) a negativní kontrola (PCR voda).

4.2.2.3 Kvantifikace spor *E. cuniculi* v biologických vzorcích

Množství spor v biologických vzorcích (trus, mléko, moč a tkáň) bylo zjišťováno pomocí Q-PCR dle protokolu Wolk et al. (2002). Kalibrační křivka byla sestavena ze vzorků o známé koncentraci spor (10^1 - 10^7).

4.2.2.4 Gelová elektroforéza

Sekundární PCR produkty byly detekovány na 1 % agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (vlnová délka 302 nm).

4.2.2.5 Sekvenování a genotypizace

PCR produkty byly přímo sekvenovány pomocí sekundárních primerů v komerčních laboratořích za použití sekvenačního kitu BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Získané nukleotidové sekvence byly analyzovány v Chromas Pro 1.7.5. a porovnány s referenčními sekvencemi uloženými v GenBank.

4.2.2.6 Stanovení počtu somatických buněk v mléce

Počet somatických buněk (PSB) byl stanoven z každého odebraného vzorku mléka pomocí Fossomatic 90 (Foss Electric, Hillerod, Dánsko).

4.2.3 Ověření účinnosti různých metod tepelného ošetření mléka na viabilitu a infektivitu *E. cuniculi* genotype II

4.2.3.1 Příprava infekční dávky

Nepřítomnost mikrosporidií v syrovém kravském mléce byla ověřena pomocí PCR metod. Do 200 μ l ověřeného mléka bylo přidáno 10^7 infekčních spor *E. cuniculi*. Pasterace byla prováděna v PCR cykleru o objemu 100 μ L (tabulka 8). Pasterace byla provedena v souladu s požadavky kapitoly XI přílohy 2 Nařízení (ES) č. 852/2004. Účinnost pasterace byla ověřena testem na aktivitu alkalické fosfatázy a laktoperoxidázy podle požadavků Nařízení Komise (ES) č. 1664/2006 a Rozhodnutí Komise (ES) č. 91/180/EHS.

Tabulka 8: Typy použitých pasterizačních metod

Typ pasterizace	Teplota	Čas
Dlouhodobě nízká	63,0 °C	30 min
Šetrná	71,2 °C	15 s
Vysoká	85,0 °C	5 s
Vysoká	95,0 °C	5 s

4.2.3.2 *Design experimentu*

Vždy tři 8 týdnů staré SCID myši byly perorálně inokulovány dávkou 1×10^6 spor v mléce po tepelném ošetření dle tabuky 10. Jako negativní kontrola byly použity tři SCID myši, které byly inokulovány dávkou 200 μ l mléka prostého mikrosporidií. Jako pozitivní kontrola byly použity SCID myši, které byly perorálně infikovány dávkou 1×10^6 spor *E. cuniculi* v 200 μ l syrového mléka. Každá skupina myši byla umístěna v samostatné chovné nádobě. Experimentální myši byly usmrceny po 3 týdnech po inokulaci. Pro ověření přítomnosti *E. cuniculi* v těle byly vyšetřeny orgány: ledviny, játra, slezina, mozek a byl proveden výplach peritonea na přítomnost specifické DNA pomocí nested PCR.

5 Výsledky a diskuze

Výsledky a diskuze byly pojednány s ohledem na příslušné publikace, které byly vydané v průběhu studia. Struktura následujících kapitol byla tedy vytvořena podle klíčových témat těchto publikací. V úvodu je nejprve daná/dané publikace zmíněna/y a poté je uvedeno stručné shrnutí dané problematiky. Diskuze byla rozšířena i o některé další poznatky, které v daných publikacích přímo uvedeny nebyly. Rovněž se opírá o některé závěry z publikací, které jsou v redakčním řízení.

5.1 Vliv výživy

Publikace k danému tématu

1. Samková, E., Čertíková, J., Špička, J., Hanuš, O., Pelikánová, T., & Kváč, M. (2014). Eighteen-carbon fatty acids in milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows following feeding with fresh lucerne (*Medicago sativa* L.). *Animal Science Papers and Reports*, 32 (3), 209-218. **viz příloha 2**
2. Koubová, J., Samková, E., Hasoňová, L., Kala, R., Špička, J., Kváč, M., & Hanuš, O. (2014). Vliv zkrmování čerstvé vojtěšky na zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku dojníc. *Mlékařské listy*, 147, 41-44. **viz příloha 3**

Je známo, že nejrychlejším způsobem jak ovlivnit skladbu MK mléčného tuku je právě změna KD dojníc. Tento jev potvrzují např. Jones et al. (2005), Morel et al. (2006), Schwendel et al. (2015). Mléčný tuk se totiž vyznačuje v porovnání s ostatními složkami mléka značnou proměnlivostí. Tato proměnlivost je mj. dána samotnou tvorbou/transformací MK v organismu dojnice, jak se shoduje celá řada autorů (Bradford et Allen, 2004; Elgersma et al., 2006; Dewhurst, 2013). Složení KD je proto jedním z nejvíce zkoumaných aspektů ve vztahu k MK mléčného tuku.

Celosvětově je KD v produkčních chovech tvořena kombinací objemných (čerstvá píce, konzervovaná krmiva a seno) a jadrných krmiv a krmnými doplňky (minerální látky a vitamíny). Jak uvádějí Zeman et al. (2006), v níže položených oblastech jsou KD tvořeny zejména senáží vojtěšky, kukuřicí na siláž a cukrovarskými řízky. Obě naše studie byly prováděny na farmě ležící v nadmořské výšce 410 – 440 m n. m. a v obou testovaných KD zastupovala kukuřičná siláž největší podíl z použitých objemných

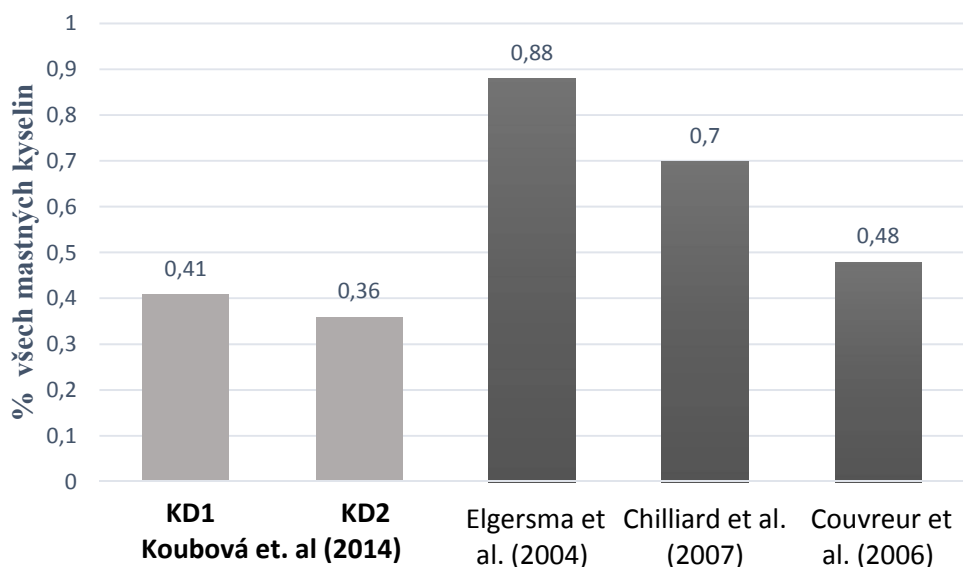
krmiv (KD1 24,5 %, resp. KD2 36,9 % ze sušiny KD). Kukuřičná siláž je důležitá z pohledu bohatého přísunu sacharidů, jež se přeměňují na kyselinu octovou a β -hydroxymáselnou. Tyto produkty jsou stěžejní pro syntézu *de novo* MK v mléčné žláze. Podle Chilliard et al. (2007) bývá zastoupení C18:2n-6 v mléčném tuku zkrmováním kukuřičné siláže vyšší než při zkrmování směsných a travních siláží. Kukuřičná siláž totiž obsahuje 30 – 40 % kukuřičného zrna a jak doplňují Dhiman et al. (1999), zastoupení C18:2 je u kukuřičné siláže 54,9 %. V našich obou studiích byla použita směs siláží, a ačkoliv v KD2 byl obsah kukuřičné siláže výrazně vyšší, nebyl prokázán její vliv na vyšší zastoupení C18:2n-6 v mléčném tuku (KD1 1,80 %, resp. KD2 1,53 % průměrně).

Oproti kukuřičné siláži mají ale na nutričně příznivější spektrum MK vliv siláže travní, jetelové a vojtěškové, jak zjistili Kalač et Samková (2010). Chilliard et al. (2001) ale upozorňují, že KD s více jak 58 % travní siláže zvyšuje podíl C14:0 a C16:0 a způsobuje pokles C18:1, C18:2 a C18:3. V našich obou studiích byl obsah travní siláže v KD téměř shodný (KD1 36,7 %, resp. KD2 35,7 % z podílu použitých objemných krmiv). Dewhurst (2013) ve své studii uvádí, že travní siláž je typicky tvořena bojínkem lučním (*Phleum pratense*) a kostřavou luční (*Festuca pratensis*) v chladnějších oblastech a jílky (*Lolium spp.*) v teplejších oblastech. Podle Lourenço et al. (2005) také záleží na tom, jakým způsobem je louka obhospodařována. Z polo-přírodních luk vyrobená siláž snižuje bachorovou biohydrogenaci a díky tomu se zvyšuje zastoupení CLA v mléčném tuku. Elgersma et al. (2003) a Dewhurst et al. (2006) ale dodávají, že v průběhu konzervace se zastoupení PUFA v píci snižuje.

Čerstvá píce patří ke krmivům, která jsou pro dojnice nejpřirozenější. Její kvalita a složení závisí zejména na vegetačním období, klimatických podmínkách a nadmořské výšce. Jak uvádějí Kalač et Samková (2010), obvyklé množství MK v píci je 20-50 g/kg sušiny. Morel et al. (2006) zkoumali různé typy směsek čerstvé píce a zjistili, že průměrně tyto směsky měly zastoupení 82 % PUFA. Hanuš et al. (2010) k tomuto doplňují, že 50 % je tvořeno kyselinou linolenovou a kolem 30 % jinými PUFA, zejména kyselinami olejovou a linolovou. Kalač et Samková (2010) porovnávali několik zahraničních studií zaměřených na zastoupení MK v různých druzích píce. Dle tohoto srovnání byla čerstvá vojtěška jednou z nejlépe hodnocených druhů, zastoupení kyseliny linolové bylo 6,22 g/kg a ALA 24,90 g/kg sušiny. Zároveň ale měla vojtěška nejvyšší zastoupení nutričně negativně hodnocené kyseliny palmitové (5,66 g/kg sušiny). V našich studiích měla vojtěška setá sušiny 170 g/kg a byla zkrmována

na začátku vegetačního období, a to v červnu jako bílkovinný přídatek KD1 (11,7 % ze sušiny KD). Lee et al. (2006) zjistili, že vojtěška měla stejně vysoké zastoupení ALA v obou sečích na rozdíl např. od srhy nebo jetele lučního. Krmení čerstvé vojtěšky před silážovanou upřednostňuje Whiting et al. (2004), protože mléčný tuk má potom výrazně nižší zastoupení kyselin myristové a palmitové a zároveň se zvyšuje podíl kyselin stearové, olejové, linolové a ALA. Z našich obou studií vyplývá, že přídatkem čerstvé vojtěšky seté do krmné dávky se navýšil podíl CLA a C18:3n-3 v mléčném tuku - viz grafy 3 a 4. Tento jev potvrzují např. Lock et Garnsworthy (2003), kteří zjistili, že přídatkem čerstvé píče do KD se zvyšuje aktivita SCD1 a tím se zvyšuje zastoupení CLA a skupiny *trans* C18:1. Přídatek čerstvé píče v naší studii (Koubová et al., 2014) také znamenal zvýšení zastoupení skupiny UFA, jak dokládají výsledky z tabulky 9. Na hladině statistické významnosti $p < 0,001$ bylo také jejím přídatkem zjištěno vyšší zastoupení kyseliny linolové (1,80 %, resp. 1,53 %). Rozsáhlé výsledky týkající se objemných krmiv a jejich vlivu na MK mléčného tuku publikovali také Morel et al. (2006), kteří potvrdili, že přídatkem vojtěšky do KD se zvýší zastoupení n-3 PUFA a n-6 PUFA. Pozitivní změny ve spektru nutričně významných MK spojených s přídatkem čerstvé píče do KD dále potvrzují např. Bortolozzo et al. (2003), Morales-Almaráz et al. (2011), Ferlay et al. (2011).

Graf 3: Zastoupení CLA v mléčném tuku dojníc v závislosti na krmné dávce: porovnání výsledků této disertační práce (Koubová et al., 2014) s výsledky vybraných publikací



Koubová et al. (2014), KD1- krmná dávka s přidavkem čerstvé vojtěšky

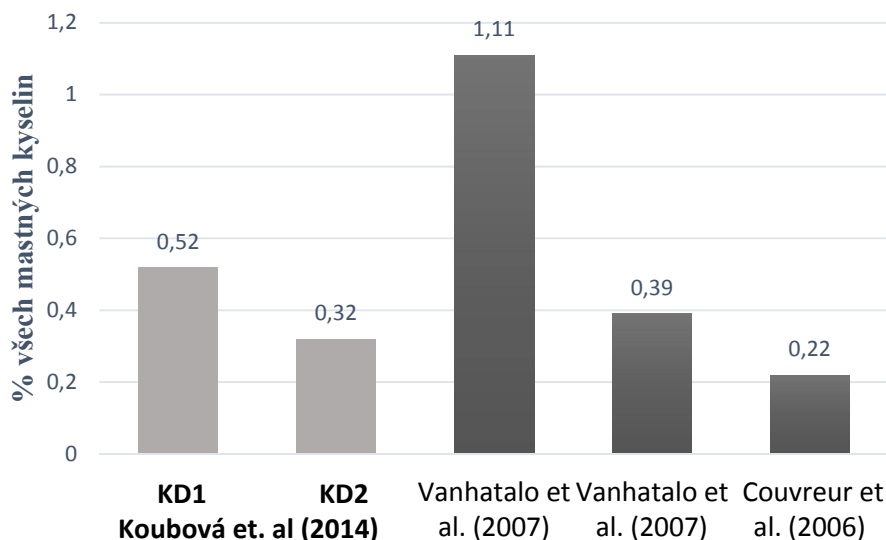
Koubová et al. (2014), KD2- krmná dávka tvořená objemnou pící konzervovanou

Elgersma et al. (2004), krmná dávka tvořená kukuřičnou a travní siláží

Chilliard et al. (2007), krmná dávka tvořená travní siláží

Couvreur et al. (2006), krmná dávka tvořená kukuřičnou siláží

Graf 4: Zastoupení C18:3n-3 v mléčném tuku dojníc v závislosti na krmné dávce: porovnání výsledků této disertační práce (Koubová et al., 2014) s výsledky vybraných publikací



Koubová et al. (2014), KD1- krmná dávka s přidavkem čerstvé vojtěšky

Koubová et al. (2014), KD2- krmná dávka tvořená objemnou pící konzervovanou

Vanhatalo et al. (2007), krmná dávka tvořená siláží jetele lučního

Vanhatalo et al. (2007), krmná dávka tvořená siláží z kostřavy a bojínku

Couvreur et al. (2006), krmná dávka tvořená kukuřičnou siláží

Je však důležité si uvědomit, že zastoupení čerstvé píce v KD může hrát poměrně zásadní roli. Z dostupných literárních zdrojů vyplývá, že čím vyšší přídavek čerstvé píce v KD byl použit, tím výraznější bylo zlepšení nutričních vlastností mléčného tuku. Jak např. ukázala studie Couvreur et al. (2006), použití 3 různých KD (přídavek jílku a jetele plazivého v množství 5, 10, 15 kg/den) znamenalo postupné snižování zastoupení C16:0 (28,4 %; 26,8 %; 24,1 %) a zároveň zvyšování zastoupení C18:1 (24,3 %; 24,9 %; 28,2 %). Ke stejnému závěru dospěli Ward et al. (2003), kteří k pokusu využili pastevní porost. Tento jev mj. dokládají i naše výsledky (Koubová et al., 2014), kdy při zkrmování KD s přídavkem vojtěšky bylo vyšší zastoupení C18:0 (8,56 %) a zároveň snížené zastoupení C16:0 (32,07 %). Po změně KD, kde tvořila hlavní podíl především kukuřičná siláž, se naopak zastoupení C16:0 zvýšilo (33,04 %) a C18:0 snížilo (8,33 %). Ze získaných hodnot je dále patrné, že přídavek čerstvé vojtěšky sice znamenal nutriční zlepšení mléčného tuku, avšak podíl přídavku zřejmě nebyl takový, aby byly rozdíly hodnot u sledovaných MK markantnější. Jak také ukazují naše výsledky, pro zastoupení C12:0 a C14:0 změna KD nebyla takřka patrná (KD1 4,08 %, resp. KD2 4,04 %; KD1 13,01 %, resp. KD2 13,06 %).

Collomb et al. (2002), případně Morel et al. (2006) uvádějí, že podstatný vliv na zastoupení MK mléčného tuku má také samotná skladba KD, tedy kombinace a poměry použitých krmiv. Některé složky totiž inhibují bachorovou biohydrogenaci, a tím vylepšují zastoupení UFA v mléčném tuku, jak potvrzují např. Bauman et al. (2006) nebo Côrtes et al. (2010). Chow et al. (2004) poukazují na přídavek složek obsahujících EPA a DHA (jako např. rybí olej) omezující bachorovou biohydrogenaci skupiny MK s 18-ti uhlíky (C18), což vede ke zvýšení *trans* izomerů C18:1. Toral et al. (2011) zjistili, že přídavkem slunečnicového oleje se zvýšil podíl UFA s 18 uhlíky, zejména *cis* a *trans* C18:1 a zároveň se snížily SFA C6:0 až C12:0 a C16:0 ($p < 0.05$). Z pohledu objemných krmiv omezujících bachorovou biohydrogenaci je to např. jetel luční (Arvidsson et al., 2012) nebo seno (Leiber et al. 2005). Zastoupení vybraných skupin MK zjištěné v této disertační práci (Koubová et al., 2014) a zastoupení těchto skupin ve vybraných publikacích s ohledem na skladbu KD uvádí tabulka 9.

V našich studiích byla kromě objemných krmiv použita také jadrná krmiva. Mačkaný oves a tzv. produkční krmná směs byly v KD1, resp. KD2 použity ve stejném množství (4,7 %, resp. 4,7 % ovsa; 33,4 %, resp. 33,2 % produkční krmné směsi ze

sušiny KD). Z pohledu zastoupení MK v mléčném tuku je oves považován Hawkins et al. (1963) za krmivo, jež při vysokém zastoupení v sušině KD (35 a 49 %) dokáže ovlivnit množství vyprodukovaných těkavých MK v bachoru, a tím ovlivňovat zastoupení MK mléčném tuku. Tzv. produkční směs v KD obou našich studií byla tvořena ječmenem (20 %), pšenicí (20 %), ovsem (12 %), extrahovaným sójovým šrotem (25 %), extrahovaným řepkovým šrotem (20 %), solí, vitaminy a minerálními látkami (3 %). Bauman et Griinari (2001) uvádějí, že KD s nízkým podílem vlákniny a vysokým obsahem jaderných krmiv způsobuje snížení obsahu mléčného tuku a zvyšuje zastoupení *trans*-10 C18:1 a *trans*-10, *cis*-12 CLA izomerů. Z našeho pohledu ale zkrmování jaderného krmiva nemělo na zastoupení MK v mléčném tuku žádný vliv, neboť KD měla dostatek vlákniny (158 g/kg, resp. 151 g/kg sušiny) a také podíl jaderných krmiv byl v obou zkoumaných KD stejný.

Tabulka 9: Zastoupení hlavních skupin mastných kyselin v mléčném tuku dojníc v závislosti na krmné dávce: porovnání výsledků této disertační práce (Koubová et al., 2014) s výsledky vybraných publikací

	SFA	UFA	MUFA	PUFA
Koubová et al. (2014), KD1	68,78	28,31	24,65	3,66 ^a
Koubová et al. (2014), KD2	69,11	28,16	25,21	2,95 ^b
Morel et al. (2006)	71,80	28,20	23,60	4,60
Samková (2008)	68,69	28,72	25,16	3,56
Ström (2012)	72,96	26,66	21,32	5,34
Than et Suksombat (2015)	62,04	37,96	33,54	4,42

^{a, b} průměrné hodnoty ve sloupci se lišily na hladině $p < 0,001$

Koubová et al. (2014), KD1- krmná dávka s přidavkem čerstvé vojtěšky

Koubová et al. (2014), KD2- krmná dávka tvořená objemnou pící konzervovanou

Morel et al. (2006), krmná dávka tvořená travní, jetelovou a vojtěškovou siláží

Samková (2008), krmná dávka tvořená kukuřičnou, vojtěško-travní, kukuřičnou CCM siláží

Ström (2012), krmná dávka tvořená čerstvou vojtěškou, čekankou, sveřepem a jitrocelem

Than et Suksombat (2015), krmná dávka tvořená kukuřičnou siláží, lněným a rybím olejem

Z pohledu vysvětlené variability vybraných posuzovaných faktorů byla podle Samkové (2008) v případě KD zjištěna vysoká hodnota pro skupinu PUFA (30 %). Jak ukazují naše výsledky v tabulce 9, právě tato skupina reagovala na změnu KD nejcitlivěji. Na problematiku vysvětlených variabilit jsme navázali publikací, která byla odeslána do vědeckého časopisu s IF. Zpracovaný manuscript posuzuje mj. vysvětlenou variabilitu týkající se KD ve vztahu k nutričně významným MK a jejich skupinám. Dle doposud nezveřejněných výsledků bylo nejvyšší procento zjištěno pro CLA (52 %).

5.2 Vliv individuality

Publikace k danému tématu

1. Samková, E., Čertíková, J., Hasoňová, L., Smetana, P., Špička, J., & Hanuš, O. (2013). Vliv individuality v rámci plemene na složení mléčného tuku skotu. *Mlékařské listy*, 141, 25-28. **viz příloha 1**
2. Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Kala, R., Koubová, J., Smetana, P., Hasoňová, L., Křížová, Z., Kopunecz, P., & Kopecký, J. (2015). Porovnání metod stanovení mastných kyselin v mléce. *Náš chov*, 9, 74-76. **viz příloha 4**

V předchozí kapitole byl rozebírán vliv KD na zastoupení MK v mléčném tuku a v závěru bylo konstatováno, že KD má největší vliv na PUFA a jak dále zjistila Samková (2008) na MK s počtem uhlíků nad 18. Velice zjednodušeně lze tedy říci, že produkci nutričně kladně hodnoceného mléka bychom si mohli do značné míry ovlivnit sami skladbou KD. Jak ale z dalších výzkumů Samkové (2008) vyplývá, zastoupení SFA s počtem uhlíků do 18, skupiny MUFA (C10:1, C14:1, C16:1, C18:1) a C18:2n-6 je nejvíce ovlivněno samotnou dojnici (posuzováno dle hodnot vysvětlené variability). Individualita dojnice je chápána jako fenotypová variace uvnitř samotného plemene. Jedná se o výsledek činnosti (znaků) vlastního organismu/jedince ve vztahu k vnějšímu prostředí. Jak dokládají mnohé studie (Bobe et al., 2003; Kelsey et al., 2003; Elgersma et al., 2006; Soyeurt et al., 2006b), chovem dojnic za naprosto stejných podmínek, a tedy s vyloučením vnějších vlivů působících na organismus, se vždy zjistily mezi dojnicemi odlišnosti.

Vysvětlení, proč k těmto odlišnostem dochází, studovala celá řada autorů (Kelsey et al., 2003; Arnould et Soyeurt, 2009; Samková et al., 2012). Hlavní příčina je spatřována nejspíše v individuální produkci některých enzymů účastnících se syntézy MK. V této souvislosti patří asi k nejvíce zkoumaným enzymům SCD1. Tento enzym se účastní syntézy MUFA a CLA (Soyeurt et al., 2008). Dalším často zkoumaným enzymem je DGAT1. Schennink et al. (2007) zjistili, že tento enzym je spojován více se syntézou SFA, C16:0, méně s C14:0, nenasycenými MK C18 a CLA ($p < 0.001$).

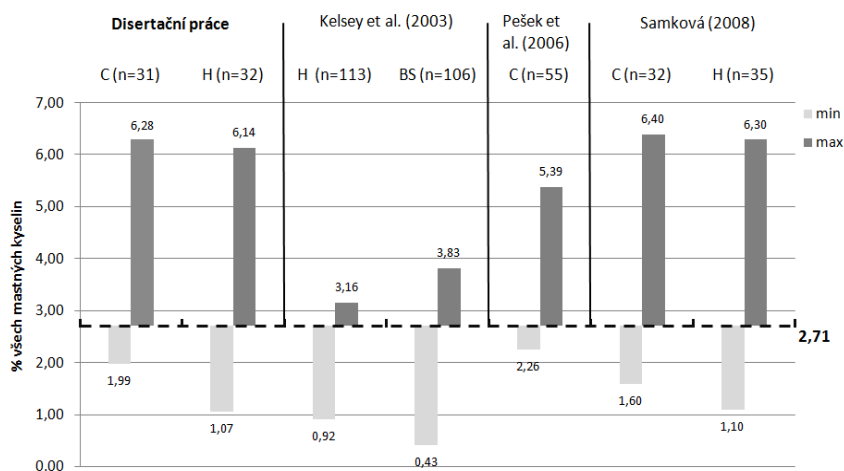
Abychom vyjádřili co nejpřesněji vliv jedince, soubor dojnic jsme vyrovnali podle pořadí a stádia laktace, přičemž od každé dojnice českého strakatého ($n=31$) a holštýnského ($n=32$) plemene bylo získáno v průměru 4 až 8 vzorků (Samková et al.,

2013). Vzorky mléka byly odebírány pravidelně (1 x za měsíc) v průběhu celého roku v rámci kontroly užitkovosti. Kromě výsledků uvedených v této publikaci bylo pro tuto kapitolu vytvořeno navíc několik grafů (graf 5-8), dokumentujících vliv individuality dojnice. Grafy vycházejí ze zastoupení minimálních a maximálních hodnot C12:0, C14:0, C16:0 a C18:0, které nebyly v publikaci Samková et al. (2013) využity. Jako „referenční hodnoty“ byly zvoleny průměrné hodnoty zastoupení těchto MK z publikace Soyeurt et al. (2006a), neboť autoři porovnávali velký soubor jedinců (n=275) a zároveň i více plemen, a to s kombinovaným i mléčným užitkovým zaměřením.

Základním předpokladem pro selekci jedinců je široká variabilita ve sledovaných znacích (Åkerlind et al., 1999). Jak je patrné z následujících grafů 5 až 8, zjištěná rozpětí minimálních a maximálních hodnot pro C12:0, C14:0, C16:0 a C18:0 byla velmi výrazná nejen u našich výsledků, ale také u výsledků Kelsey et al. (2003), Pešek et al. (2006), Samková (2008). Zajímavé pak jsou zejména zjištěné minimální hodnoty pro C12:0, C14:0 a C18:0, které byly výrazně pod průměrnou hodnotou uváděnou Soyeurt et al. (2006a). V případě C16:0 ale tento jev nebyl tak patrný a v porovnání s ostatními hodnocenými kyselinami se C16:0 jevila ve svém zastoupení jako nejstabilnější. Tento závěr podporuje i hodnota variačního koeficientu, která byla pro C16:0 nejnižší (12 %) a pro C18:0 nejvyšší (25 %).

Uvedené výsledky nás dále inspirovali k posouzení významu individuality dojnice i s ohledem na spolupůsobení dalších faktorů (plemeno, individualita, pořadí a stádium laktace). Práce je v současnosti v oponentním řízení časopisu s IF, nicméně výsledky naznačují vliv jedince především u MK s krátkým a středním řetězcem.

Graf 5: Zastoupení C12:0 v mléčném tuku dojníc vybraných plemen¹: výsledky této disertační práce² a výsledky některých publikací vztahžené k průměrnému zastoupení C12:0³

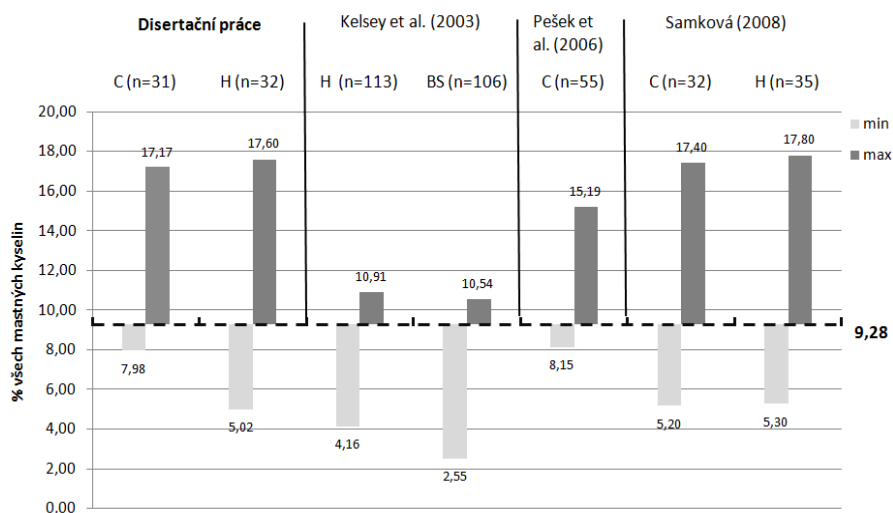


¹ C- české strakaté plemeno, H- holštýnské plemeno, BS- brown swiss

² hodnoty C12:0 vztahující se ke studii Samková et al. (2013), v publikaci nebyly uvedeny

³ průměrná hodnota C12:0 zjištěná u 6 plemen (n=275) s kombinovaným i mléčným užitkovým zaměřením (Soyeurt et al., 2006a)

Graf 6: Zastoupení C14:0 v mléčném tuku dojníc vybraných plemen¹: výsledky této disertační práce² a výsledky některých publikací vztahžené k průměrnému zastoupení C14:0³

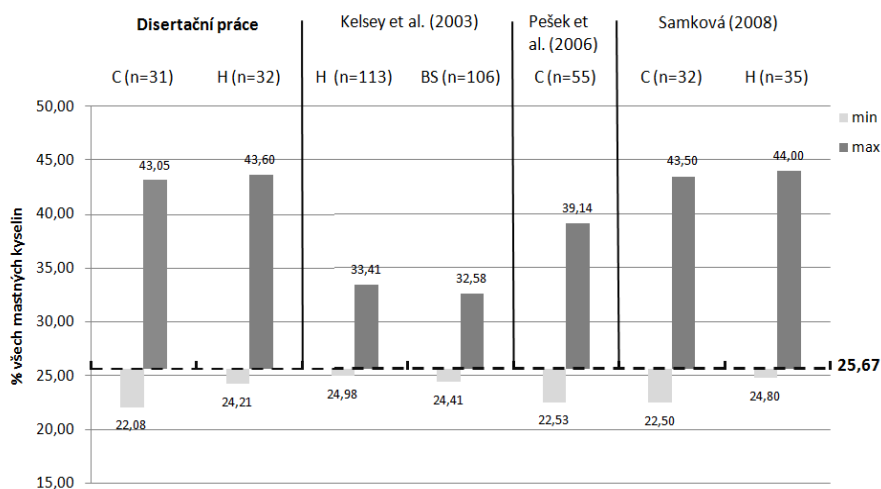


¹ C- české strakaté plemeno, H- holštýnské plemeno, BS- brown swiss

² hodnoty C12:0 vztahující se ke studii Samková et al. (2013), v publikaci nebyly uvedeny

³ průměrná hodnota C12:0 zjištěná u 6 plemen (n=275) s kombinovaným i mléčným užitkovým zaměřením (Soyeurt et al., 2006a)

Graf 7: Zastoupení C16:0 v mléčném tuku dojníc vybraných plemen¹: výsledky této disertační práce² a výsledky některých publikací vztahžené k průměrnému zastoupení C16:0³

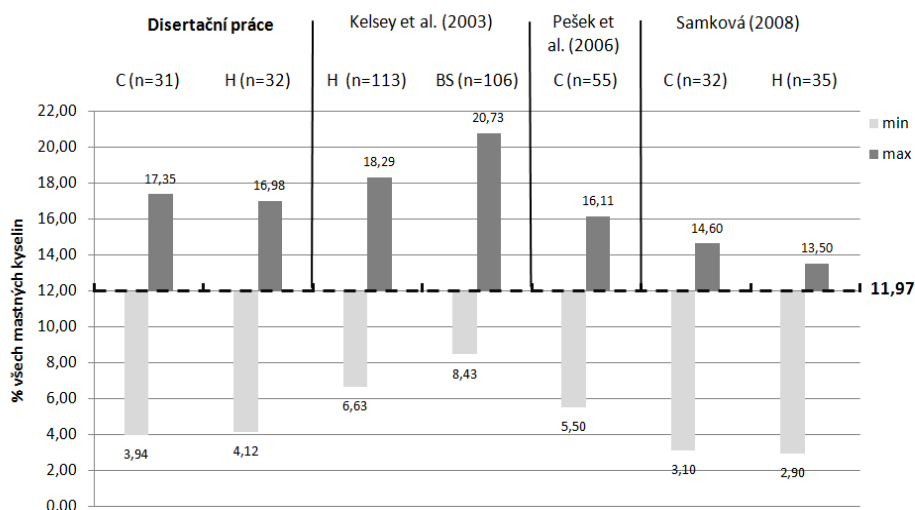


¹ C- české strakaté plemeno, H- holštýnské plemeno, BS- brown swiss

² hodnoty C12:0 vztahující se ke studii Samková et al. (2013), v publikaci nebyly uvedeny

³ průměrná hodnota C12:0 zjištěná u 6 plemen (n=275) s kombinovaným i mléčným užitkovým zaměřením (Soyeurt et al., 2006a)

Graf 8: Zastoupení C18:0 v mléčném tuku dojníc vybraných plemen¹: výsledky této disertační práce² a výsledky některých publikací vztahžené k průměrnému zastoupení C18:0³



¹ C- české strakaté plemeno, H- holštýnské plemeno, BS- brown swiss

² hodnoty C12:0 vztahující se ke studii Samková et al. (2013), v publikaci nebyly uvedeny

³ průměrná hodnota C12:0 zjištěná u 6 plemen (n=275) s kombinovaným i mléčným užitkovým zaměřením (Soyeurt et al., 2006a)

Z pohledu vlivu individuality dojnice na skupiny MK byly dle hodnot uvedených v naší studii (Samková et al., 2013) potvrzeny statisticky vysoce významné rozdíly pro skupiny SFA a UFA ($p < 0.001$). Jak jsme v naší studii dále zjistili, 55 % sledovaných dojnic českého strakatého plemene mělo zastoupení SFA pod průměrnou hodnotou sledovaného souboru, tj. pod 68,7 %.

Z výše uvedených výsledků se domnívám, že individualita by z hlediska nutričního mohla mít také potenciál negativně ovlivnit složení mléčného tuku. Jak zjistili mj. Schennink et al. (2007), podstatnou genetickou variabilitu ve složení mléčného tuku vykazují MK s krátkým a středním řetězcem, u nichž byla zjištěna vysoká heritabilita a pro MK s dlouhým uhlíkatým řetězcem (nasycené a nenasycené C18) střední heritabilita. Z tohoto hlediska je tedy důležité provádět cílenou selekci v chovu.

Pro zefektivnění selekce z pohledu zastoupení SFA a UFA by bylo možné využít metodu infračervené spektroskopie s následným vyhodnocením signálu Fourierovými transformacemi (MIR-FT). Tento závěr potvrzuje naše nedávná studie (Samková et al., 2015), ve které byly porovnávány dvě metody pro stanovení MK. Hodnoty SFA a UFA byly získány jak s pomocí MIR-FT, tak s pomocí časově a finančně náročnější metody plynové chromatografie (GC). Studií bylo zjištěno, že hodnoty získané metodou MIR-FT měly pro SFA validační koeficient korelace (r_{xy}) 0,8424; $p < 0,001$ a pro UFA $r_{xy} = 0,9492$; $p < 0,001$. Zastoupení těchto skupin MK tak byly za pomoci MIR-FT stanoveny s vyšší mírou věrohodnosti. Proto tedy lze tuto analytickou metodu pro vyhodnocení zastoupení SFA a UFA v mléčném tuku, resp. cílenou selekci jednoznačně využít v praxi.

5.3 Vliv plemene

Publikace k danému tématu

1. Samková, E., Čertíková, J., Hasoňová, L., Smetana, P., Špička, J., & Hanuš, O. (2013). Vliv individuality v rámci plemene na složení mléčného tuku skotu. *Mlékařské listy*, 141, 25-28. **viz příloha 1**
2. Samková, E., Čertíková, J., Špička, J., Hanuš, O., Pelikánová, T., & Kváč, M. (2014). Eighteen-carbon fatty acids in milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows following feeding with fresh lucerne (*Medicago sativa* L.). *Animal Science Papers and Reports*, 32 (3), 209-218. **viz příloha 2**

Plemenná příslušnost je dalším z faktorů, jež částečně predikuje složení mléka, resp. mléčného tuku. Soyeurt et al. (2006b) konstatují, že o vlivech plemene nebo individuálních genetických rozdílech bylo v souvislosti se zastoupením MK napsáno mnohem méně publikací než o vlivu KD. Podle Samkové (2008) se faktor plemene podílí na celkové variabilitě rozsahem vysvětlené variability od <0,5 do 16 %, určitý vliv plemene potvrzují také Ferlay et al. (2011). Bez ohledu na tento fakt existuje několik prací (Lawless et al., 1999; Kelsey et al., 2003; Pilarczyk et al., 2015) potvrzujících statistické významnosti v zastoupení MK v mléčném tuku různých plemen.

Nejčastěji zkoumaným a porovnávaným plemenem je plemeno holštýnské (např. Drackley et al., 2001; Kelsey et al., 2003; Palladino et al., 2010; Bulut et al., 2015). Toto plemeno bylo i objektem našeho zkoumání v obou vydaných studiích. Ve studii Samková et al. (2014) jsme se zaměřili na porovnávání odezvy holštýnského a českého strakatého plemene na změnu KD. Důležitým parametrem pro nás bylo zastoupení skupiny SFA, MUFA, PUFA a zejména skupiny MK s 18-ti atomy uhlíku. Dojnicím (n=24) byla zkrmována stejná KD. Bez ohledu na změnu KD měly dojnice holštýnského plemene vždy v porovnání s dojnicemi českého strakatého plemene vyšší dojivost a nižší obsah tuku a bílkovin (tabulka 10). Podobné rozdíly v parametrech mléčné užitkovosti a složení mléka, vyplývající především z odlišného užitkového zaměření zkoumaných plemen (kombinované vs. mléčné užitkové zaměření), zjistili i další autoři (Lawless et al., 1999; Bulut et al., 2015). Kromě těchto rozdílů byla mezi plemeny také patrná rozdílná zastoupení některých MK. Např. dojnice plemen montbeliardské a normandské měly nižší zastoupení C16:0 (22,81 %, resp. 23,67 %) a vyšší zastoupení C18:0 (11,51 %, resp. 11,93 %) a C18:1 (27,64 %, resp. 26,59 %) než obě srovnávaná holštýnská plemena (Lawless et al., 1999). Zastoupení SFA v mléčném tuku simmentálských dojnic byla nižší (66,28 %) než u dojnic plemen holštýnské či brown swiss (67,37 %, resp. 70,19 %) (Bulut et al., 2015). Vyšší zastoupení SFA v mléčném tuku holštýnských dojnic v porovnání s dojnicemi českého strakatého plemene byla zjištěna i v našich studiích (tabulka 10).

Tabulka 10: Dojivost, obsah tuku a bílkovin, a zastoupení skupin nasycených (SFA) a nenasycených (UFA) mastných kyselin v mléčném tuku dojníc vybraných plemen¹: porovnání výsledků této disertační práce (Samková et al., 2013; Samková et al., 2014)² s výsledky vybraných publikací

	Samková et al. (2013)		Samková et al. (2014)		White et al. (2001)		Palladino et al. (2010)		
	C (n=31)	H (n=32)	C (n=12)	H (n=12)	J (n=18)	H (n=19)	J (n=27)	JxH (n=27)	H (n=27)
Dojivost (kg)	19,0	22,7	17,75	24,8	24,2	32,10	14,5	18,4	21,1
Tuk (%)	4,36	4,19	4,49	4,24	3,89	3,28	5,09	4,45	3,79
Bílkoviny (%)	3,58	3,38	3,56	3,90	3,53	2,91	4,01	3,76	3,43
SFA³	68,70	69,20	67,90	70,35	67,09	63,90	68,90	67,91	65,88
UFA³	28,60	28,20	29,20	26,95	25,09	28,33	24,60	25,56	27,36

¹ C- české strakaté plemeno, H- holštýnské, J- jerseyké plemeno, JxH- kříženec jerseykého a holštýnského plemene

² publikace jsou uvedeny v příloze této práce (příloha 1 a 2)

³ % všech mastných kyselin

Jak z tabulky 10 vyplývá, u plemen dosahujících vysoké dojivosti nebo tučnosti byl zjištěn nižší podíl UFA a vyšší podíl SFA. Tento trend potvrzují např. Samková et al. (2012) nebo Pilarczyk et al. (2015). Soyeurt et Gengler (2008) konstatují negativní genetickou korelaci mezi tučností mléka a zastoupením UFA.

Jak již bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, vliv plemene na zastoupení MK v mléčném tuku je v porovnání s ostatními faktory minimální. Nejvyšší hodnoty vysvětlené variability z pohledu plemene zjistila Samková (2008) pro index $\Delta 9$ *cis*-C14:1 SCD. Tento enzym je některými autory vnímán jako jedna z příčin rozdílného zastoupení MK mezi plemeny. Royal et Garnsworthy (2005) vysvětlují tyto rozdíly jako důsledek odlišných heritabilit indexů desaturáz, přičemž nejnižší heritabilita (0,01) byla zjištěna pro index $\Delta 9$ *cis*-C16:1. Jak např. zjistili Kelsey et al. (2003), u holštýnského plemene byla vyšší aktivita SCD než u plemene brown swiss.

Z pohledu statistické významnosti byl v naší studii (Samková et al., 2014) nejtěsnější rozdíl průměrných hodnot obou plemen pro C18:0 ($p = 0,0614$) a pro skupinu PUFA ($p = 0,0563$). Taktéž i u další naší studie (Samková et al., 2013) byly zjištěny rozdíly v průměrných hodnotách těsně nad hranicí statistické významnosti, a to u skupiny SFA ($p = 0,0556$) a UFA ($p = 0,0961$). Statisticky významný vliv plemene ve studii Samková et al. (2014) byl prokázán pouze u CLA ($p = 0,0046$). Zatímco české

strakaté plemeno vykazovalo v obou KD (KD1, KD2) stejnou hodnotu zastoupení CLA (0,45 %), plemeno holštýnské mělo její zastoupení nižší a navíc na změnu KD reagovalo poklesem hodnoty. Rozdílná zastoupení CLA mezi plemeny potvrdili např. Berry et al. (2012), kteří porovnávali plemeno jersey (0,92 %), švédské červené (1,15 %) a holštýnské plemeno (1,12 %).

Skupina MK C18 zaujímá kolem 1/3 všech MK v mléčném tuku. Z této skupiny jsou nejvíce zastoupeny nasycená kyselina stearová, monoenová kyselina olejová a polynenasycená kyselina linolová. Z výsledků naší studie (Samková et al., 2014) vyplynulo, že české strakaté plemeno mělo sice nižší produkci tuku (803 g tuku/den), ale zato vyšší zastoupení MK skupiny C18 (34,1 % všech MK) v porovnání s holštýnským plemenem (1042 g tuku/den; 30,5 % všech MK).

Zastoupení kyseliny stearové se v závislosti na KD u obou plemen v rámci studie Samková et al. (2014) lišilo. Zatímco u českého strakatého plemene se změnou KD, a to z KD1 (s přidavkem zelené píce) na KD2 (siláž) její zastoupení zvýšilo (8,8 %, resp. 9,2 %), u holštýnského plemene se zastoupení snižovalo (8,7 %, resp. 7,2 %). Pešek et al. (2006) zjistili, že české strakaté plemeno vykazovalo rozpětí hodnot této kyseliny od 5,5 % do 16,11 %. Beaulieu a Palmquist (1995) u holštýnského plemene zjistili, že se změnou KD (do níž bylo postupně přidáváno vyšší množství doplňkové složky s vysokým podílem MK a vápníku) se zastoupení kyseliny stearové příliš nelišilo na rozdíl od jerseykého plemene.

Podobné změny jako u zastoupení kyseliny stearové byly v naší studii (Samková et al., 2014) zjištěny i u kyseliny olejové. Zatímco se zastoupení této MK u českého strakatého plemene se změnou KD zvyšovalo (22,1 %, resp. 22,6 %), plemeno holštýnské mělo zastoupení nižší (20,6 %, resp. 19,5 %). Rozdílné meziplemenné hodnoty C18:1 zjistili např. Lawless et al. (1999). Pro holštýnské plemeno bylo zastoupení 26,1 %, pro plemeno montbeliard 27,6 % a pro normandské plemeno 26,6 %. Další meziplemenné rozdíly u kyseliny olejové potvrzují Šterna et Jemeljanovs (2003), kteří porovnávali plemeno černostrakaté nížinné s lokálním litevským hnědým plemenem (20,3 %, resp. 17,0 %).

Z pohledu zastoupení kyseliny linolové (Samková et al., 2014) mělo plemeno české strakaté vyšší hodnoty (KD1 1,87 %, resp. KD2 1,57 %) než plemeno holštýnské (KD1 1,78 %, resp. KD2 1,54 %) a podobné rozdíly byly zjištěny i u ALA. Rozdíly v těchto esenciálních MK mezi plemeny popisují i další autoři. Např. Beaulieu a Palmquist (1995) zjistili rozpětí kyseliny linolové u holštýnského plemene od 2,19 do 2,24 % a

u jerseyjského plemene od 1,95 do 2,34 %. Pilarczyk et al. (2015) zjistili pro ALA vyšší zastoupení u simmentálského než u holštýnského skotu (1,08 %, resp. 0,94 %).

Z výše uvedených zjištění je patrné, že plemena zaměřená na kvantitativní výkon mají horší kvalitativní (nutriční) zastoupení MK než plemena s kombinovaným užitkovým zaměřením. Toto potvrzují např. Goddard (2001) a Soyeurt et al. (2006b), kteří uvádějí, že selekci zaměřenou na vyšší užitkovost dochází ke zvýšené syntéze *de novo* a zvyšuje se zastoupení C16:0 a snižuje zastoupení C18:1 a CLA. Zajímavým řešením se zdá být křížení plemen s kombinovaným a mléčným užitkovým zaměřením. Tímto křížením se zlepšují nutriční vlastnosti mléka, jak např. potvrzuje Berry (2009), který u těchto kříženců zjistil vyšší zastoupení CLA. Muller et al. (2006) k tomuto dodávají, že tito jedinci mají i lepší reprodukční ukazatele a dosahují vyššího věku, což je velmi podstatné z ekonomického hlediska.

Na závěr této kapitoly si dovolím ještě zmínit početní stavy zjištěné kontrolou užitkovosti v roce 2014 v ČR. Jak uvádí Kvapilík et al. (2015), na území ČR bylo chováno 322 671 dojnic plemene holštýnského, což je 60 % ze všech dojených plemenic. Z uvedených hodnot je patrné, že české strakaté plemeno je méně využíváno, což považuji z hlediska produkce nutričně lépe hodnoceného mléka za nevýhodu.

5.4 Vlivy na zdravotní nezávadnost mléka

Publikace k danému tématu

1. Kváč, M., Tomanová, V., Samková, E., **Koubová, J.**, Kotková, M., Hlásková, L., & Sak, B. (2016). *Encephalitozoon cuniculi* in raw cow's milk remains infectious after pasteurization. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13 (2), 77-79. **viz příloha 5**

Parazitická protista mohou být přenášena na vnímavé hostitele prostřednictvím kontaminované potravy. Mezi jedny z nejrozšířenějších jednobuněčných parazitů patří mikrosporidie, které mohou způsobovat onemocnění jak imunokompetentních, tak imunodeficitních osob o různém průběhu; od sublinických až po letální infekce (Deplazes et al., 1996; Weber et al., 1997; Khan et al., 2001; Moretto et al., 2004).

V současné době je známo více než 1200 různých druhů mikrosporidií infikujících v převážné většině bezobratlé a ryby. V humánní medicíně bylo dosud identifikováno 14 druhů mikrosporidií patřících do osmi rodů, přičemž nejčastěji jsou detekovány zástupci rodu *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon bieneusi* (Sak et al., 2011). Autoři doplňují, že moderní diagnostické metody ukazují, jak je výskyt mikrosporidie častější než se dříve myslelo. Vylučování spor bylo zjištěno i u zjevně zdravých zvířat a lidí, kteří nevykazovali žádné klinické příznaky.

Přestože u celé řady mikrobiálních patogenů byl popsán přenos na člověka prostřednictvím mléka a mléčných produktů (Claeys et al., 2013; Domenech et al., 2013; Kalmus et al., 2015), do současné doby nebyl zaznamenán žádný případ přítomnosti mikrosporidií v mléce.

V naší studii (Kváč et al., 2016) jsme detekovali velmi nízkou prevalenci *E. cuniculi* u sledovaných zvířat, což je v souladu s výsledky Halánová et al. (1999), Macák et al. (2001) a Abu-Akkada et al. (2015). Z výsledků předchozích studií vyplývá, že skot je méně častěji infikován mikrosporidiiemi než ostatní hospodářská zvířata a člověk, u kterých dosahuje prevalence i více než 80 % (Snowden, 2014).

Jak bylo prokázáno v předchozích studiích, mikrosporidiové infekce přetrvávají v hostiteli řadu měsíců a jsou do prostředí vylučovány nepravidelně (Sak et al., 2011; Kotková et al., 2013). Tomuto odpovídá i přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* pouze v 5-ti vzorcích, z toho ve 3 vzorcích trusu a 2 vzorcích mléka v rámci naší studie. Na základě výsledků Q-PCR jsme odhadli, že pozitivní kráva vylučovala $1,2 \times 10^5$ spor/l mléka. Při naplnění tanku mlékem od 100 ks dojnic by jeden litr mléka obsahoval $1,2 \times 10^3$ spor.

Jak již bylo zmíněno v literárním přehledu, *E. cuniculi* je v organismu hostitele, mimo jiné, roznášen i prostřednictvím makrofágů. Jak uvádí Navrátilová et al. (2012), největší podíl ze somatických buněk mléka zaujímají bílé krvinky, z nichž nejvíce zastoupené jsou právě makrofágy (60-70 %). Tento fakt podnítil v naší studii úvahu o tom, zda zde neexistuje spojitost mezi mastitidou (PSB > 100 000/ml) a detekcí *E. cuniculi*. Jak bylo ale zjištěno, PSB v jednotlivých vzorcích byl od 13 000/ml do 364 000/ml a výskyt *E. cuniculi* byl nalezen u vzorků s PSB < 80 000/ml, čímž byla naše hypotéza zamítnuta.

Druhou polovinu naší studie tvořilo testování pasterační účinnosti na infektivitu spor *E. cuniculi* v mléce. Pasterace je jedna z nejefektivnějších metod ošetření syrového mléka. Procesu pasterace je dosahováno zahřátím mléka na teplotu vyšší než 71,7 °C a

jejím zachováním po dobu alespoň 15 s, nebo jinou kombinací teploty a času za účelem dosažení rovnocenného účinku (Vyhláška č. 77/2003 Sb.). V naší studii infekivity *E. cuniculi* v mléce (Kváč et al., 2016) byly využity 4 pasterační režimy. Pro potvrzení správnosti výsledků bylo dále použito syrové mléko prosté spor *E. cuniculi* a syrové mléko s přídavkem spor *E. cuniculi* (1×10^6 spor v 200 μ l). Pro potvrzení účinnosti pasterace bylo provedeno stanovení aktivity alkalické fosfatázy a tzv. Storchova zkouška, jak uvádí Navrátilová et al. (2012), a to v souladu s požadavky Nařízení Komise (ES) č. 1664/2006 a Rozhodnutím Komise (ES) č. 91/180/EHS.

Z našich výsledků vyplývá, že šetrná (72 °C po dobu 15 s) a vysoká pasterace (85 °C po dobu 5 s) nedeaktivizovala *E. cuniculi*. Ve všech zkoumaných tkáních myši inokulovaných takto ošetřeným mlékem byla totiž detekována DNA tohoto parazita.

Přestože skot vylučuje spory *E. cuniculi* v mléce jen v malém procentu případů, konzumace syrového a pasterovaného mléka ošetřeného šetrnou a vysokou pasterací může představovat riziko infekce pro člověka.

6 Závěry

V této disertační práci byl posouzen vliv krmné dávky, plemene a individuality dojnice na produkci nutričně příznivějšího složení mléka z hlediska zastoupení mastných kyselin a dále posouzen vliv různých pasteračních metod na devitalizaci spor *Encephalitozoon cuniculi* obsaženém v syrovém kravském mléce.

Provedenými studiemi bylo konstatováno, že:

- přidavkem čerstvé vojtěšky seté do krmné dávky se prokazatelně zvyšuje podíl nenasyčených mastných kyselin, kyseliny linolové, kyseliny α -linolenové a CLA v mléčném tuku.
- lze využít potenciálu vysoké heritability pro mastné kyseliny s krátkým a středním řetězcem v rámci cílené selekce jedinců s nutričně výhodnějším složením mléčného tuku.
- pro produkci nutričně hodnotnějšího mléka jsou vhodnější plemena s kombinovaným užitkovým zaměřením.
- české strakaté plemeno zvyšuje zastoupení skupiny mastných kyselin s 18-ti atomy uhlíku, skupiny nenasyčených mastných kyselin a konjugované kyseliny linolové.
- pro rychlejší a levnější zhodnocení zastoupení dvou nejčastěji sledovaných skupin mastných kyselin (nasyčených a nenasyčených) lze využít rutinní stanovení mastných kyselin pomocí metody infračervené spektroskopie.
- *Encephalitozoon cuniculi* je při mikrosporidiové infekci vylučován také mlékem, a to i bez zvýšeného počtu somatických buněk v mléce.
- šetrná pasterace (72 °C/15s) a vysoká pasterace (85°C/5s) nedeitalizuje spory *Encephalitozoon cuniculi*.

7 Souhrn

Cílem této disertační práce bylo posouzení změny spektra zdravotně významných mastných kyselin v mléce v závislosti na vybraných faktorech a dále posouzení vybraných patogenů ovlivňujících zdravotní nezávadnost mléka. Práce byla vytvořena na základě několika studií, které byly řešeny na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Vzorke od dojníc byly odebírány z několika mléčných farem a plemeny zahrnutými do výzkumů byla plemena holštýnské a české strakaté. Z výsledků vyplývá, že všechny hodnocené faktory (výživa, plemeno a individualita) mají určitý vliv na zastoupení zdravotně významných mastných kyselin v mléčném tuku. Rychlá změna zastoupení mastných kyselin je spojena se změnou krmné dávky. Bylo potvrzeno, že přidavkem čerstvé píce se zvyšuje podíl nenasycených mastných kyselin, skupiny C18 i CLA u obou plemen. Plemeno holštýnské dosahovalo sice vyšší dojivosti, ale zastoupení spektra nutričně významných mastných kyselin nebylo oproti českému strakatému plemenu tak příznivé. Testováním bylo potvrzeno, že mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* je také vylučována mlékem a dokáže přežít pasterační teploty, což by mohlo potencionálně ohrozit zdraví spotřebitele.

8 Summary

The aims of the thesis were to evaluate the selected effects on the fatty acid composition of milk fat and to evaluate the selected pathogens in milk. The thesis was created as a compilation of research papers at the Faculty of Agriculture, the University of South Bohemia. Individual raw milk samples for analyses were obtained from cows at dairry farms. The breeds involved were Czech Fleckvieh and Holstein. Milk samples were analysed in a laboratory by using different analytical methods. The analytical data were assessed statistically using PC programs. The selected effects (diet, breed and cow individuality) affected nutritionally desirable milk fatty acids. Diet has an influence on the quick changes of fatty acid composition of the milk fat. Addition of lucerne into the ration in both breeds caused the greatest changes in polyunsaturated fatty acids, C18 acids and CLA. Despite the greater milk yield in Holstein cows, nutritionally desirable milk fatty acids were less present than in the Czech Fleckvieh. The cow infected with microsporidia *Encephalitozoon cuniculi* could produce a considerable amount of contaminated milk. Pasteurized cow's milk should be considered a potential source of *E. cuniculi* infection in humans.

9 Seznam literatury

1. Abu-Akkada, S. S., Ashmawy, K. I., & Dweir, A. W. (2015). First detection of an ignored parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in different animal hosts in Egypt. *Parasitology Research*, *114*(3), 843-850.
2. Åkerlind, M., Holtenius, K., Bertilsson, J., & Emanuelson, M. (1999). Milk composition and feed intake in dairy cows selected for high or low milk fat percentage. *Livestock Production Science*, *59*(1), 1-11.
3. Arnould, V. M. R., & Soyeurt, H. (2009). Genetic variability of milk fatty acids. *Journal of Applied Genetics*, *50*(1), 29-39.
4. Asperger, H., & Zangerl, P. (2011). Pathogens in Milk: *Staphylococcus aureus* – Dairy. In Fox, P., F., Fuquay, J., W., & McSweeney, P., L. (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 111-116). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
5. Astrup, A., Dyerberg, J., Elwood, P., Hermansen, K., Hu, F. B., Jakobsen, M. U., Kok, F. J., Krauss, R. M., Lecerf, J. M., LeGrand, P., Nestel, P., Riserus, U., Sanders, T., Sinclair, A., Stender, S., Tholstrup, T., & Willett, W. C. (2011). The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *American Journal of Clinical Nutrition*, *93*(4), 684-688.
6. Arvidsson, K., Gustavsson, A. M., Fievez, V., & Martinsson, K. (2012). The effect of N-fertilisation rate or inclusion of red clover to timothy leys on fatty acid composition in milk of dairy cows fed a commercial silage: concentrate ratio. *Animal*, *6*(7), 1178-1186.
7. Badimon, L., & Vilahur, G. (2012). LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Evolving Challenges in Promoting Cardiovascular Health*, *1254*, 18-32.
8. Baer, R. J. (1991). Alteration of the Fatty-Acid Content of Milk-Fat. *Journal of Food Protection*, *54*(5), 383-386.
9. Bargo, F., Delahoy, J. E., Schroeder, G. F., Baumgard, L. H., & Muller, L. D. (2006). Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. *Animal Feed Science and Technology*, *131*(3-4), 226-240.

10. Bauchart, D., Verite, R., & Remond, B. (1984). Long-Chain Fatty-Acid Digestion in Lactating Cows Fed Fresh Grass from Spring to Autumn. *Canadian Journal of Animal Science*, 64, 330-331.
11. Bauman, D. E., & Griinari, J. M. (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, 70(1-2), 15-29.
12. Bauman, D. E., & Griinari, J. M. (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 23, 203-227.
13. Bauman, D. E., Mather, I. H., Wall, R. J., & Lock, A. L. (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1235-1243.
14. Beaulieu, A. D., & Palmquist, D. L. (1995). Differential-Effects of High-Fat Diets on Fatty-Acid Composition in Milk of Jersey and Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 78(6), 1336-1344.
15. Behfar, A., Khorasgani, Z. N., Alemzadeh, Z., Ebrahimi, R., & Tarhani, N. (2010). Determination of Aflatoxin M1 contamination levels in produced pasteurised milk manufactory in Ahvaz city by HPLC. *Toxicology Letters*, 196, S329-S330.
16. Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*. Berlin, Germany: Springer.
17. Bernard, L., Richard, C., Gelin, V., Leroux, C., & Heyman, Y. (2015). Milk fatty acid composition and mammary lipogenic genes expression in bovine cloned and control cattle. *Livestock Science*, 176, 188-195.
18. Berry, R. (2009). Milk from grass using Fleckvieh crossbreds: A study on milk components, conjugated linoleic acid (CLA) and productivity. *Fleckvieh World*, (2009/2010), 12-13.
19. Berry, R., Hydamaka, A., Noto, A., Kotyk, E., Zahradka, P., & Taylor, C. G. (2012). Grazing period variations in cow milk vaccenic acid (VA) and conjugated linoleic acid (CLA). *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2(3), 1-8.
20. Bhunia, A. (2007). *Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis*. New York, USA: Springer.
21. 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(3), 401-410.

22. Bobe, G., Hammond, E. G., Freeman, A. E., Lindberg, G. L., & Beitz, D. C. (2003). Texture of butter from cows with different milk fatty acid compositions. *Journal of Dairy Science*, 86(10), 3122-3127.
23. Bortolozzo, A., Mantovani, R., & Simonetto, A. (2003). Effect of pasture and soybean supplementation on fatty acid profile and CLA content in dairy cow milk. *Italian Journal of Animal Science*, 2, 216-218.
24. Bošanská, L. (2010). Metabolický syndrom včera, dnes a zítra. *Postgraduální medicína*, 12(3), 17 – 23.
25. Bradbury, K. E., Skeaff, C. M., Green, T. J., Gray, A. R., & Crowe, F. L. (2010). The serum fatty acids myristic acid and linoleic acid are better predictors of serum cholesterol concentrations when measured as molecular percentages rather than as absolute concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(2), 398-405.
26. Bradford, B. J., & Allen, M. S. (2004). Milk fat responses to a change in diet fermentability vary by production level in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 87(11), 3800-3807.
27. Brát, J., & Dostálová, J. (2007). Rozhoduje celkové složení tuků. *Výživa a potraviny*, 62(5), 130-133.
28. Brito, A. F., Petit, H. V., Pereira, A. B. D., Soder, K. J., & Ross, S. (2015). Interactions of corn meal or molasses with a soybean-sunflower meal mix or flaxseed meal on production, milk fatty acid composition, and nutrient utilization in dairy cows fed grass hay-based diets. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 443-457.
29. Büchl, N. R., & Seiler, H. (2011). Yeast and Molds: Yeasts in Milk and Dairy Products. In Fox, P. F., Fuquay, J. W., & McSweeney, P. L. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 744-753). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
30. Bulut, S., Kanber, G., Tirindaz, C., Kara, H. H., Mert, R., & Konuk, M. (2015). Investigation of fatty acids of milk from different cow breeds. *Journal of Food Safety and Food Quality-Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, 66(6), 168-171.
31. Campana, V., Sarnataro, D., & Zurzolo, C. (2005). The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends in Cell Biology*, 15(2), 102-111.
32. Castillo, A. R., Taverna, M. A., Paez, R. R., Cuatrin, A., Colombatto, D., Bargo, F., Garcia, M. S., Garcia, P. T., Chavez, M., Beaulieu, A. D., &

- Drackley, J. K. (2006). Fatty acid composition of milk from dairy cows fed fresh alfalfa based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4), 241-254.
33. Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., Vandenplas, Y., & Herman, L. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 31(1), 251-262.
34. Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: Their causes and molecular basis. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 519-550.
35. Collomb, M., Butikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B., & Bosset, J. O. (2002). Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal*, 12(8), 649-659.
36. Côrtes, C., da Silva-Kazama, D. C., Kazama, R., Gagnon, N., Benchaar, C., Santos, G. T. D., Zeoula, L. M., & Petit, H. V. (2010). Milk composition, milk fatty acid profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows fed whole flaxseed and calcium salts of flaxseed oil. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 3146-3157.
37. Couvreur, S., Hurtaud, C., Lopez, C., Delaby, L., & Peyraud, J. L. (2006). The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1956-1969.
38. Crupkin, M., & Zambelli, A. (2008). Detrimental impact of *Trans* fats on human health: Stearic acid-rich fats as possible substitutes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3), 271-279.
39. Cupáková, Š., Janštová, B., Navrátilová, P., & Necedová, L. (2001). Rizika konzumace syrového kravského mléka. *Veterinářství*, 51, 182-184.
40. Dalainas, I., & Ioannou, H. P. (2008). The role of *trans* fatty acids in atherosclerosis, cardiovascular disease and infant development. *International Angiology*, 27(2), 146-156.
41. Dastyh, M. M. (2012). Enterální výživa v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi*, 14(4), 152-156.
42. Deplazes, P., Mathis, A., Baumgartner, R., Tanner, I., & Weber, R. (1996). Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like

- microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clinical Infectious Diseases*, 22(3), 557-559.
43. Dewhurst, R. J. (2013). Milk production from silage: comparison of grass, legume and maize silages and their mixtures. *Agricultural and Food Science*, 22(1), 57-69.
 44. Dewhurst, R. J., Shingfield, K. J., Lee, M. R. F., & Scollan, N. D. (2006). Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4), 168-206.
 45. Dhiman, T. R., Helmink, E. D., McMahon, D. J., Fife, R. L., & Pariza, M. W. (1999). Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds. *Journal of Dairy Science*, 82(2), 412-419.
 46. Didier, E. S., Vossbrinck, C. R., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C., & Shaddock, J. A. (1995). Identification and Characterization of 3 *Encephalitozoon-Cuniculi* Strains. *Parasitology*, 111, 411-421.
 47. DLG-Futterwerttabellen. (1997). *DLG-Futterwerttabellen – Wiederkäuer (in German)*. Frankfurt am Main, Germany: DLG-Verl.
 48. Dlouhý, P. (2007). Tuky ve výživě. *Postgraduální medicína*, 9(8), 867 – 872.
 49. Dlouhý, P., & Anděl, M. (2006). Margaríny a ateroskleróza. Rizikové *trans*-mastné kyseliny. *Vesmír*, 85(11), 686-688.
 50. Domenech, M., Ramos-Sevillano, E., Garica, E., Moscoso, M., & Yuste, J. (2013). Biofilm Formation Avoids Complement Immunity and Phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 81(7), 2606-2615.
 51. Dormont, D. (2002). Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *Febs Letters*, 529(1), 17-21.
 52. Dostálová, J. (2011). Tuky v potravinách a jejich nutriční hodnocení. *Interní Medicína*, 13(9), 347 – 349.
 53. Drackley, J. K., Beaulieu, A. D., & Elliott, J. P. (2001). Responses of milk fat composition to dietary fat or nonstructural carbohydrates in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 84(5), 1231-1237.
 54. Elgersma, A., Ellen, G., van der Horst, H., Boer, H., Dekker, P. R., & Tamminga, S. (2004). Quick changes in milk fat composition from cows after transition from fresh grass to a silage diet. *Animal Feed Science and Technology*, 117(1-2), 13-27.

55. Elgersma, A., Ellen, G., van der Horst, H., Muuse, B. G., Boer, H., & Tamminga, S. (2003). Comparison of the fatty acid composition of fresh and ensiled perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), affected by cultivar and regrowth interval. *Animal Feed Science and Technology*, 108(1-4), 191-205.
56. Elgersma, A., Tamminga, S., & Ellen, G. (2006). Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4), 207-225.
57. Evropský hospodářský a sociální výbor. (2010). *Stanovisko Evropského hospodářského a sociálního výboru: „Budoucí strategie pro mlékárenský průmysl EU v období 2010–2015 a dále“*. Brusel, Belgie: Evropský hospodářský a sociální výbor.
58. Evropská Komise. (2007). *Bílá kniha Komise: „Společně pro zdraví: strategický přístup pro EU na období 2008–2013“*. Brusel, Belgie: Evropská Komise.
59. Felix, C. (2007). *Vše o tucích typu omega-3*. Praha, ČR: Pragma.
60. Ferlay, A., Martin, B., Andueza, D., & Chilliard, Y. (2011). Effects of feeding factors and breed on cow milk fatty acid composition: Recent data. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 68(1), 137-145.
61. Ferlay, A., Martin, B., Pradel, P., Coulon, J. B., & Chilliard, Y. (2006). Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in tarentaise and Montbeliarde cow breeds. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 4026-4041.
62. Fernandes, R. (2009). *Microbiology handbook*. Leatherhead, UK: Cambridge.
63. Fernandez, M. L., & West, K. L. (2005). Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *Journal of Nutrition*, 135(9), 2075-2078.
64. Funaki, M. (2009). Saturated fatty acids and insulin resistance. *The Journal of Medical Investigation*, 56(3, 4), 88-92.
65. Gazdová, V. (2004). *Polymorfismus v genu PRNP a ve dvou mikrosatelitních lokusech u skotu*. vol. PhD (p. 78). Brno, ČR: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Agronomická fakulta.
66. German, J. B., & Dillard, C. J. (2004). Saturated fats: what dietary intake? *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), 550-559.

67. Ghiasian, S. A., & Maghsood, A. H. (2011). Occurrence of aflatoxigenic fungi in cow feeds during the summer and winter season in Hamadan, Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 5(5), 516-521.
68. Goddard, M. (2001). Genetics to improve milk quality. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56(2), 166-170.
69. Goni, S., Muller, C. J. C., Dube, B., & Dzama, K. (2015). Milk production of Jersey and Fleckvieh x Jersey cows in a pasture-based feeding system. *Tropical Animal Health and Production*, 47(1), 139-144.
70. Grassi, G., Seravalle, G., Quarti-Trevano, F., Dell'ro, R., Bombelli, M., & Mancia, G. (2009). Metabolic syndrome and cardiometabolic risk: An update. *Blood Pressure*, 18(1-2), 7-16.
71. Grofová, Z. (2010). Fatty acids. *Medicína pro praxi*, 7(10), 388 – 390.
72. Halánová, M., Letková, V., Macák, V., Štefkovič, M., & Halán, M. (1999). The first finding of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cows in Slovakia. *Veterinary Parasitology*, 82(2), 167-171.
73. Hanuš, O., Samková, E., Špička, J., Sojková, K., Hanušová, K., Kopec, T., & Jedelská, R. (2010). Vztah koncentrace zdravotně významných skupin mastných kyselin ke složkám a technologickým vlastnostem kravského mléka. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 58, 137-153.
74. Hanuš, O., Vegricht, J., Frelich, J., Macek, A., Bjelka, M., Louda, F., & Janů, L. (2008). Analysis of raw cow milk quality according to free fatty acid contents in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 53(1), 17-30.
75. Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition - a review. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 1.
76. Harper, C. M., Cowell, N. A., Adams, B. C., Langley, A. J., & Wohlsen, T. D. (2002). Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *Communicable Diseases Intelligence*, 26(3), 449- 450.
77. Hawkins, G. E., Little, J. A., & Paar, G. E. (1963). Physiological Responses of Lactating Dairy Cattle to Pelleted Corn and Oats. *Journal of Dairy Science*, 46(10), 1073-1080.
78. Heppner, F. L., Christ, A. D., Klein, M. A., Prinz, M., Fried, M., Kraehenbuhl, J. P., & Aguzzi, A. (2001). Transepithelial prion transport by M cells. *Nature Medicine*, 7(9), 976-977.

79. Holeček, M. (2006). *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha, ČR: Grada Publishing a.s.
80. Homolka, P., & Kudrna, V. (2007). *Zvýšení obsahu zdraví prospěšných polynenasycených mastných kyselin mléka výživou zvířat*. Praha, ČR: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
81. Hořín, P. (2002). Genetika prionových onemocnění. *Živa*, 2, 50-52.
82. Chilliard, Y., Ferlay, A., & Doreau, M. (2001). Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Production Science*, 70(1-2), 31-48.
83. Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., & Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 828-855.
84. Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R. M., & Doreau, M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Animal Research*, 49(3), 181-205.
85. Chow, T. T., Fievez, V., Moloney, A. P., Raes, K., Demeyer, D., & De Smet, S. (2004). Effect of fish oil on in vitro rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. *Animal Feed Science and Technology*, 117(1-2), 1-12.
86. Imran, M., & Mahmood, S. (2011). An overview of human prion diseases. *Virology Journal*, 8(1), 1.
87. Jelínek, P., & Koudela, K. (2003). *Fyziologie hospodářských zvířat*. Brno, ČR: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Agronomická fakulta.
88. Jensen, R. G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 295-350.
89. Jenkins, T. C., & McGuire, M. A. (2006). Major advances in nutrition: Impact on milk composition. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1302-1310.
90. Jones, E. L., Shingfield, K. J., Kohen, C., Jones, A. K., Lupoli, B., Grandison, A. S., Beever, D. E., Williams, C. M., Calder, P. C., & Yaqoob, P. (2005). Chemical, physical, and sensory properties of dairy products enriched with conjugated linoleic acid. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2923-2937.

91. Kalač, P., & Samková, E. (2010). The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55(12), 521-537.
92. Kalmus, P., Kramarenko, T., Roasto, M., Meremae, K., & Viltrop, A. (2015). Quality of raw milk intended for direct consumption in Estonia. *Food Control*, 51, 135-139.
93. Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Heise, W., Loscher, T., & Rinder, H. (1996). Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine & International Health*, 1(3), 373-378.
94. Kelley, D. S., Bartolini, G. L., Newman, J. W., Vemuri, M., & Mackey, B. E. (2006). Fatty acid composition of liver, adipose tissue, spleen, and heart of mice fed diets containing t10, c12-, and c9, t11-conjugated linoleic acid. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 74(5), 331-338.
95. Kelsey, J. A., Corl, B. A., Collier, R. J., & Bauman, D. E. (2003). The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2588-2597.
96. Kepler, C. R., Hirons, K. P., Mcneill, J. J., & Tove, S. B. (1966). Intermediates and Products of Biohydrogenation of Linoleic Acid by *Butyrivibrio Fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 241(6), 1350-1354.
97. Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C. C., LaPoint, K., & McIntosh, M. (2009). Saturated Fatty Acid-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue: Mechanisms of Action and Implications. *Journal of Nutrition*, 139(1), 1-4.
98. Khan, I. A., Moretto, M., & Weiss, L. M. (2001). Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes and Infection*, 3(5), 401-405.
99. Kotková, M., Sak, B., Květonová, D., & Kváč, M. (2013). Latent Microsporidiosis Caused by *Encephalitozoon cuniculi* in Immunocompetent Hosts: A Murine Model Demonstrating the Ineffectiveness of the Immune System and Treatment with Albendazole. *Plos One*, 8(4).
100. Kopečný, J. (2004). Konjugovaná kyselina linolová – je skutečně tak důležitá?. Objective Source E-learning [online]. Přístup dne 30.04.2016, <http://www.osel.cz/867-konjugovana-kyselina-linolova-je-skutecne-tak-dulezita.html>

101. Komprda, T. (2003). *Základy výživy člověka*. Brno, ČR: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Agronomická fakulta.
102. Koubová, J., Samková, E., Hasoňová, L., Kala, R., Špička, J., Kváč, M., & Hanuš, O. (2014). Vliv zkrmování čerstvé vojtěšky na zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku dojnic. *Mlékařské listy*, 147, 41-44.
103. Kris-Etherton, P. M. (2010). *Trans-Fats and Coronary Heart Disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 29-30.
104. Kris-Etherton, P. M., Griel, A. E., Psota, T. L., Gebauer, S. K., Zhang, J., & Etherton, T. D. (2005). Dietary stearic acid and risk of cardiovascular disease: Intake, sources, digestion, and absorption. *Lipids*, 40(12), 1193-1200.
105. Kristensen, T., Jensen, C., Ostergaard, S., Weisbjerg, M. R., Aaes, O., & Nielsen, N. I. (2015). Feeding, production, and efficiency of Holstein-Friesian, Jersey, and mixed-breed lactating dairy cows in commercial Danish herds. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 263-274.
106. Kříž, B., Beneš, C., & Daniel, M. (2009). Alimentary Transmission of Tick-borne Encephalitis in the Czech Republic (1997-2008). *Epidemiologie Mikrobiologie Imunologie*, 58(2), 98-103.
107. Kváč, M., Tomanová, V., Samková, E., Koubová, J., Kotková, M., Hlasková, L., McEvoy, J., & Sak, B. (2016). *Encephalitozoon cuniculi* in Raw Cow's Milk Remains Infectious After Pasteurization. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(2), 77-79.
108. Kvapilík, J., Růžička, Z., et al., & Bucek, P. (2015). *Ročenka Chov skotu v České republice Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2014*. Praha, ČR: Českomoravská společnost chovatelů.
109. Larque, E., Zamora, S., & Gil, A. (2001). Dietary *trans* fatty acids in early life: a review. *Early Human Development*, 65, S31-S41.
110. Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science & Technology*, 92(5), 455-468.
111. Lawless, F., Stanton, C., L'Escop, P., Devery, R., Dillon, P., & Murphy, J. J. (1999). Influence of breed on bovine milk *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid content. *Livestock Production Science*, 62(1), 43-49.

112. Lee, S. W., Chouinard, Y., & Van, B. N. (2006). Effect of some factors on the concentration of linolenic acid of forages. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(11), 1148-1158.
113. Leiber, F., Kreuzer, M., Nigg, D., Wettstein, H. R., & Scheeder, M. R. L. (2005). A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows' milk of alpine origin. *Lipids*, 40(2), 191-202.
114. Leila, S. Z., Azar, S., Alireza, K., Amir, B., Mansour, B., & Hosein, E. (2010). Comparison of allergenic power *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. niger* fungi by using patients' sera with asthma. *Middle East Journal of Scientific Research*, 5(5), 350-354.
115. Lerch, S., Pires, J. A. A., Delavaud, C., Shingfield, K. J., Pomies, D., Martin, B., Chilliard, Y., & Ferlay, A. (2015). Rapeseed or linseed in dairy cow diets over 2 consecutive lactations: Effects on adipose fatty acid profile and carry-over effects on milk fat composition in subsequent early lactation. *Journal of Dairy Science*, 98(2), 1005-1018.
116. Lichtenstein, A. H., & Jones, P. J. H. (2012). Lipids: Absorption and Transport. In Erdman Jr, J. W., MacDonald, I. A., & Zeisel, S. H. (Eds.), *Present knowledge in nutrition* (pp 118–131). New York, USA: John Wiley & Sons.
117. Lock, A. L., & Garnsworthy, P. C. (2003). Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Delta(9)-desaturase activity in dairy cows. *Livestock Production Science*, 79(1), 47-59.
118. Lottenberg, A. M., Afonso, M. D., Lavrador, M. S. F., Machado, R. M., & Nakandakare, E. R. (2012). The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(9), 1027-1040.
119. Lourenço, M., Vlaeminck, B., Bruinenberg, M., Demeyer, D., & Fievez, V. (2005). Milk fatty acid composition and associated rumen lipolysis and fatty acid hydrogenation when feeding forages from intensively managed or semi-natural grasslands. *Animal Research*, 54(6), 471-484.
120. Lovett, J., Francis, D. W., & Hunt, J. M. (1987). *Listeria-Monocytogenes* in Raw-Milk - Detection, Incidence, and Pathogenicity. *Journal of Food Protection*, 50(3), 188-192.
121. Macák, V., Halanová, M., Bálent, P., Kacmarik, J., Hajurka, J., Novotný, J., Hura, V., & Bires, V. (2001). The susceptibility of cows of the slovak spotted

- breed and its crossbreeds to infection by the microsporidia *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Veterinaria*, 45(4), 180-183.
122. Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 431(7004), 107-107.
123. Mensink, R. P. (2005). Effects of stearic acid on plasma lipid and lipoproteins in humans. *Lipids*, 40(12), 1201-1205.
124. Merchant, A. T., Kelemen, L. E., de Koning, L., Lonn, E., Vuksan, V., Jacobs, R., Davis, B., Teo, K. K., Yusuf, S., Anand, S. S., & Investigators, S. S. A. (2008). Interrelation of saturated fat, *trans* fat, alcohol intake, and subclinical atherosclerosis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(1), 168-174.
125. Miller, N., Delbecchi, L., Petitclerc, D., Wagner, G. F., Talbot, B. G., & Lacasse, P. (2006). Effect of stage of lactation and parity on mammary gland cell renewal. *Journal of Dairy Science*, 89(12), 4669-4677.
126. Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *International Dairy Journal*, 21(6), 377-401.
127. Miranda, P. J., DeFronzo, R. A., Califf, R. M., & Guyton, J. R. (2005). Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology, and mechanisms. *American Heart Journal*, 149(1), 33-45.
128. Moate, P. J., Chalupa, W., Boston, R. C., & Lean, J. (2007). Milk fatty acids. I. Variation in the concentration of individual fatty acids in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4730-4739.
129. Montecucco, F., Steffens, S., & Mach, F. (2008). Insulin resistance: A proinflammatory state mediated by lipid-induced signaling dysfunction and involved in atherosclerotic plaque instability. *Mediators of Inflammation*, 2008, 767623.
130. Morales-Almaráz, E., De la Roza-Delgado, B., González, A., Soldado, A., Rodríguez, M. L., Peláez, M., & Vicente, F. (2011). Effect of feeding system on unsaturated fatty acid level in milk of dairy cows. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 26(03), 224-229.
131. Morales, M. S., Palmquist, D. L., & Weiss, W. P. (2000). Milk fat composition of Holstein and Jersey cows with control or depleted copper status and fed whole soybeans or tallow. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 2112-2119.

132. Morel, I., Wyss, U., & Collomb, M. (2006). Grünfütter-oder Silagezusammensetzung und Milchinhaltsstoffe. *Agrarforschung*, 13(6), 228-233.
133. Moretto, M., Weiss, L. M., & Khan, I. A. (2004). Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Journal of Immunology*, 172(7), 4402-4409.
134. Mozaffarian, D. (2006). *Trans* fatty acids - Effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atherosclerosis Supplements*, 7(2), 29-32.
135. Mozaffarian, D., & Clarke, R. (2009). Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, S22-S33.
136. Muller, C. J. C., Botha, J. A., Meshelle, G., Van Pittius, P., Grupp, T., Swart, M. J., & Neser, F. W. G. (2006). Preliminary results on the growth performance of Holstein and Fleckvieh x Holstein bull and heifer calves. *Elsenburg Journal*, 3, 1-12.
137. Müllerová, D. (2003). *Zdravá výživa a prevence civilizačních nemocí ve schématech: z pohledu jednotlivce i populačních skupin*. Praha, ČR: Triton.
138. Nantapo, C. T. W., Muchenje, V., & Hugo, A. (2014). Atherogenicity index and health-related fatty acids in different stages of lactation from Friesian, Jersey and Friesian x Jersey cross cow milk under a pasture-based dairy system. *Food Chemistry*, 146, 127-133.
139. Navrátilová, P., Králová, M., Janštová, B., Přidalová, H., Cupáková, Š., & Vorlová, L. (2012). *Hygiena produkce mléka*. Brno. ČR: Veterinární a farmaceutická univerzita.
140. Němcová, M., & Kalhotka, L. (2010). Growth of Important Groups of Microorganisms in Cow and Goat Milk. *Mendelnet 2010*, 742-749.
141. Novakofski, J., Brewer, M. S., Mateus-Pinilla, N., Killefer, J., & McCusker, R. H. (2005). Prion biology relevant to bovine spongiform encephalopathy. *Journal of Animal Science*, 83(6), 1455-1476.
142. Palladino, R. A., Buckley, F., Prendiville, R., Murphy, J. J., Callan, J., & Kenny, D. A. (2010). A comparison between Holstein-Friesian and Jersey dairy

- cows and their F(1) hybrid on milk fatty acid composition under grazing conditions. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 2176-2184.
143. Palmquist, D. L., Beaulieu, A. D., & Barbano, D. M. (1993). Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1753-1771.
144. Pánek, J., Pokorný, J., & Dostálová, J. (2002). *Základy výživy a výživová politika*. Praha, ČR: Vysoká škola chemicko-technologická.
145. Parodi, P. W. (2004). Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology*, 59(1), 3-59.
146. Parodi, P. W. (2009). Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized? *International Dairy Journal*, 19(6-7), 345-361.
147. Patil, S., & Chan, C. (2005). Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neuroscience Letters*, 384(3), 288-293.
148. Pešek, M., Samková, E., & Špička, J. (2006). Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 51(5), 181-188.
149. Petr, J. (2002). Stručný průvodce priony a prionovými chorobami. Objective Source E-learning [online]. Přístup dne 30.04.2016, <http://www.osel.cz/125-priony-a-prionove-choroby.html>
150. Pilarczyk, R., Wojcik, J., Sablik, P., & Czerniak, P. (2015). Fatty acid profile and health lipid indices in the raw milk of Simmental and Holstein-Friesian cows from an organic farm. *South African Journal of Animal Science*, 45(1), 30-38.
151. Poppe, C. (2011). Pathogens in Milk: *Salmonella* spp. In Fox, P. F., Fuquay, J. W., & McSweeney, P. L. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 93-98). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
152. Rani, Z. T., Chimonyo, M., Hugo, A., Marume, U., & Muchenje, V. (2011). Effect of parity on the proximate composition and fatty acid profile of milk from Nguni cattle grazing on natural pastures. *African Journal of Biotechnology*, 10(43), 8647-8653.
153. Riccardi, G., Giacco, R., & Rivellese, A. A. (2004). Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clinical Nutrition*, 23(4), 447-456.

154. Rinder, H., Thomschke, A., Dengjel, B., Gothe, R., Loscher, T., & Zahler, M. (2000). Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. *Journal of Parasitology*, 86(1), 185-188.
155. Risérus, U., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2009). Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Progress in Lipid Research*, 48(1), 44-51.
156. Royal, M. D., & Garnsworthy, P. C. (2005). Estimation of genetic variation in Δ 9-desaturase enzyme activity in dairy cows. In *British Society of Animal Science annual conference 2005*. Proceedings British Society of Animal Science Annual Conference 2005 (pp. 52). York, UK: British Society of Animal Science.
157. Ryser, E. T. (2011). Pathogens in Milk: *Listeria* spp. In Fox, P. F., Fuquay, J. W., & McSweeney, P. L. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 81-86). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
158. Ryšánek, D., Zouharová, M., & Babák, V. (2009). Major Mammary Pathogens as Contributors to Total Bacterial Counts in Raw Milk. *Acta Veterinaria Brno*, 78(3), 455-461.
159. Sak, B., Kváč, M., Kučerová, Z., Květoňová, D., & Saková, K. (2011). Latent Microsporidial Infection in Immunocompetent Individuals - A Longitudinal Study. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 5(5).
160. Samková, E. (2008). The effects of selected factors on fatty acid composition in cow milk fat. vol. PhD (p. 186). Brno, ČR: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Agronomická fakulta.
161. Samková, E., Čertíková, J., Hasoňová, L., Smetana, P., Špička, J., & Hanuš O. (2013). Vliv individuality v rámci plemene na složení mléčného tuku skotu. *Mlékařské listy*, 141, 25-28.
162. Samková, E., Čertíková, J., Špička, J., Hanus, O., Pelikánová, T., & Kváč, M. (2014). Eighteen-carbon fatty acids in milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows following feeding with fresh lucerne (*Medicago sativa* L.). *Animal Science Papers and Reports*, 32(3), 209-218.
163. Samková, E., Hanuš, O., Špička, J., Kala, R., Koubová, J., Smetana, P., Hasoňová, L., Křížová, Z., Kopunecz, P., & Kopecký, J. (2015). Porovnání metod stanovení mastných kyselin v mléce. *Náš chov*, 9, 74-76.

164. Samková, E., Pešek, M., & Špička, J. (2008). *Mastné kyseliny mléčného tuku skotu a faktory jejich zastoupení: Vědecká monografie*. České Budějovice, ČR: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
165. Samková, E., Špička, J., Pešek, M., Pelikanová, T., & Hanuš, O. (2012). Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science*, 42(2), 83-100.
166. Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). *Introduction to food-and airborne fungi*. Washington, USA: American Society for Microbiology.
167. Secchiari, P., Mele, M., Serra, A., Buccioni, A., Paoletti, F., & Antongiovanni, M. (2003). Effect of breed, parity and stage of lactation on milk conjugated linoleic acid content in Italian Friesian and Reggiana cows. *Italian Journal of Animal Science*, 2, 269-271.
168. Schennink, A., Stoop, W. M., Visker, M., Heck, J. M. L., Bovenhuis, H., van der Poel, J. J., van Valenberg, H. J. F., & van Arendonk, J. A. M. (2007). DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Animal Genetics*, 38(5), 467-473.
169. 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(4), 2831-2831.
170. Sigurdson, C. J., & Miller, M. W. (2003). Other animal prion diseases. *British Medical Bulletin*, 66, 199-212.
171. Siri-Tarino, P. W., Sun, Q., Hu, F. B., & Krauss, R. M. (2010). Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(3), 535-546.
172. Skrinjar, M., Danev, M., & Dimic, G. (1995). Investigation on the presence of toxigenic fungi and aflatoxins in raw milk. *Acta Alimentaria*, 24(4), 395-402.
173. Snášelová, J. (2011). Vybrané poznatky v oblasti mikrobiologie syrového kravského mléka v ČR. *Mlékařské listy*, 125, 4-9.
174. Snowden, K. F. (2014). Microsporidia in higher vertebrates. In: Weiss, L. M., & Becnel, J. J. (Eds.), *Microsporidia Pathogens of Opportunity* (pp. 469–491). Ames, USA: Wiley Blackwell.

175. Sommer, A., Čerešňáková, Z., Frydrych, Z., Králík, O., Králíková, Z., Krása, A., Pajtáš, M., & Zeman, L. (1994). *Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro přežvýkavce*. Pohořelice, ČR: Výzkumný ústav výživy zvířat Pohořelice.
176. Soyeurt, H., Dardenne, P., Gillon, A., Croquet, C., Vanderick, S., Mayeres, P., Bertozzi, C., & Gengler, N. (2006a). Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science*, *89*(12), 4858-4865.
177. Soyeurt, H., Dardenne, P., Dehareng, F., Lognay, G., Veselko, D., Marlier, M., Bertozzi, C., Mayeres, P., & Gengler, N. (2006b). Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, *89*(9), 3690-3695.
178. Soyeurt, H., Dehareng, F., Mayeres, P., Bertozzi, C., & Gengler, N. (2008). Variation of Delta(9)-desaturase activity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *91*(8), 3211-3224.
179. Soyeurt, H., & Gengler, N. (2008). Genetic variability of fatty acids in bovine milk. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement*, *12*(2), 203-210.
180. Společnost pro výživu. (2005). Výživová doporučení pro obyvatelstvo České republiky. *Výživa a potraviny*, *1*, 25 – 26.
181. Steinhauserová, P., Řehůrková, I., Saláková, S. I., & Ruprich, J. (2010). Přehled zastoupení mastných kyselin ve spotřebním koši potravin České republiky se zaměřením na výskyt nežádoucích nasycených a *trans*-mastných kyselin. In *Analýza organických látek*. Sborník přednášek ze semináře - Analýza organických látek (pp. 119-126). Komorní Lhotka: 2 Theta.
182. Stoop, W. M., van Arendonk, J. A. M., Heck, J. M. L., van Valenberg, H. J. F., & Bovenhuis, H. (2008). Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*, *91*(1), 385-394.
183. Ström, G. (2012). *Effect of botanically diverse pastures on the milk fatty acid profiles in New Zealand dairy cows*. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Animal Nutrition and Management.
184. Stránský, M. (2007). Mýty a fakta o cholesterolu. *Výživa a potraviny*, *62*(1), 12–13.

185. Suchánek, P., & Poledne, R. (2001). Ovlivnění koncentrace cholesterolu v séru složením tuků v potravě. *Diabetologie, Metabolismu, Endokrinologie, Výživa*, 1, 65–71.
186. Sun, C. Q., O'Connor, C. J., & Robertson, A. M. (2002). The antimicrobial properties of milkfat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase. *Chemico-Biological Interactions*, 140(2), 185-198.
187. Svačina, Š., Souček, M., Šmahelová, A., & Češka, R. (2011). *Metabolický syndrom*. Praha, ČR: Grada Publishing a.s.
188. Svaz obchodu a cestovního ruchu ČR. (2014). Vyhláška o požadavcích na mléko a mléčné výrobky. SOCR ČR Svaz obchodu a cestovního ruchu ČR [online]. Přístup dne 30.04.2016 <http://www.socr.cz/clanek/vyhlaska-o-pozadavcich-na-mleko-a-mlecne-vyrobky/>
189. Šterna, V., & Jemeljanovs, A. (2003). Comparison of fatty acids and cholesterol content in the milk of Latvian cows. *Veterinarija Ir Zootechnika*, 22(44), 95-98.
190. Tăbăran, A., Balteanu, V. A., Gal, E., Pusta, D., Mihaiu, R., Dan, S. D., Tăbăran, A. F., & Mihaiu, M. (2015). Influence of DGAT1 K232A Polymorphism on Milk Fat Percentage and Fatty Acid Profiles in Romanian Holstein Cattle. *Animal Biotechnology*, 26(2), 105-111.
191. Tenter, A. M., Heckerroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30(12), 1217-1258.
192. Thanh, L. P., & Suksombat, W. (2015). Milk Yield, Composition, and Fatty Acid Profile in Dairy Cows Fed a High-concentrate Diet Blended with Oil Mixtures Rich in Polyunsaturated Fatty Acids. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(6), 796-806.
193. Thijssen, M. A. M. A., Hornstra, G., & Mensink, R. P. (2005). Stearic, oleic, and linoleic acids have comparable effects on markers of thrombotic tendency in healthy human subjects. *Journal of Nutrition*, 135(12), 2805-2811.
194. Thom, E., Wadstein, J., & Gudmundsen, O. (2001). Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *Journal of International Medical Research*, 29(5), 392-396.

195. Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81(3), 1031-1064.
196. Toral, P. G., Hervás, G., Bichi, E., Belenguer, A., & Frutos, P. (2011). Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: Effects on animal performance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. *Animal Feed Science and Technology*, 164(3-4), 199-206.
197. Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., Sarmiento, R. M., & Carballo, J. (1998). *Penicillium* species during the manufacturing and ripening of Armada raw goat's milk cheese: identification, characteristics and in vitro potential toxins production. *Lait*, 78(6), 661-672.
198. Tremel, F., Lány, P., Pospíšil, Z., & Zendulková, D. (2014). *Infekční choroby zvířat II: virové a prionové infekce*. Brno, ČR: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.
199. Tvrzická, E., Staňková, B., Vecka, M., & Žák, A. (2008). Fatty acids-2. Clinical and physiological significance. *Časopis lékařů českých*, 148(3), 116-123.
200. Uauy, R., Aro, A., Clarke, R., Ghafoorunissa, R., L'Abbe, M., Mozaffarian, D., Skeaff, M., Stender, S., & Tavella, M. (2009). WHO Scientific Update on trans fatty acids: summary and conclusions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, S68-S75.
201. van Dijk, S. J., Feskens, E. J. M., Bos, M. B., Hoelen, D. W. M., Heijligenberg, R., Bromhaar, M. G., de Groot, L. C. P. G. M., de Vries, J. H. M., Muller, M., & Afman, L. A. (2009). A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(6), 1656-1664.
202. Vanhatalo, A., Kuoppala, K., Toivonen, V., & Shingfield, K. J. (2007). Effects of forage species and stage of maturity on bovine milk fatty acid composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 856-867.
203. Velíšek, J., & Cejpek, K. (2008). *Biosynthesis of Food Components*. Tábor, ČR: Osis.

204. Velíšek, J., & Hajšlová, J. (2009). *Chemie potravin 1+2*. Tábor, ČR: Osis.
205. Vlková, E., Rada, V., & Killer, J. (2009). *Potravinářská mikrobiologie*. Praha, ČR: Česká zemědělská univerzita.
206. Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., & Dewhurst, R. J. (2006). Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4), 389-417.
207. Volf, P., & Horák, P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Praha, ČR: Triton.
208. Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology, Second Edition*. Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group.
209. Wang, T., Lee, S. B., Hwang, J. H., Lim, J. N., Jung, U. S., Kim, M. J., Kang, H. S., Choi, S. H., Lee, J. S., Roh, S. G., & Lee, H. G. (2015). Proteomic Analysis Reveals PGAM1 Altering *cis*-9, *trans*-11 Conjugated Linoleic Acid Synthesis in Bovine Mammary Gland. *Lipids*, 50(5), 469-481.
210. Ward, A. T., Wittenberg, K. M., Froebe, H. M., Przybylski, R., & Malcolmson, L. (2003). Fresh forage and solin supplementation on conjugated linoleic acid levels in plasma and milk. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1742-1750.
211. WHO, & FAO. (1998). *General conclusions and recommendations of the consultation. Expert Consultation on Fats and Oils in Human Nutrition*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
212. Weber, R., Deplazes, P., Flepp, M., Mathis, A., Baumann, R., Sauer, B., Kuster, H., & Luthy, R. (1997). Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*, 336(7), 474-478.
213. Welch, R. A. S., Burns, D. J. W., Davis, S. R., Popay, A. I., & Prosser, C. G. (1997). *Milk Composition, Production and Biotechnology*. New York, USA: CAB International.
214. Weissenbacher, M. (2002). *BSE: nemoc šílených krav nebo nemoc šílené doby*. Praha, ČR: Bonguard s.r.o.
215. White, S. L., Bertrand, J. A., Wade, M. R., Washburn, S. P., Green, J. T., & Jenkins, T. C. (2001). Comparison of fatty acid content of milk from jersey and Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 84(10), 2295-2301.

216. Whiting, C. M., Mutsvangwa, T., Walton, J. P., Cant, J. P., & McBride, B. W. (2004). Effects of feeding either fresh alfalfa or alfalfa silage on milk fatty acid content in Holstein dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 113(1-4), 27-37.
217. Wiking, L., Theil, P. K., Nielsen, J. H., & Sorensen, M. T. (2010). Effect of grazing fresh legumes or feeding silage on fatty acids and enzymes involved in the synthesis of milk fat in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 77(3), 337-342.
218. Wolk, D. M., Schneider, S. K., Wengenack, N. L., Sloan, L. M., & Rosenblatt, J. E. (2002). Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 3922-3928.
219. Woodside, J. V., McKinley, M. C., & Young, I. S. (2008). Saturated and Trans Fatty Acids and Coronary Heart Disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 10(6), 460-466.
220. Zeman, L., Doležal, P., Kopřiva, A., Mrkvicová, E., Procházková, J., Ryant, P., & Zelenka, J. (2006). *Výživa a krmení hospodářských zvířat*. Praha, ČR: Profi Press s. r. o.
221. Žák, A., Macášek, J., Slabý, A., Staňková, B., Tvrzická, E., Vařeka, T., Vecka, M., Vítek, L., & Zeman, M. (2011). *Ateroskleróza*. Praha, ČR: Grada Publishing a.s.

Zákony, Vyhlášky, Nařízení, Normy

1. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. Sbírka zákonů, částka 38/1997, 1997.
2. Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně souvisejících zákonů (veterinární zákon). Sbírka zákonů, částka 57/1999, 1999.
3. Vyhláška č. 451/2000 Sb., kterou se provádí Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění zákona c. 244/2000 Sb., ročník 2000, částka 126, 2000.
4. Vyhláška č. 124/2001 Sb., kterou se stanoví požadavky na odběr vzorků a principy metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků. 2001.

5. Vyhláška č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Sbírka zákonů, částka 32/2003, 2003.
6. Vyhláška č. 291/2003 Sb., o zákazu podávání některých látek zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí, a o sledování (monitoringu) přítomnosti nepovolených látek, reziduí a látek kontaminujících, pro něž by živočišné produkty mohly být škodlivé pro zdraví lidí, u zvířat a v jejich produktech. 2003.
7. Vyhláška č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství. Sbírka zákonů, částka 95/2007, 2007.
8. Vyhláška č. 54/2004 Sb., o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití. Sbírka zákonů, částka 17/2004, 2004.
9. Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Sbírka zákonů, částka 3/2008, 2008.
10. Vyhláška č. 211/2004 Sb., o metodách zkoušení a způsobu odběru a přípravy kontrolních vzorků. Sbírka zákonů, ročník 2004, částka 71, 2004.
11. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin. 2002.
12. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin. 2004.
13. Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 ze dne 29. dubna 2004 o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat. 2004.
14. Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. 2004.
15. Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 854/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní pravidla pro organizaci úředních kontrol produktů živočišného původu určených k lidské spotřebě. 2004.

16. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013, kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty a zrušují nařízení Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007. 2013.
17. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice Rady 90/496/EHS, směrnice Komise 1999/10/ES, směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, směrnic Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004. 2011.
18. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 ze dne 20. prosince 2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. 2006.
19. Nařízení Komise (ES) č. 116/2010 ze dne 9. února 2010, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006, pokud jde o seznam výživových tvrzení. 2010.
20. Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006 ze dne 6. listopadu 2006, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. 2006.
21. Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. 2005.
22. Nařízení Komise (ES) č. 1047/2012 ze dne 8. listopadu 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 1924/2006, pokud jde o seznam výživových tvrzení. 2012.
23. Nařízení Komise (ES) č. 983/2009 ze dne 21. října 2009, o schválení a zamítnutí schválení určitých zdravotních tvrzení při označování potravin, která se týkají snížení rizika onemocnění a vývoje a zdraví dětí. 2009.
24. Nařízení Komise (ES) č. 440/2011 ze dne 6. května 2011 o schválení a zamítnutí schválení určitých zdravotních tvrzení při označování potravin týkajících se vývoje a zdraví dětí. 2011.
25. Nařízení Komise (ES) č. 432/2012 ze dne 16. května 2012, kterým se zřizuje seznam schválených zdravotních tvrzení při označování potravin jiných než tvrzení o snížení rizika onemocnění a o vývoji a zdraví dětí. 2012.

26. Nařízení Komise (ES) č. 1226/2014 ze dne 17. listopadu 2014, o schválení zdravotního tvrzení při označování potravin, jež se týká snížení rizika onemocnění. 2014.
27. Nařízení Komise (ES) č. 1664/2006 ze dne 6. listopadu 2006, kterým se mění nařízení (ES) č. 2074/2005, pokud jde o prováděcí opatření pro některé produkty živočišného původu určené k lidské spotřebě, a zrušují některá prováděcí opatření. 2006.
28. Rozhodnutí Komise č. 91/180/EHS ze dne 14. února 1991, kterým se stanoví určité metody analýzy a testování syrového mléka a tepelně ošetřeného mléka. 1991.
29. ČSN 57 0529. Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování. Praha: Český normalizační institut, 1993.

10 Seznamy tabulek, grafů, obrázků

Tabulky

Tabulka 1: Složení mléčného tuku

Tabulka 2: Označování významných mastných kyselin mléčného tuku a jejich skupin

Tabulka 3: Původ mastných kyselin pro syntézu mléčného tuku

Tabulka 4: Obsah tuku a nasycených mastných kyselin (SFA) v různých typech mléka

Tabulka 5: Složení mastných kyselin másel dostupných na českém trhu v roce 2007

Tabulka 6: Parametry chromatografických analýz

Tabulka 7: Přehled významných skupin mastných kyselin mléčného tuku

Tabulka 8: Typy použitých pasterizačních metod

Tabulka 9: Zastoupení hlavních skupin mastných kyselin v mléčném tuku dojnic v závislosti na krmné dávce: porovnání výsledků této disertační práce (Koubová et al., 2014) s výsledky vybraných publikací

Tabulka 10: Dojivost, obsah tuku a bílkovin, a zastoupení skupin nasycených (SFA) a nenasycených (UFA) mastných kyselin v mléčném tuku dojnic vybraných plemen¹: porovnání výsledků této disertační práce (Samková et al., 2013; Samková et al., 2014)² s výsledky vybraných publikací

Grafy

Graf 1: Zastoupení hlavních mastných kyselin (MK) mléčného tuku

Graf 2: Počet vydaných vědeckých článků týkajících se mastných kyselin v mléce za uplynulých 40 let

Graf 3: Zastoupení CLA v mléčném tuku dojnic v závislosti na krmné dávce: porovnání výsledků této disertační práce (Koubová et al., 2014) s výsledky vybraných publikací

Graf 4: Zastoupení C18:3n-3 v mléčném tuku dojnic v závislosti na krmné dávce: porovnání výsledků této disertační práce (Koubová et al., 2014) s výsledky vybraných publikací

Graf 5: Zastoupení C12:0 v mléčném tuku dojnic vybraných plemen¹: výsledky této disertační práce² a výsledky některých publikací vztažené k průměrnému zastoupení C12:0³

Graf 6: Zastoupení C14:0 v mléčném tuku dojnic vybraných plemen¹: výsledky této disertační práce² a výsledky některých publikací vztažené k průměrnému zastoupení C14:0³

Graf 7: Zastoupení C16:0 v mléčném tuku dojnic vybraných plemen¹: výsledky této disertační práce² a výsledky některých publikací vztažené k průměrnému zastoupení C16:0³

Graf 8: Zastoupení C18:0 v mléčném tuku dojnic vybraných plemen¹: výsledky této disertační práce² a výsledky některých publikací vztažené k průměrnému zastoupení C18:0³

Obrázky

Obrázek 1: Transport acetyl-CoA z mitochondrií do cytosolu cestou citrátu a hlavní zdroje NADPH pro syntézu mastných kyselin

11 Prohlášení spoluautorů

Všichni níže uvedení spoluautoři prohlásili, že se Ing. Jana Koubová významnou měrou podílela na publikacích uvedených v příloze této disertační práce. Souhlas jednotlivých autorů byl elektronickou formou zaslán školiteli doc. Ing. Martinovi Kváčovi, Ph.D., a byl ověřen předsedou oborové rady Zoohygiena a prevence chorob, doktorského studijního programu Zootechnika, Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích prof. Ing. Janem Trávníčkem, CSc.

1. doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.
2. doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
3. doc. Ing. Jiří Špička, CSc.
4. prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.
5. Ing. Tamara Pelikánová
6. Bc. Vendula Tomanová
7. RNDr. Michaela Kotková, DiS.
8. Ing. Lenka Hlásková
9. RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.
10. MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.
11. Ing. Pavel Smetana, Ph.D.
12. Ing. Robert Kala
13. Ing. Zuzana Křížová
14. Ing. Pavel Kopunecz
15. Jaroslav Kopecký
16. Ing. Lucie Krůčková
17. Ing. Anna Švarcová
18. Ing. Tomáš Frejlach

V zastoupení všech spoluautorů:

doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Ověřil:

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

12 Přílohy

Příloha 1:

Samková E., Čertíková J., Hasoňová L., Smetana P., Špička J., Hanuš O. (2013): Vliv individuality v rámci plemene na složení mléčného tuku skotu. Mlékařské listy, 141, 25-28.

Pro ověření možnosti využití dat složení mastných kyselin k odlišení mléka pocházejícího z ekologického chovu byly v statistickém softwaru vytvořeny z mastných kyselin s $P < 0,05$ PCA modely.

Tab. 4 Úspěšnost PCA modelu pro klasifikaci mlék

	bio	konvenční	zařazeno do obou kategorií	úspěšnost kvantifikace
bio	24	0	0	100 %
konvenční	1	2	21	8,3 %

Z výsledků zařazení vzorků dle modelu PCA do jednotlivých kategorií vyplývá, že model je schopný rozpoznat vzorky biomléka - úspěšnost 100 % (Tab. 4). Bohužel vzorky konvenčního mléka není schopen přiřadit pouze do kategorie konvenčního mléka - úspěšnost pouze 8,3 % a řadí je v 87,5 % do obou kategorií bio i konvenční. Příčinou je vysoký rozptyl u biomléka v zastoupení kyseliny olejové a palmitové, které mají na PCA model nejvyšší vliv z jednotlivých mastných kyselin (kyselina olejová PC1 = -0,534; PC2 = 0,697; kyselina palmitová PC1 = 0,749; PC2 = 0,385) (Obr.1).

Závěr

Stanovení mastných kyselin u mléka produkovaného v podmínkách ekologického zemědělství nemůže samostatně toto mléko odlišit od mléka pocházejícího z konvenčního chovu. Vlivem zvýšené variability ve složení mastných kyselin u vzorků biomléka vykazuje část vzorků podobné složení jako vzorky z konvenčních chovů. Ovšem v průměru vykazuje sledované biomléko pocházející ze tří farem nutričně zlepšené parametry ve složení CLA, PUFA a SFA v porovnání s mlékem ze tří konvenčních chovů. Jelikož PCA model vykazuje určitou schopnost separace biomléka, může být metoda vhodným doplňkem dalších technik, jako jsou analýzy triacylglycerolů případně isotopového složení uhlíku při detekci původu mléka.

Poděkování:

Tato práce byla vytvořena za finanční podpory výzkumného projektu NAZV MZe ČR QI91B306.

Literatura:

- P. BERGAMO, E. FEDELE, L. IANNIBELLI, G. MARZILLO (2003): Fat-soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products, *Food Chemistry*, Volume 82, Issue 4, Pages 625-631
- H. C. BUCHER, P. HENGSTLER, C. SCHINDLER, G. MEIER (2002): N-3 Polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: A metaanalysis of randomized controlled trials, *American Journal of Medicine*, 112:298-304
- G. BUTLER, S. STERGIADIS, C. SEAL, M. EYRE, C. LEIFERT (2011): Fat composition of organic and conventional retail milk in northeast England, *Journal of Dairy Science*, Volume 94, Issue 1, January 2011, Pages 24-36
- G. BUTLER, M. COLLOMB, B. REHBERGER, R. SANDERSON, M. EYRE, C. LEIFERT (2009): Conjugated linoleic acid isomer concentrations in milk from high- and low-input management dairy systems, *J. Sci. Food Agri*. 89:697-705
- K.A. ELLIS, G. INNOCENT, D. GROVE-WHITE, P. CRIPPS, W.G. MCLEAN, C.V. HOWARD, M. MIHM (2006): Comparing the Fatty Acid Composition of Organic and Conventional Milk, *Journal of Dairy Science*, Volume 89, Issue 6, June 2006, Pages 1938-1950

F.B. Hu, W.C. Willett (2002): Optimal diets for prevention of coronary heart disease, *The Journal of the American Medical Association*, 288:2569-2578

J. MOKKENTIN (2013): Applicability of organic milk indicators to the authentication of processed products, *Food Chemistry*, Volume 137, Issues 1-4, Pages 25-30

E. H. TEMME, R. P. MENSINK, G. HORNSTRA (1996): Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63:897-903

A. SIMOPOULOS (2002): The importance of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56:365-379

Přijato do tisku: 4. 11. 2013

Lektorováno: 29. 11. 2013

VLIV INDIVIDUALITY V RÁMCI PLEMENE NA SLOŽENÍ MLÉČNÉHO TUKU SKOTU

Eva Samková¹, Jana Čertíková¹, Lucie Hasoňová¹, Pavel Smetana¹, Jiří Špička¹, Oto Hanuš²

¹ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Studentská 13, 370 05 České Budějovice

² Výzkumný ústav mlékárenský, Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6

Effect of individuality within a breed on bovine milk fat composition

Abstrakt

Mastné kyseliny v mléce jsou důležité z nutričního i technologického hlediska. Zastoupení, příp. vzájemný poměr mezi skupinami nasycených (SFA) a nenasycených (UFA) mastných kyselin určují některé jakostní ukazatele mléka a mléčných výrobků. Cílem práce bylo zjistit zastoupení a variabilitu SFA a UFA u dvou nejčastěji dojených plemen v ČR (české strakaté (C), $n = 31$; holštýnské (H), $n = 32$) a posoudit vliv plemene a individuality dojnic na tyto ukazatele. V rámci plemen byla zjištěna rozdílná zastoupení SFA (C 68,7 %, H 69,2 %) i UFA (C 34,1 %, H 32,8 %). Zatímco vliv plemene byl těsně nad hranici statistické významnosti ($p = 0,0556$ SFA; resp. $0,0961$ UFA), vliv individuality dojnic byl statisticky vysoce významný ($p < 0,001$). Z výsledků vyplývá, že selekcí vybraných dojnic lze dosáhnout cílených změn ve složení skupin mastných kyselin mléčného tuku.

Klíčová slova: dojnice, mléko, mastné kyseliny, stearoyl-CoA desaturáza

Abstract

Fatty acid composition of bovine milk fat affects both nutritional and technological properties of milk. The pro-

portion or the ratio of saturated (SFA) and unsaturated (UFA) fatty acids determines some quality indices of milk and milk products. The aim of this work was to detect SFA and UFA proportion and variability in milk fat of two milking breeds prevailing in the Czech Republic (Czech Fleckvieh (CF), $n = 31$ and Holstein (H), $n = 32$) and to evaluate the effects of breed and cow individuality on these parameters. Different proportion of both SFA (CF 68.7 and H 69.2 % of total fatty acids) and UFA (CF 34.1 and H 32.8 %) was determined in milk fat of CF and H cows, respectively. While the effect of breed was slightly above statistical significance (respective p values SFA 0.0556 and UFA 0.0961), the effect of cow individuality was significant ($p < 0.001$). The purposive selection of milking cows can be thus a useful way to affect SFA and UFA ratio in milk fat.

Keywords: cow, milk, fatty acids, stearyl-CoA desaturase

Úvod

Složení mléka významným způsobem ovlivňuje jakost konečné suroviny. Mléčný tuk jako podstatná složka mléka je tvořen zhruba z 95 - 98 % triacylglyceroly (estery glycerolu a tří mastných kyselin) (Velišek a Hajšlová, 2009). Mastné kyseliny jsou z chemického hlediska nejčastěji rozdělovány podle přítomnosti dvojné vazby v uhlíkovém řetězci, přičemž mastné kyseliny nenasycené (monoenoové = 1 dvojná vazba a polyenoové = dvě a více dvojných vazeb) jsou přítomny v množství při- bližně 35 - 40 % ze všech mastných kyselin a z nutričního hlediska méně příznivě hodnocené nasycené mastné kyseliny v množství cca 60 - 65 %. Obsahy a vzájemný poměr mezi skupinami nasycených (SFA) a nenasycených mastných kyselin (UFA) jsou důležité při hodnocení mléčného tuku jak pro zpracovatele mléka (Hillbrick a Augustin, 2002) z hlediska z technologického (organo- leptické vlastnosti vyráběných produktů, oxidační stabi- lita), tak z pohledu spotřebitele z hlediska nutričního i zdravotního (German et al., 2009).

Zastoupení mastných kyselin a jejich skupin je ovlivněno mnoha faktory, jako je výživa (Kalač a Samková, 2010) a dále faktory biologického charakteru. Zde se uplatňují genetické parametry (heritabilita, korelace) využívané ve šlechtitelských programech (Gibson, 1991). Střední hodnoty heritability pro některé mastné kyseliny

(Stoop et al., 2008) i variabilita v jejich obsazích mohou být základem pro výběr jedinců se specifickým složením mléčného tuku.

Cílem práce bylo posoudit variabilitu zastoupení vybraných skupin mastných kyselin u dojnic plemen české strakaté a holštýnské.

Materiál a metodika

Vzorky mléka pro stanovení složení mléka a zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku byly odebrány při pravidelných měsíčních kontrolách užitkovosti během 12ti měsíců od dojnic českého strakatého a holštýnského plemene vyrovnaných podle pořadí a stádia laktace, přičemž od každé dojnice bylo získáno v průměru 4 až 8 vzorků (tabulka 1).

Obsahy tuku, bílkovin a laktózy byly určeny spektrofotometricky přístrojem MilkoScan 4000 (Foss Electric). Mastné kyseliny z mléčného tuku byly stanoveny metodou plynové chromatografie (Pešek et al., 2006).

Výsledky analýz byly zpracovány s využitím možnosti programu Statistica CZ 6.1 (Statsoft CR), ke sledování vlivů byla použita vícefaktorová analýza rozptylu - obecný lineární model (GLM). Faktor s pevným efektem bylo plemeno, náhodný faktor (individualita dojnice) byl hierarchicky podřízen plemeni: výsledný model byl tedy $X_{ij} = \mu + P_i + I_j (B_j) + \epsilon$, kde X_{ij} = celková variabilita závislé proměnné (složení mléka, zastoupení mastných kyselin), μ = společný průměr, P = plemeno (i = české strakaté, holštýnské), I = individualita dojnice ($j = 1-63$).

Výsledky a diskuze

Obsah mléčného tuku je v porovnání s ostatními složkami mléka mnohem více proměnlivý (Gibson, 1991) a velká variabilita (daná zejména variačním rozpětím) byla zjištěna rovněž u skupiny SFA a UFA (tabulka 2, graf 1).

Z literatury je známo (Samková, 2011), že meziplemenné rozdíly v zastoupení mastných kyselin se více projevují u mastných kyselin tvořených "de novo", tj. v mléčné žláze (mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem). Tyto mastné kyseliny tvoří podstatnou část skupiny SFA, jejíž variabilita vyjádřená variačním koeficientem je v porovnání se skupinou UFA nižší (6 % vs. 16 %). Tato skutečnost je poměrně logická, neboť se zde uplatňuje užší vazba na genetickou část řízení metabolismu vlastního

Tab. 1 Charakteristika skupin dojnic českého strakatého a holštýnského skotu

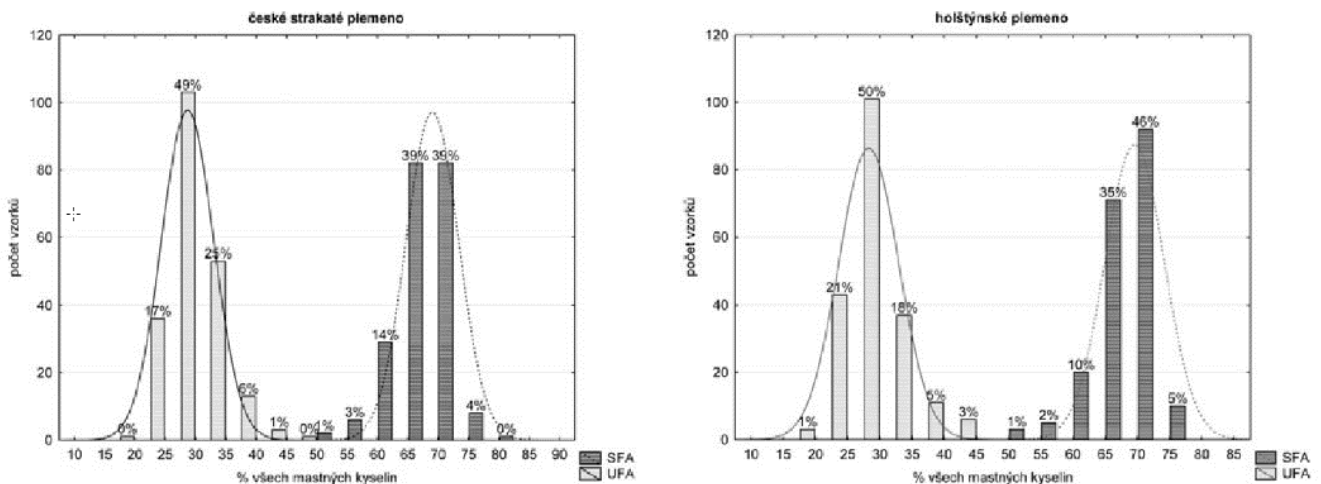
	České strakaté				Holštýnské				p
	x	s _x	min	max	x	s _x	min	max	
Pořadí laktace	1,97	0,81	1	4	2,03	0,80	1	4	0,0564
Dny laktace	148	81	104	200	152	79	101	200	0,3029
Mléko (kg)	19,0	6,2	5,8	30,4	22,7	7,3	4,5	38,4	0,0000
Tuk (%)	4,36	0,81	2,76	6,60	4,19	0,83	2,28	6,70	0,0012
Bílkoviny (%)	3,58	0,45	2,84	4,49	3,38	0,41	2,70	4,83	0,0000
Laktóza (%)	4,83	0,25	4,10	5,30	4,82	0,21	4,10	5,30	0,4527
Počet dojnic/vzorků	31/210				32/201				-

Tab. 2 Zastoupení skupin nasycených (SFA) a nenasycených (UFA) mastných kyselin (% ze všech mastných kyselin) v mléčném tuku dojnic českého strakatého a holštýnského skotu

	České strakaté				Holštýnské				p	
	x	s _x	min*	max*	x	s _x	min*	max*	plemeno	individualita
SFA	68,7	4,3	63,0	73,2	69,2	4,6	64,8	74,0	0,0556	0,0000
UFA	28,6	4,3	24,3	34,1	28,2	4,6	23,7	32,8	0,0961	0,0000
Počet dojnic/vzorků	31/210				32/201				-	-

* vyjádřena z průměrných zastoupení SFA a UFA všech odběrů (4 - 8) u jednotlivých dojnic

Graf 1 Rozdělení četností v zastoupení skupin nasycených (SFA) a nenasycených (UFA) mastných kyselin (% ze všech mastných kyselin) v mléčném tuku dojnic českého strakatého a holštýnského skotu



jedince, na rozdíl od dalších interferenčních vlivů spektra bacherové mikroflóry.

Při porovnání plemen české strakaté a holštýnské byly zjištěny rozdíly ve skupinách SFA, resp. UFA těsně nad hranici statistické významnosti ($p = 0,0556$; resp. $0,0961$). Mnohem větší, statisticky vysoce významné rozdíly, byly potvrzeny v rámci individuality dojnic. Zajímavé jsou v tomto ohledu průměrné hodnoty všech prováděných měření (4 - 8 vzorků/dojnic) v zastoupení skupin SFA a UFA. Z tohoto pohledu je patrné, že mléko dojnic plemene české strakaté má z nutričního hlediska optimálnější složení mléčného tuku (nižší zastoupení SFA; 55 % sledovaných dojnic má zastoupení SFA pod průměrnou hodnotou sledovaného souboru). Z hlediska technologického (např. oxidační stabilita) se jeví jako vhodnější mléko holštýnského plemene (nižší zastoupení UFA).

Zjištěné výsledky potvrzují, že plemeno i individualita vysvětlují určitou část variability v zastoupení mastných kyselin, jak zjistili již *Kelsey et al. (2003)* u holštýnského skotu. Někteří autoři přičítají tuto variabilitu rozdílné aktivitě enzymu stearoyl-CoA-desaturáza (SCD) dané polymorfismem v určitých úsecích SCD genu (*Mele et al., 2007*). Tento klíčový enzym se účastní metabolismu lipidů v mléčné žláze dojnic a je zodpovědný mimo jiné za biosyntézu nenasycených mastných kyselin z nasycených. Např. *Kgwatalala et al. (2007)* předpokládají, že polymorfismus v SCD genu zodpovídá za variabilitu v obsazích monoenoových mastných kyselin v mléčném tuku jerského a holštýnského skotu.

Milanesi et al. (2008) dávají výše uváděné rozdíly do souvislosti s rozdílným zaměřením užitkovosti (mléčný vs. kombinovaný užitkový typ) a tedy odlišnými selekčními cíli. U dojnic plemen, která mají nižší dojvost nebo tučnost mléka, byly zjišťovány převážně nižší obsahy SFA a vyšší obsahy UFA (*Samková, 2011*). Vzájemné vztahy mezi parametry užitkovosti (produkce mléka, tučnost, produkce tuku na den) a zastoupením mastných kyselin a jejich skupin jsou toho důkazem (*Soyeurt et al., 2007; Mele et al., 2009*). Popsané závislosti ukazují, že pro změny ve složení mléčného tuku by vhodným nástrojem mohla být selekce dojnic, neboť by zajistila jejich trvalejší charakter.

Závěr

Široká variabilita v zastoupení skupin mastných kyselin nasycených a nenasycených mezi plemeny i v rámci individuality dojnic dávají prostor možnostem jak ovlivnit složení mléčného tuku. Je však nutné si uvědomit, že pohled na optimální složení se může lišit z pohledu technologa i z pohledu nutričního odborníka. Nicméně získané znalosti je možné využít při výrobě mléčných produktů se specifickým zastoupením mastných kyselin s ohledem na konkrétní požadavky. Na menších farmách dojnic, zejména v systému low input nebo na ekologických farmách (s přímým prodejem mléka nebo produktů) tak existuje reálná možnost cílené produkce mléka s "garantovaným" pozitivně pozměněným profilem mastných kyselin mléčného tuku s ohledem na spotřebitelské zdravotní be-

nefity právě cíleným výběrem nejen plemene, ale i vhodných jedinců, samozřejmě při souběžné úpravě krmné dávky.

Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou projektů MZe ČR QH 81210, OP VK CZ.1.07/2.3. 00/09.0081 a RO0513 (z února 2013).

Seznam literatury

1. German J.B., Gibson R.A., Krauss R.M., Nestel P., Lamarche B., Van Staveren W.A., Steijns J.M., De Groot L., Lock A.L., Destailats F. (2009): A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *Eur. J. Nutr.*, 48, 191-203.
2. Gibson J.P. (1991): The potential for genetic change in milk fat composition. *J. Dairy Sci.*, 74, 3258-3266.
3. Hillbrick G., Augustin M.A. (2002): Milkfat characteristics and functionality: Opportunities for improvement. *Aust. J. Dairy Technol.*, 57, 45-51.
4. Kalač P., Samková E. (2010): The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech J. Anim. Sci.*, 55, 521-537.
5. Kelsey J.A., Corl B.A., Collier R.J., Bauman D.E. (2003): The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86, 2588-2597.
6. Kgwatalala P.M., Ibeagha-Awemu E.M., Hayes J.F., Zhao X. (2007): Single nucleotide polymorphisms in the open reading frame of the stearoyl-CoA desaturase gene and resulting genetic variants in Canadian Holstein and Jersey cows. *DNA Sequence*, 18, 357-362.
7. Mele M., Conte G., Castiglioni B., Chessa S., Maciotta N.F.P., Serra A., Buccioni A., Pagnacco G., Secchiari P. (2007): Stearoyl-Coenzyme A desaturase gene polymorphism and milk fatty acid composition in Italian Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 90, 4458-4465.
8. 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. *J. Dairy Sci.*, 92, 392-400.
9. Milanese E., Nicoloso L., Crepaldi P. (2008): Stearoyl CoA desaturase (SCD) gene polymorphisms in Italian cattle breeds. *J. Anim. Breed. Genet.*, 125, 63-67.
10. Pešek M., Samková E., Špička J. (2006): Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. *Czech J. Anim. Sci.*, 51, 181-188.
11. Samková E. (2011): *Faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin mléčného tuku skotu*. [Habilitation práce]. České Budějovice: JU ZF, 2011. 60 s.
12. Soyeurt H., Gillon A., Vanderick S., Mayeres P., Bertozzi C., Gengler N. (2007): Estimation of heritability and genetic correlations for the major fatty acids in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 90, 4435-4442.
13. Stoop W.M., Van Arendonk J.A.M., Heck J.M.L., Van Valenberg H.J.F., Bovenhuis H. (2008): Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians. *J. Dairy Sci.*, 91, 385-394.
14. Velišek J., Hajšlová J. (2009): *Chemie potravin 1*. 1 ed. Tábor: OSSIS, pp. 580. 978-80-86659-15-2.

Kontaktní adresa:

doc. Ing. Eva Samková, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Česká republika, e-mail: samkova@zf.jcu.cz

Přijato do tisku 13. 11. 2013

Lektorováno 29. 11. 2013

FERMENTOVANÝ MLÉČNÝ VÝROBEK Z KOZÍHO MLÉKA S PROBIOTIKY, PREBIOTIKY A ZVÝŠENÝM OBSAHEM SUŠINY

Markéta Borková, Ivana Lisová, Miroslav Jangl, Marta Pechačová

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

The fermented milk product made from goat milk with probiotics, prebiotics and with increased solids content

Abstrakt

Cílem této práce byla výroba jogurtového výrobku z kozího mléka se zvýšeným obsahem sušiny pomocí nutričně a zdravotně významných látek. K tomuto účelu byl vybrán přídatek prebiotik, koncentráty syrovátkových bílkovin, sušeného kozího mléka, kukuřičného škrobu a ovčího mléka. Do jogurtu byly také přidávány probiotické mikroorganismy *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12. Nejvhodnějším substrátem pro výrobu jogurtového výrobku byl substrát s přidavkem prebiotika Orafiti P95 (5,0 % w/w) a koncentráty syrovátkových bílkovin (2,0 % w/w) nebo sušeného kozího mléka (1,0 % w/w).

Klíčová slova: kozí mléko, kozí jogurt, probiotika, prebiotika,

Abstract

The aim of this work was the production of yoghurt product from goat's milk with increased solids content using nutritionally and healthily important compounds. For this purpose addition of prebiotics, whey protein concentrate, goat milk powder, cornstarch and sheep's milk was chosen. Probiotic microorganisms *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 were also added to yoghurt. The most suitable substrate for the production of yoghurt product was substrate with the addition of prebiotics Orafiti P95 (5.0 % w/w) and whey protein concentrate (2.0 % w/w) or goat milk powder (1.0 % w/w).

Keywords: goat milk, goat yogurt, probiotics, prebiotics

Úvod

V několika posledních letech výrazně vzrostla obliba kozího mléka, kozích fermentovaných výrobků a sýru na celém světě (Haenlein, 2004). Kozí mléko obsahuje celou řadu esenciálních mastných kyselin (linolová, arachidonová), vitaminů (A, B12, B2, C, D, E a kyselinu listovou), minerálních látek s obsahem vápníku, hořčíku, fosforu i mědi, chromu a dalších pro organismus důležitých

Příloha 2:

Samková E., Čertíková J., Špička J., Hanuš O., Pelikánová T., Kváč M. (2014): Eighteen-carbon fatty acids in milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows following feeding with fresh lucerne (Medicago sativa L.). Animal Science Papers and Reports, 32 (3), 209-218.

Eighteen-carbon fatty acids in milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows following feeding with fresh lucerne (*Medicago sativa* L.)*

Eva Samková^{1}, Jana Čertíková¹, Jiří Špička¹,
Oto Hanuš², Tamara Pelikánová¹, Martin Kváč¹**

¹ Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice,
Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

² Dairy Research Institute, Ltd., Prague,
Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6 - Vokovice, Czech Republic

(Accepted May 22, 2014)

Changes in selected FAs level as influenced by inclusion of fresh lucerne (*Medicago sativa* L.) into a feeding ration were assessed in Czech Fleckvieh (dual purpose) and Holstein cows. Each of the balanced groups of 12 cows in mid-lactation was fed with a ration containing 12.7 kg (11.7% of dry matter) of fresh lucerne and then with a ration with preserved forage (maize and grass silages) only. Total content of nutritionally desirable C18 acids was 34.1 and 30.5% of total fatty acids in Czech Fleckvieh and Holstein cows, respectively ($P=0.0693$). The response of the breeds on the change in feeding differed. The changes in fatty acid composition in the Czech Fleckvieh cows were less extensive in stearic and oleic acids, while more extensive in essential linoleic and linolenic acids than those in the Holstein cows. Addition of lucerne into ration in both breeds has caused greatest changes in polyunsaturated fatty acids ($P<0.01$), particularly alpha-linolenic acid ($P<0.001$).

KEY WORDS: breed / cows / fatty acids / feeding / lucerne / milk fat

Milk is a valuable source of energy, protein, minerals and vitamins. It supplies also an important proportion of fat intake in human nutrition in many countries. Milk

*Supported by the project of Ministry of Agriculture of the Czech Republic (No. NAZV QH 81210, by the research project of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (No. MSM 6007665806) and by the project No. RO 0513 from February 2013.

**Corresponding author: samkova@zf.jcu.cz

products provide consumers with about 15-25% of total fat intake and about 25-35% of total saturated fatty acids (FAs) [O'Donnel 1993]. Nevertheless, milk and milk products are an important source of essential FAs [Haug 2007].

Dewhurst *et al.* [2006] recommended for humans the level 15-30% of total fat and the proportions <10, 5-8, 1-2 and <1% within total energy intake of saturated FAs, n-6 polyunsaturated FAs (PUFA), n-3 PUFA and *trans*-isomers of unsaturated FAs, respectively. The recommendation was corroborated by FAO [2010] with similar respective values of 20-35, 10, 2.5-9, 0.5-2 and <1%.

In bovine milk fat, usual levels are 70-75, 20-25 and some 5% of saturated FAs, monounsaturated FAs and PUFA, respectively, from total FAs. FAs composition is affected by numerous factors, which are usually classified in two categories: animal factors and nutritional factors [Palmquist *et al.* 1993; Jensen 2002]. Breed and cow's individuality are the important factors of the former category [Samková *et al.* 2012], while level of nutrition and ration composition of the latter one [Kalač and Samková 2010; Sterk *et al.* 2011]. The breed effects were recently proved by numerous authors, e.g. Poulsen *et al.* [2012], Larsen *et al.* [2012], Communod *et al.* [2012].

Rations for milking cows consist of forages (fresh or preserved) and concentrates. As reviewed by Kalač and Samková [2010], forages have often been the major and also the cheapest source of FAs in ruminant diets, however, the FAs content in different forages is relatively low. Moreover, losses of FAs occur during forage ensiling or drying.

On the other hand, feeding of fresh forages or pasture can widely change milk fat composition [Frelich *et al.* 2012]. Homolka and Kudrna [2007] reported that feeding of fresh forages changed composition of FAs produced *de novo* in mammary gland. The proportion of short-chain FAs increased to the exclusion of nutritionally undesirable lauric (C12:0), myristic (C14:0) and palmitic (C16:0) acids. In a study of Whiting *et al.* [2004], total proportion of saturated FAs decreased, whereas the proportion of desirable FAs (mainly n-3 PUFA) increased following feeding with fresh lucerne as compared to feeding with lucerne silage.

Comparison of FAs composition of milk fat from cows fed with either maize and grass silages or grazing lucerne and white and red clovers revealed higher proportion of vaccenic acid, conjugated linoleic acids (CLA) and alpha-linolenic acid (C18:3n-3) in milk fat of cows grazing legumes than from those fed with silages [Wiking *et al.* 2010]. Also Morel *et al.* [2006] prefer feeding a mixture of fresh lucerne and grasses to other fresh forages.

Thus, legumes (fresh and even ensiled or dried) in feeding rations showed positive effects on the proportion of desirable FAs in bovine milk fat [e.g. Van Dorland *et al.* 2008; Steinshamn 2010]. FA composition of milk fat from cows fed with legume silages was nutritionally comparable to that of milk fat from cows either grazed or fed with fresh forage [Samková 2011].

The aim of this study was to evaluate the eighteen-carbon (C18) FAs content and selected FAs groups in bovine milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein breeds depending on inclusion of fresh lucerne into daily ration.

Material and methods

Feeding and sampling

Twenty four lactating cows (4 heifers and 20 multiparous – parity 2.17±0.72) of Czech Fleckvieh (n = 12) and Holstein (n = 12) breeds stabled together at Čejkovice farm, South Bohemia. Individual raw milk samples for determination of milk yield and composition (Tab. 1) and FAs composition was obtained within the afternoon regular testing of milk efficiency during the summer period in June and July 2006. In total, 48 of milk samples were taken.

Diets were formulated according to DLG-Futterwerttabellen [1997] and calculated for the mean live weight of 650 kg, milk fat content of 4.2% and milk protein content of 3.5%. Diets predominantly consisted of maize and grass silages widely used in the Czech farming practice (Tab. 2).

Table 1. Milk yield and composition in cows of two breeds fed two diets

Item	Czech Fleckvieh		Holstein	
	Fresh ¹	Silage ²	Fresh ¹	Silage ²
Days in milk	157±60	180±60	154±102	177±102
Milk yield (kg/d)	19.2±3.7	16.3±4.2	25.3±6.5	24.3±6.2
Fat (%)	4.61±0.88	4.36±0.70	4.19±0.81	4.29±1.05
Protein (%)	3.54±0.32	3.57±0.34	3.51±0.28	3.48±0.52
Lactose (%)	4.84±0.33	4.73±0.25	4.79±0.25	4.84±0.28

¹Fresh – diet with maize and grass silages (47.0% of dry matter) + fresh lucerne (11.7% of dry matter).

²Silage – diet with maize and grass silages (58.8% of dry matter).

Table 2. Chemical composition of diet components

Item	Maize silage	Grass silage	Fresh lucerne	Hay ¹	Mashed oats	PM ²
Dry matter (g/kg)	356	327	170	897	870	884
Concentration (g/kg DM)						
crude protein ³	79.0	133.8	219.0	71.4	132.2	242.0
crude fat	42.4	19.8	31.0	18.9	42.5	19.3
crude fibre	179.5	262.1	238.0	309.2	141.4	39.1
crude ash	41.5	98.5	106.0	63.2	33.6	75.2
NEL (MJ/kg) ⁴	6.62	4.93	5.82	4.68	6.83	8.02
Ca	1.88	10.01	10.00	3.69	1.49	8.60
P	1.97	3.65	2.82	2.38	4.37	6.12
Na	0.06	0.45	0.18	0.21	0.46	4.93
Mg	1.36	2.42	2.88	1.20	1.38	5.29

¹Permanent grassland hay from late cut with prevailing *Deschampsia cespitosa*, *Agrostis tenuis*, *Agrostis stolonifera*, *Alopecurus pratensis*.

²PM – production mixture consisted of 37, 31, 28 and 4 % (w/w) of wheat, barley, extracted soybean meal and a mixture of minerals and vitamins.

³Crude protein – N x 6.25.

⁴NEL – net energy for lactation [Sommer *et al.* 1994].

The cows received primarily a diet (FRESH) based on silages (25.3 kg/d; 47.0% of dry matter) with 12.7 kg/d (11.7% of dry matter) fresh lucerne (alfalfa; *Medicago sativa* L.) and then a diet (SILAGE) based only on silages (31.5 kg/d; 58.8% of dry matter) – see Table 3. Both diets were fed at least for three weeks before sampling.

Table 3. Composition and intake of diets

Item	FRESH	SILAGE
Intake (kg/d)		
fresh matter	46.6	40.1
dry matter (DM)	18.4	18.4
Composition of diets (% of DM)		
maize silage	24.5	36.9
grass silage	22.5	21.9
fresh lucerne	11.7	-
hay	2.6	2.5
mashed oats	4.7	4.7
production mixture	33.4	33.2
mineral and vitamins in mixture ¹	0.8	0.8
Chemical composition (g/kg DM)		
dry matter (g)	395	460
crude protein ²	164	147
nXP ³	153	152
crude fat	27.3	28.9
crude fibre	158	151
NEL (MJ/kg DM) ⁴	6.52	6.62

¹Mixture consisted per kg: 210, 30, 100, 70 g of calcium, phosphorus, sodium, magnesium; 750, 30, 80, 2,730 mg of copper, selenium, iodine, vitamin E; 500,000 and 75,000 IU of vitamin A and D₃, respectively.

²Crude protein – N x 6.25.

³nXP – protein utilized in the intestine [DLG-Futterwerttabellen 1997].

⁴NEL – net energy for lactation [Sommer *et al.* 1994].

Chemical and statistical analyses

The chemical composition of feeds used in the diets was determined using valid methods according to Decree No. 124/2001 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic [2001]. The content of crude protein was determined according to Kjeldahl (N×6.25). The value of NEL was estimated according to Sommer *et al.* [1994]. Fat, protein and lactose contents in milk samples (n=48) were determined spectrophotometrically using a MILCOSCAN 4000 device (FOSS ELECTRIC).

Milk fat was extracted with petroleum ether. FAs in isolated fat were reesterified to their methyl esters by a methanolic solution of potassium hydroxide. Methyl esters of FAs were determined by a gas-chromatographic method (GLC) using a Varian 3300 apparatus under conditions given by Samková *et al.* [2009]. The identification of FAs

was carried out using the analytical standards (SUPELCO). In total, 45 FAs were observed, out of which 33 were identified. The proportions of individual FAs were calculated from the ratio of their peak area to the total area of all the observed acids.

The analytical data were assessed statistically using Statistica CZ 6.1 program (Statsoft CR). For testing of significant differences between the breeds (Czech Fleckvieh; Holstein), *t*-test for independent samples, and within the breed (effect of feeding ration), *t*-test for dependent samples (within-group variation) were used.

Results and discussion

The effect of breed

Overall, FAs with 18 carbons (C18) have been assessed nutritionally as very desirable [German *et al.* 2009]. These acids are preformed as they originate from dietary lipids and adipose tissues reserves [Harvatine *et al.* 2009]. It is therefore supposed that composition of a ration and following biohydrogenation in the rumen both affect milk fat composition in a greater extent than does breed [Ferlay *et al.* 2011]. However, within the breed factors, cow's individuality can have a role [Samková *et al.* 2012], particularly on monounsaturated FAs [Communod *et al.* 2012] and CLA levels. Such animal factors are ascribed to the activity of stearoyl-CoA desaturase (SCD) [Milanesi *et al.* 2008; Marchitelli *et al.* 2013]. For instance, major source of CLA in milk fat is endogenous synthesis by SCD in the mammary gland and other tissues from vaccenic acid [Mosley *et al.* 2006]. Differences in CLA contents observed Berry *et al.* [2012] with values of 0.92, 1.15 and 1.12% of total FAs in Danish Jersey, Swedish Red and Danish Holstein, respectively.

Table 4. Level of selected C18 fatty acids (FA) and groups of FAs (g/100 g of total FA) in milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows as related to addition of fresh lucerne into feeding ration

FA ¹	Czech Fleckvieh				P (F)	Holstein				P (F)	P (B)
	Fresh ²		Silage ³			Fresh ²		Silage ³			
	mean	SD	mean	SD		mean	SD	mean	SD		
C18:0	8.8	1.2	9.2	1.9	0.3063	8.7	2.1	7.2	2.3	0.0012	0.0614
C18:1	22.1	5.4	22.6	6.6	0.3891	20.6	4.4	19.5	3.4	0.0923	0.1209
C18:2n-6	1.87	0.47	1.57	0.28	0.0057	1.78	0.21	1.54	0.24	0.0020	0.5319
C18:3n-3	0.54	0.13	0.34	0.09	0.0001	0.48	0.09	0.34	0.09	0.0001	0.5056
CLA	0.45	0.18	0.45	0.14	0.9729	0.35	0.11	0.31	0.11	0.1414	0.0046
SFA	67.8	6.5	68	7.2	0.7526	69.8	4.4	70.9	3.1	0.0968	0.1276
MUFA	25.4	5.7	25.9	6.7	0.3798	24.1	4.3	23.6	3	0.3876	0.2161
PUFA	3.9	1	3.2	0.6	0.0047	3.4	0.5	2.8	0.4	0.0027	0.0563

SD – standard deviation; P (F) – P value for effect of feeding ration; P (B) – P value for effect of breed.

¹CLA – isomer of conjugated linoleic acid (9,11 *cis*, *trans* C18:2); SFA – saturated FA; MUFA – monounsaturated FA; PUFA – polyunsaturated FA.

²Fresh – diet with maize and grass silages (47.0% of dry matter) + fresh lucerne (11.7% of dry matter).

³Silage – diet with maize and grass silages (58.8% of dry matter).

Different SCD activity between and within breeds occurred probably also in this work. The effect of breed was proved only for CLA ($P = 0.0046$), while it was insignificant in all other C18 acids including the groups of saturated FAs, monounsaturated FAs and PUFAs (Tab. 4). Nevertheless, the observed proportions of individual C18 acids, monounsaturated FAs and PUFA were higher in milk of Czech Fleckvieh cows. This could be caused also by different milk yield and fat content between the breeds, as Stoop *et al.* [2008] reported a negative genetic correlation (-0.35) between fat yield and the proportion of FAs > C18.

In this report, the total C18 level of 30.5 and 34.1% at fat yield of 1042 and 803 g/d was found for Holstein and Czech Fleckvieh, respectively (Fig. 1). Correlation coefficients (not tabulated) between fat yield and selected C18 FAs varied between -0.10 ($P > 0.05$) and -0.46 ($P < 0.01$).

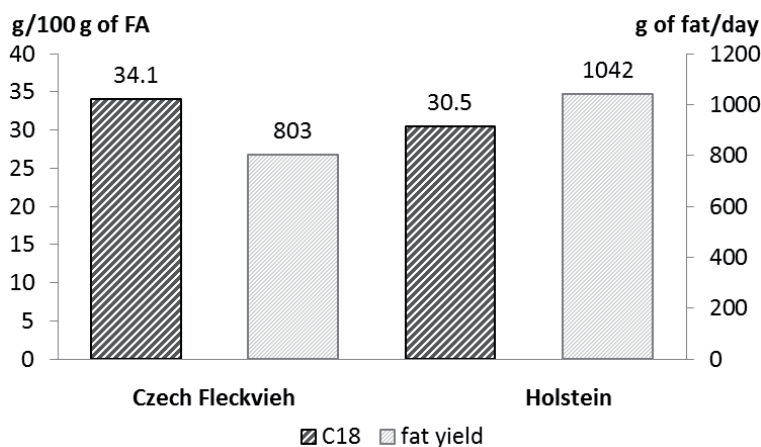


Fig. 1. Comparison of total content of C18¹ fatty acids (FAs, g/100 g of total FA) and fat yield² in milk samples of Czech Fleckvieh and Holstein cows.

¹C18 – sum of C18:0, C18:1, C18:2n-6, C18:3n-6, C18:3n-3, and 9,11 *cis, trans* C18:2

²Fat yield = fat content (g.kg⁻¹) x milk yield (kg.d⁻¹).

The effect of ration

Changes in the amount of stearic acid (C18:0) following the change of the rations varied between the breeds. The mean levels were 8.8 and 9.2% from total FAs during feeding with the portion of fresh lucerne (FRESH) and with a mixture of maize and grass silages (SILAGE), respectively, in Czech Fleckvieh, while respective values were 8.7 and 7.2% in Holstein cows (Tab. 4). Similar trend was found in oleic acid (C18:1). Nevertheless, the differences between the breeds were statistically not significant, and the effect of ration was confirmed only in stearic acid for Holstein cows ($P < 0.01$).

Feeding with fresh forages affected also the proportion of PUFA. An increase, especially of n-3 PUFA and CLA, was reported from many laboratories. Particularly fresh legumes had a positive effect [Van Dorland *et al.* 2008, Wiking *et al.* 2010],

and even ensiled ones [Morel *et al.* 2006]. Similarly positive effect on elevated n-3 PUFA proportion had also grazing [Leiber *et al.* 2005; Frelich *et al.* 2012], forage botanical diversity [Collomb *et al.* 2002] or organic farming [O'Donell *et al.* 2010]. On the contrary, the mentioned feeding systems decreased the proportion of linoleic acid (C18:2n-6) and consequently of n-6 PUFA group [Samková *et al.* 2011].

Significantly higher levels ($P<0.01$ and $P<0.001$) of essential linoleic and alpha-linolenic acids were found in milk fats of both breeds fed with the portion of fresh lucerne as compared to feeding with the silages. This can be explained by an elevated content of linoleic acid in fresh lucerne in comparison with other forages [Morel *et al.* 2006]. The increase following feeding with fresh lucerne was apparent particularly in alpha-linolenic acid. Its proportion was 0.54 and 0.48% in Czech Fleckvieh and Holstein cows, respectively. The respective relative increase was 59 and 41% as compared to feeding the silages. Such changes are in accordance with results of Leiber *et al.* [2005] and Palladino *et al.* [2010].

Feeding with fresh lucerne naturally affected also the total of n-3 PUFA and n-6 PUFA. The response was again more extensive in Czech Fleckvieh than in Holstein cows (Fig. 2). The relative changes were 22 and 17% ($P<0.01$) in n-6 PUFA, 59 and 47% ($P<0.001$) in n-3 PUFA for Czech Fleckvieh and Holstein cows, respectively.

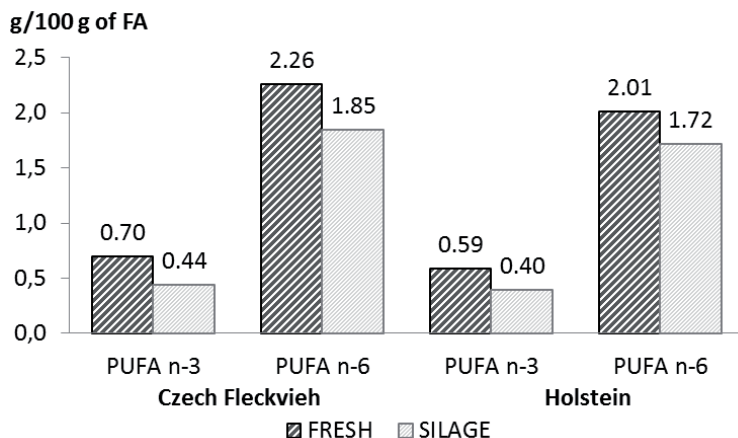


Figure 2. Proportion of polyunsaturated fatty acids n-3 (PUFA n-3)¹ and n-6 (PUFA n-6)² as related to addition of fresh lucerne into feeding ration (FRESH³ vs. SILAGE⁴) in milk fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows.

¹PUFA n-3 – sum of C18:3n-3, C20:4n-3, C20:5n-3, and C22:5n-3

²PUFA n-6 – sum of C18:2n-6, C18:3n-6, C20:3n-6, and C20:4n-6

³FRESH – diet with maize and grass silages (47.0% of dry matter) + fresh lucerne (11.7% of dry matter);

⁴SILAGE – diet with maize and grass silages (58.8% of dry matter).

As mentioned above, mean proportions of CLA were 0.45 and 0.35% in fat of Czech Fleckvieh and Holstein cows, respectively. The proportion was the same at both the rations in Czech Fleckvieh cows, while slightly decreased in Holstein cows

during feeding with the silages (Tab. 4). An increase of CLA reported by various authors after feeding with fresh forages was not thus proved. This can be explained by different type of fresh forage and by different level of fresh forage expressed as percentage in dry matter intake. Double and even higher increase in CLA proportion was found particularly in milk fat of grazed cows or after supplementation with plant oils [Flowers *et al.* 2008; Sterk *et al.* 2011].

The group of C18 FAs amounted about one third of total FAs in bovine milk fat. Stearic, oleic and linoleic acids prevail among saturated FAs, monounsaturated FAs and PUFA, respectively. All these FAs have been assessed as nutritionally desirable or neutral. If included also linolenic acid and CLA, the C18 group is indispensable and its proportion should be increased. As results from our experiment, total level of C18 FAs was higher in milk fat of Czech Fleckvieh cows as compared to Holstein cows' milk fat. It was observed both after feeding the cows with silages and after the supplementation of the silages with fresh lucerne. Fresh lucerne increased proportion of total C18 FAs in both the breeds, however, with only mild differences between the breeds. The changes in stearic acid and oleic acid were somewhat more extensive in Holstein cows, while those of essential linoleic and linolenic acids in Czech Fleckvieh cows. The different breed response on fresh lucerne was probably affected by diverse fat yield of the breeds.

REFERENCES

1. BERRY R., HYDAMAKA A., NOTO A., KOTYK E., ZAHRADKA P., 2012 – Grazing period variations in cow milk vaccenic acid (VA) and conjugated linoleic acid (CLA). *Journal of Nutrition & Food Sciences* 2, 136-142.
2. COLLOMB M., BUTIKOFER U., SIEBER R., JEANGROS B., BOSSET J.O., 2002 – Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal* 12, 649-659.
3. COMMUNOD, R., FAUSTINI, M., CHIESA, L.M., TORRE, M.L., LAZZATI, M., VIGO, D., 2012 – Milk Biodiversity: Future Perspectives of Milk and Dairy Products from Autochthonous Dairy Cows Reared in Northern Italy. In: ALADJADJIYAN A. (Ed.) Food Production- Approaches, Challenges and Tasks. Rijeka, Croatia: InTech, 270 p. ISBN 978-953-307-887-8.
4. DEWHURST R.J., SHINGFIELD K.J., LEE M.R.F., SCOLLAN N.D., 2006 – Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology* 131, 168-206.
5. Decree of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic No. 124/2001, 2001 – The requirements for feeds sampling and principles of laboratory control methods of feeds, supplements and premixes and the mode of sample storage (in Czech). Statute Book, No. 50, 3091-3216.
6. DLG-Futterwerttabellen, 1997 – DLG-Futterwerttabellen – Wiederkäuer (in German). 7th Ed., Frankfurt am Main: DLG-Verlag, 212 p. ISBN 3-7690-0547-3.
7. FAO, 2010 – Fats and fatty acids in human nutrition- Report of an expert consultation. *FAO Food and Nutrition Paper* 91, 189 p.
8. FERLAY A., GLASSER F., MARTIN B., ANDUEZA D., CHILLIARD Y., 2011 – Effects of feeding factors and breed on cow milk fatty acid composition: Recent data. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* 1, 137-145.

9. FLOWERS G., IBRAHIM S.A., ABUGHAZALEH A.A., 2008 – Milk fatty acid composition of grazing dairy cows when supplemented with linseed oil. *Journal of Dairy Science* 91, 722-730.
10. FRELICH J., ŠLACHTA M., HANUŠ O., ŠPIČKA J., SAMKOVÁ E., WEGLARZ A., ZAPLETAL P., 2012 – Seasonal variation in fatty acid composition of cow milk in relation to the feeding system. *Animal Science Papers and Reports* 30, 219-229.
11. GERMAN J.B., GIBSON R.A., KRAUSS R.M., NESTEL P., LAMARCHE B., VAN STAVEREN W.A., STEIJNS J.M., DE GROOT L., LOCK A.L., DESTAILLATS F., 2009 – A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *European Journal of Nutrition* 48, 191-203.
12. HARVATINE K.J., BOISCLAIR Y.R., BAUMAN D.E., 2009 – Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal* 3, 40-54.
13. HAUG A., HOSTMARK A.T., HARSTAD O.M., 2007 – Bovine milk in human nutrition - a review. *Lipids in Health and Disease* 6, 1-16.
14. HOMOLKA P., KUDRNA V., 2007 – Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk by animal nutrition (in Czech). Praha-Uhřetěves: Výzkumný ústav živočišné výroby. 42 p. ISBN 978-80-86454-87-0.
15. JENSEN R.G., 2002 – The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science* 85, 295-350.
16. KALAC P., SAMKOVA E., 2010 – The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science* 55, 521-537.
17. LARSEN M.K., HYMOLLER L., BRASK-PEDERSEN D.B., WEISBJERG M.R., 2012 – Milk fatty acid composition and production performance of Danish Holstein and Danish Jersey cows fed different amounts of linseed and rapeseed. *Journal of Dairy Science* 95, 3569-3578.
18. LEIBER F., KREUZER M., NIGG D., WETTSTEIN H.R., SCHEEDER M.R.L., 2005 – A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows' milk of alpine origin. *Lipids* 40, 191-202.
19. MARCHITELLI C., CONTARINI G., DE MATTEIS G., CRISA A., PARISET L., SCATA M.C., CATILLO G., NAPOLITANO F., MOIOLI B., 2013 – Milk fatty acid variability: effect of some candidate genes involved in lipid synthesis. *Journal of Dairy Research* 80, 165-173.
20. 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.
21. MOREL I., WYSS U., COLLOMB M., 2006 – Grünfütter- oder Silagezusammensetzung und Milchinhaltsstoffe (in German). *Agrarforschung* 13, 228-233.
22. MOSLEY E.E., SHAFII B., MOATE P.J., MCGUIRE M.A., 2006 – Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *Journal of Nutrition* 136, 570-575.
23. O'DONNELL A.M., SPATNY K.P., VICINI J.L., BAUMAN D.E., 2010 – Survey of the fatty acid composition of retail milk differing in label claims based on production management practices. *Journal of Dairy Science* 93, 1918-1925.
24. PALLADINO R.A., BUCKLEY F., PRENDIVILLE R., MURPHY J.J., CALLAN J., KENNY D.A., 2010 – A comparison between Holstein-Friesian and Jersey dairy cows and their F-1 hybrid on milk fatty acid composition under grazing conditions. *Journal of Dairy Science* 93, 2176-2184.
25. 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.
26. POULSEN N.A., GUSTAVSSON F., GLANTZ M., PAULSSON M., LARSEN L.B., LARSEN M.K., 2012 – The influence of feed and herd on fatty acid composition in 3 dairy breeds (Danish Holstein, Danish Jersey, and Swedish Red). *Journal of Dairy Science* 95, 6362-6371.

27. SAMKOVA E., PESEK M., SPICKA J., PELIKANOVA T., HANUS O., 2009 – The effect of feeding diets markedly differing in the proportion of grass and maize silages on bovine milk fat composition. *Czech Journal of Animal Science* 54, 93-100.
28. SAMKOVA E., SPICKA J., PESEK M., PELIKANOVA T., HANUS O., 2012 – Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science* 42, 83-100.
29. SAMKOVÁ E., 2011 – Factors affecting fatty acid composition of cow's milk fat (in Czech). Lecturer's habilitation thesis. University of South Bohemia, Agricultural Faculty, České Budějovice, Czech Republic, 60 p.
30. SOMMER A., ČEREŠŇÁKOVÁ Z., FRYDRYCH Z., KRÁLÍK O., KRÁLÍKOVÁ Z., KRÁSA A., PAJTÁŠ M., PETRIKOVIČ P., POZDÍŠEK J., ŠIMEK M., TRÍNÁCTÝ J., VENCL B., ZEMAN L., 1994 – Nutrient requirements and tables of nutrient value of ruminant feeds (in Czech). 1st Ed. Pohořelice: ČZS VÚVZ. 198 p. ISBN 80-901598-1-8.
31. STEINSHAMN H., 2010 – Effect of forage legumes on feed intake, milk production and milk quality - a review. *Animal Science Papers and Reports* 28, 195-206.
32. STERK A., JOHANSSON B.E.O., TAWHEEL H.Z.H., MURPHY M., VAN VUUREN A.M., HENDRIKS W.H., DIJKSTRA J., 2011 – Effects of forage type, forage to concentrate ratio, and crushed linseed supplementation on milk fatty acid profile in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94, 6078-6091.
33. STOOP W.M., VAN ARENDONK J.A.M., HECK J.M.L., VAN VALENBERG H.J.F., BOVENHUIS H., 2008 – Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science* 91, 385-394.
34. VAN DORLAND H.A., KREUZER M., LEUENBERGER H., WETTSTEIN H.R., 2008 – Comparative potential of white and red clover to modify the milk fatty acid profile of cows fed ryegrass-based diets from zero-grazing and silage systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 77-85.
35. WHITING C.M., MUTSVANGWA T., WALTON J.P., CANT J.P., McBRIDE B.W., 2004 – Effects of feeding either fresh alfalfa or alfalfa silage on milk fatty acid content in Holstein dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 113, 27-37.
36. WIKING L., THEIL P.K., NIELSEN J.H., SORENSEN M.T., 2010 – Effect of grazing fresh legumes or feeding silage on fatty acids and enzymes involved in the synthesis of milk fat in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 77, 337-342.

Příloha 3:

*Koubová J., Samková E., Hasoňová L., Kala R., Špička J., Kváč M., Hanuš O. (2014):
Vliv zkrmování čerstvé vojtěšky na zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku dojníc.
Mlékařské listy, 147, 41-44.*

- a) zpřísněním smluvních forem, které předpokládá povinnost písemné formy a minimální dobu trvání smlouvy (čl. 185 f, odst. 1-2);
- b) významná změna v rozložení přirozené vyjednávací síly smluvních stran, s předpokladem, že ke společnému jednání se mohou spojit pouze výrobci a to v míře, která může dosáhnout až 33% národní produkce. Pro odběratele platí nadále běžná pravidla, tedy povinnost jednat odděleně (čl. 126c).

Někomu naivnímu se může zdát, že je to řešení všech problémů. "Mléčný balíček" byl ze strany zemědělců přijat s velkým nadšením, dle našeho názoru neoprávněným, přinejmenším ze dvou důvodů: nedodržuje to, co slibuje, a má škodlivé vedlejší účinky.

- a) EU umožňuje členským státům, aby povinně zavedly písemné smlouvy, ale nemůže jim dovolit, aby nutily strany k fixní ceně. Proto, tváří v tvář formálnímu požadavku, který komplikuje obchodní praxi, nebylo dosaženo žádného podstatného vlivu na kolísavost cen. I kdyby byla ve smlouvě uvedena fixní cena, znamenalo by to jednoduše zvýšení rizika pro obě strany, vezmeme-li v úvahu, že by se kolísavost cen i nadále na trhu projevovala, a rozhodně není ovlivňována cenami uvedenými ve smlouvách mezi producenty a odběrateli.
- b) Umožnit soustředění tak vysokého podílu nabídky (33%) bez toho, že by se mohli účastnit společnou cestou i odběratelé, znamená akceptovat to, že zpracovatelé budou ponechání napospas "organizacím výrobců" (PO's), které budou moci působit na odběratele abnormální vyjednávací a vyděračskou silou s rizikem, že mnohým zpracovatelským podnikům způsobí hlubokou krizi. Tato volba svědčí o kulturním nepřátelství vůči roli trhu a hospodářské soutěže a je v rozporu se všemi principy, na nichž je založena EU a zvláště samotná reforma společné zemědělské politiky.

Krom toho je třeba zdůraznit, že Nařízení (čl. 185f, odst. 3) neplatí pro zpracovatelská družstva a jejich společníky, tedy početně nejvýznamnější část evropských výrobců. Toto rozhodnutí dále snižuje skutečný rozsah směrnice a vážně narušuje trh rozlišováním mezi družstevními a nedružstevními zpracovateli. Pokud by vůbec někdy měl "Mléčný balíček" mít pozitivní účinky pro producenty mléka, byly by omezeny pouze na dodavatele nedružstevních odběratelů.

Poslední argument uváděný na obranu "Mléčného balíčku" je ten, že umožnil producentům sýrů s chráněným označením původu (CHOP), aby si řídili nabídku vlastního produktu (čl. 126 prováděcí směrnice). Tato norma, kterou naléhavě vyžadovala Itálie, coby hlavní výrobce sýrů se značkou CHOP, zavádí na unijní úrovni výjimku z národních "antimonopolních" pravidel, která by bránila vytvářet mezi podniky kartel k regulaci nabídky. Pod ochranou této normy mohli hlavní evropští výrobci CHOP sýrů Grana Padano a Parmigiano Reggiano, kteří zpracovávají téměř 45% objemu italského mléka, vytvořit systém silné penalizace aplikované na toho, kdo překročí přidělenou kvótu. Zdá se, že tato směrnice "Mléčného balíčku" dává výhodu těm výrobcům

mléka, jejichž produkce je určena ke zpracování na výrobky CHOP a je schopna udržet ceny s kartelem. Ve skutečnosti podporuje zaujetí pasivního postoje, který vytváří hospodářskou neefektivnost regulovaných systémů a zhoršuje domácí i mezinárodní konkurenceschopnost samotného produktu s chráněným označením původu.

Závěrem bychom mohli říci, že "Mléčný balíček" je narychlo připravené opatření, které je v rozporu se zásadami, na kterých se zakládá reforma Společné organizace zemědělských trhů (SOT) s mlékem, s ukončením režimu kvót a stabilizačních intervencí a v rozporu s otevřením mezinárodních trhů. Vytváří předpoklady pro závažné narušení hospodářské soutěže bez toho, že by měl významné konkrétní účinky ve prospěch producentů.

Autor tohoto příspěvku se domnívá, že "Mléčný balíček" je projevem kultury velmi rozšířené v syndikátním zemědělském a politickém světě EU, která považuje za nezbytné aktivní působení politiky na trhu, a to prostřednictvím kvót, regulací, intervencí, cel a čehokoliv dalšího. Abyste se opravdu mohli stát hlavními hráči v rámci světového růstu spotřeby mléka a mléčných produktů, bude z tohoto pohledu v blízké budoucnosti nutné bránit nabytou ekonomickou svobodu, kterou se v tomto odvětví podařilo získat spíše z naléhavé potřeby než skutečnou zásluhou těch, kteří jsou právě u moci.

Literatura:

Sborník přednášek "Kroměřížské mlékařské dny 2014"; 11/2014

Přijato do tisku: 4. 11. 2014

Lektorováno: 24. 11. 2014

VLIV ZKRMOVÁNÍ ČERSTVÉ VOJTĚŠKY NA ZASTOUPENÍ MASTNÝCH KYSELIN V MLÉČNÉM TUKU DOJNIC

Jana Koubová¹, Eva Samková¹, Lucie Hasoňová¹, Robert Kala¹, Jiří Špička¹, Martin Kváč¹, Oto Hanuš²

¹ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Studentská 13, 370 05 České Budějovice

² Výzkumný ústav mlékárenský, Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6

The effects of feeding fresh lucerne on fatty acid composition in bovine milk fat

Abstrakt

V mléčném tuku dojníc plemene český strakatý skot (n = 38) a holštýnský skot (n = 38) byly sledovány změny v obsahu vybraných mastných kyselin. Dojnice byly krmeny nejprve krmnou dávkou, která obsahovala objemnou

píci jak konzervovanou (kukuřičná a travní siláž; 24,5 % a 22,5 % ze sušiny krmné dávky), tak čerstvou (vojtěška setá; 11,7 % ze sušiny krmné dávky) a poté krmnou dávkou složenou pouze z objemné píce konzervované (kukuřičná a travní siláž; 36,9 % a 21,9 % ze sušiny krmné dávky). Na přídatek čerstvé vojtěšky zareagovaly dojnice především zvýšeným zastoupením esenciálních mastných kyselin linolové (1,80 %, resp. 1,53 %; $p < 0,001$) a α -linolenové (0,52 %, resp. 0,32 %; $p < 0,001$) a polynenasycených mastných kyselin (3,66 %, resp. 2,95 %; $p < 0,001$). Statisticky významně ($p < 0,05$) vyšší zastoupení bylo zjištěno i v případě konjugované kyseliny linolové. U ostatních mastných kyselin mléčného tuku, včetně celkového obsahu nasycených a nenasycených mastných kyselin byly nalezeny nevýznamné rozdíly. Je však zřejmé, že zařazení čerstvé vojtěšky do krmné dávky má v důsledku zvýšení nutričně hodnotných mastných kyselin příznivý vliv.

Klíčová slova: dojnice, mléko, mastné kyseliny, krmná dávka, čerstvá píce

Abstract

The cows of Czech Fleckvieh cattle ($n = 38$) and Holstein cattle ($n = 38$) were fed either fresh forage (11.7% of dry matter) plus silage (maize and grass silage; 24.5% and 22.5% of dry matter) or only silage (maize and grass silage; 36.9% and 21.9% of dry matter) to determine the changes in milk fatty acids (FA). The addition of fresh forage (lucerne; *Medicago sativa* L.) caused an increased proportion of essential FAs: linoleic acid (1.80% respectively 1.53%; $p < 0.001$) and α -linolenic acid (0.52% respectively 0.32%; $p < 0.001$), and polyunsaturated FAs (3.66% respectively 2.95%; $p < 0.001$). A significantly ($p < 0.05$) higher proportion was found also in the proportion of conjugated linoleic acid. For other FAs, including the total content of saturated and unsaturated FAs were found minor differences. However, it is evident, that the inclusion of fresh lucerne to the diet has beneficial effect due to the increase of nutritionally valuable fatty acids.

Keywords: dairy cows, milk, fatty acids, diet, fresh forage

Úvod

Mléko je důležitou složkou lidské výživy. Složení mléčného tuku je předmětem výzkumu v souvislosti s jeho nutričním významem i vlivem na technologické a senzorické vlastnosti mléka a mléčných výrobků.

Mléčný tuk obsahuje vysoký podíl (60 - 70 %) nasycených mastných kyselin (SFA), dále mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) v množství 20 - 30 % a malé množství polynenasycených mastných kyselin (PUFA) v množství cca 5 % (Lock a Shingfield, 2004). Typické je rovněž zastoupení mastných kyselin s krátkým uhlíkovým řetězcem (těkavé mastné kyseliny; VFA) - Kaylegian and Lindsay (1995) a obsah konjugované kyseliny linolové (Dhiman, 2005).

Zastoupení jednotlivých mastných kyselin i jejich skupin je ovlivněno celou řadou faktorů, které jsou autorů (Palmquist et al., 1993; Jensen, 2002) převážně rozdělovány do dvou skupin, na faktory biologické a na faktory výživy. Z první skupiny patří mezi významné faktory např. plemeno a individualita dojnice (Samková et al., 2012), z druhé skupiny faktorů je důležitá zejména úroveň výživy a skladba krmné dávky, případně poměr mezi objemnými a jadřnými krmivými (Dewhurst et al., 2006).

Využívání pastvy (Frelich et al., 2012) nebo produkce mléka v ekologickém systému hospodaření (O'Donnell et al., 2010) výrazně pozměňují spektrum mastných kyselin ve prospěch mastných kyselin nenasycených (MUFA i PUFA). Také pouhé zkrmování čerstvé píce má za následek zvýšené zastoupení těchto nutričně příznivějších mastných kyselin (Leiber et al., 2005), neboť v průběhu procesu silážování dochází v krmivu ke snižování celkového obsahu nenasycených mastných kyselin (UFA) (Kalač a Samková, 2010).

Positivní vliv na zastoupení PUFA řady n-3 byl zjištěn zejména při zkrmování leguminóz (vojtěška, jetel). Wiking a kol. (2010) zjistili, že dojnice produkují také více kyselin konjugované linolové (CLA) a *trans* vakcenové, která je jejím prekursorem. Zkrmování rané vojtěško-travní směsi doporučují i Morel et al. (2006), kteří ji upřednostňují před zkrmováním ostatních druhů zelené píce.

Cílem této práce bylo vyhodnocení zastoupení vybraných mastných kyselin v mléčném tuku dojníc českého strakatého a holštýnského plemene v závislosti na přídatku čerstvé vojtěšky do krmné dávky.

Materiál a metodika

Syrové mléko pro stanovení základních charakteristik a zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku bylo odebráno (Vyhláška MZe 211/2004) od dojníc dvou plemen (české strakaté, holštýnské) v rámci pravidelné kontroly užitkovosti (červen, červenec 2006) na farmě v jižních Čechách hospodařící v nadmořské výšce 410 - 440 m n. m. V obou měsících bylo odebráno vždy 19 vzorků od každého plemene (tabulka 1).

Tab. 1 Charakteristika dojníc českého strakatého (C) a holštýnského plemene (H), dojivost a složení mléka při zkrmování dvou krmných dávek (KD 1 a KD 2)

	KD 1				KD 2			
	C (n = 19)		H (n = 19)		C (n = 19)		H (n = 19)	
	x	s _x	x	s _x	x	s _x	x	s _x
Pořadí laktace	1,95	0,78	2,05	1,03	1,80	0,77	2,42	1,02
Dny laktace	169	65	174	96	164	68	147	97
Dojivost (kg/den)	18,3	4,5	22,6	6,9	17,4	4,3	24,7	5,8
Tuk (%)	4,44	0,76	4,16	0,77	4,43	0,67	4,18	0,89
Bílkovina (%)	3,60	0,32	3,63	0,33	3,57	0,36	3,35	0,48
Laktóza (%)	4,75	0,43	4,77	0,25	4,77	0,31	4,87	0,28

KD 1 krmná dávka s přídatkem čerstvé vojtěšky (červen 2006)

KD 2 krmná dávka založená pouze na objemné píci konzervované (červenec 2006)

Tab. 2 Charakteristika krmných dávek (KD 1 a KD 2), jejich skladba a živinové složení

	KD 1	KD 2
Příjem (kg/den)		
Čerstvé hmoty	35,3	34,3
Sušiny	18,4	18,4
Skladba krmné dávky (% ze sušiny krmné dávky)		
Kukuřičná siláž	24,5	36,9
Travní siláž	22,5	21,9
Čerstvá vojtěška	11,7	-
Seno	2,6	2,5
Mačkaný oves	4,7	4,7
Produkční krmná směs ¹	33,4	33,2
Minerální a vitam. krmná směs	1,7	1,9
Živinové složení krmné dávky		
Sušina (g)	411	427
Dusíkaté látky (g/kg z DM)	144	116
NE _L (MJ/kg) ²	6,0	6,3

¹ produkční krmná směs (%): ječmen (20), pšenice (20), oves (12), extrahovaný sójový šrot (25), extrahovaný řepkový šrot (20), sůl, vitaminy a minerální látky (3)

² netto energie laktace

Dojnicím byla nejprve zkrmována krmná dávka, ve které část konzervovaných objemných krmiv nahradila čerstvá vojtěška setá a poté byla zkrmována krmná dávka, jejíž objemná krmiva tvořila pouze konzervovaná píce (tabulka 2). Obě krmné dávky byly sestaveny podle DLG (1997) a zkrmovány minimálně 3 týdny před odběrem.

Obsah dusíkatých látek v krmné dávce byl stanoven metodou podle Kjeldahla ($N \times 6,25$), hodnota NEL (netto energie laktace) byla vypočítána podle Sommera *et al.* (1994). Obsahy tuku, bílkovin a laktózy ve vzorcích mléka byly stanoveny spektrofotometricky pomocí přístroje Milcoscan 4000 (Foss Electric). Mastné kyseliny z mléčného tuku byly stanoveny metodou plynové chromatografie (Pešek *et al.*, 2006).

Analytické údaje byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu Statistica CZ 6.1 (Statsoft CR). Pro testování hladin významnosti byl použit t-test.

Výsledky a diskuze

Ve sledovaném pokusu byly zaznamenány změny ve spektru mastných kyselin (tabulka 3). Krmná dávka (KD 1) s přidavkem čerstvé píce (vojtěška setá) znamenala nižší zastoupení SFA v mléčném tuku dojnic v porovnání s tukem dojnic krmných KD 2, která obsahovala pouze objemnou píci konzervovanou (kukuřičnou a travní siláž). Zjištěné rozdíly však nebyly statisticky významné (68,78 %, resp. 69,11 %; $p = 0,2560$). Ve shodě s literárními prameny (Leiber *et al.*, 2005; Couvreur *et al.*, 2006; Dewhurst *et al.*, 2006) bylo prokázáno, že přidavek čerstvé píce zvýšil zastoupení UFA (28,31 %, resp. 28,16 %). Ani zde však nebyl rozdíl statisticky významný ($p = 0,3098$).

Předpoklad vyššího zastoupení ve skupině MUFA po zkrmování čerstvé píce se nepotvrdil (24,65 %, resp. 25,21 %; $p = 0,4335$). Tato skutečnost mohla být způsobena

Tab. 3 Průměrná pořadí a dny laktace, dojivost a zastoupení vybraných mastných kyselin a jejich skupin v mléčném tuku dojnic v závislosti na krmné dávce

	KD 1 (n = 38)			KD 2 (n = 38)			p
	x	s _x	v %	x	s _x	v %	
Pořadí laktace	2,00	0,90	45,0	2,10	0,94	44,8	0,3651
Dny laktace	171	81	47,1	156	83	53,2	0,1478
Dojivost (kg/den)	20,4	6,2	30,1	21,0	6,2	29,7	0,1997
C12:0	4,08	0,74	18,14	4,04	0,90	22,28	0,3738
C14:0	13,01	1,66	12,76	13,06	2,31	17,69	0,2505
C16:0	32,07	3,36	10,48	33,04	3,40	10,29	0,0732
C18:0	8,56	1,92	22,43	8,33	2,42	29,05	0,1372
C18:1	21,15	4,17	19,72	21,58	5,46	25,30	0,4953
C18:2n-6	1,80	0,36	20,00	1,53	0,29	18,95	0,0000
C18:3n-3	0,52	0,13	25,00	0,32	0,08	25,00	0,0000
CLA ¹	0,41	0,13	31,71	0,36	0,15	41,67	0,0142
SFA ²	68,78	4,71	6,85	69,11	5,64	8,16	0,2560
VFA ³	8,66	1,08	12,47	8,21	1,56	19,00	0,1741
UFA ⁴	28,31	4,67	16,50	28,16	5,18	18,39	0,3098
MUFA ⁵	24,65	4,14	16,80	25,21	5,27	20,90	0,4335
PUFA ⁶	3,66	0,76	20,77	2,95	0,59	20,00	0,0000

KD 1 krmná dávka s přidavkem čerstvé vojtěšky (červen 2006)

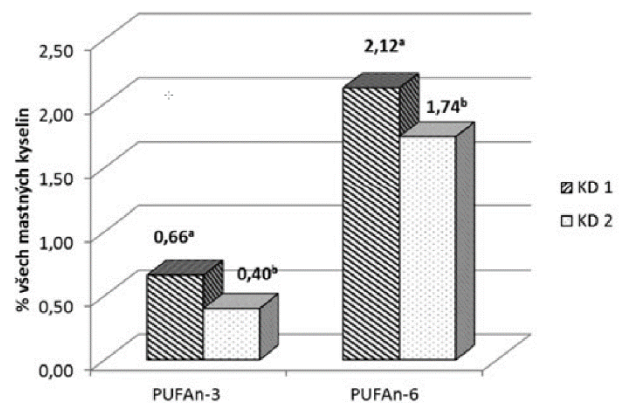
KD 2 krmná dávka založená pouze na objemné píci konzervované (červenec 2006)

¹ konjugovaná kyselina linolová; ² nasycené mastné kyseliny (MK); ³ těkavé MK;

⁴ nenasycené MK; ⁵ mononenasycené MK; ⁶ polynenasycené MK

na poměrně vysokým obsahem travní siláže v KD 2 (21,9 % ze sušiny), neboť jak někteří autoři uvádějí, zkrmování travní siláže v kombinaci s kukuřičnou nebo směsnou siláží má vliv na zvýšené obsahy MUFA (Kay *et al.*, 2005; Samková *et al.*, 2009) v porovnání se zkrmováním jednodruhových siláží - kukuřičných či travních (Kalač a Samková, 2010).

Na druhé straně, z tabulky 3 vyplývá, že přidavkem čerstvé vojtěšky do krmné dávky bylo dosaženo průkazně vyšších obsahů u kyselin linolové (1,80 %, resp. 1,53 %; $p < 0,001$) a α -linolenové (0,52 %, resp. 0,32 %; $p < 0,001$). Obě mastné kyseliny patří mezi esenciální,

Graf 1 Zastoupení polynenasycených mastných kyselin skupiny n-3 (PUFA n-3) a n-6 (PUFA n-6) v mléčném tuku dojnic v závislosti na krmné dávce

^{a, b} průměry s odlišnými horními indexy ve skupinách PUFA n-3 a PUFA n-6 se statisticky významně liší ($p < 0,001$)

KD 1 krmná dávka s přidavkem čerstvé vojtěšky (červen 2006)

KD 2 krmná dávka založená pouze na objemné píci konzervované (červenec 2006)

tn. musí být člověkem přijímány ve stravě. Jejich nedostatek způsobuje poškození kůže, poruchy reprodukce, snížení duševních schopností a deprese. Jsou nezbytné pro zdravý růst a funkci buněk celého těla, zejména pak pro růst svalů, vývoj nervů a vnitřních orgánů (Velíšek a Hajšlová, 2009).

S ohledem na skutečnost, že výše zmíněné esenciální mastné kyseliny zároveň tvoří z hlediska zastoupení podstatnou část skupin PUFAn-6 a PUFAn-3, je logické, že bylo dosaženo průkazně vyšších obsahů také v těchto skupinách - graf 1 a v celkovém obsahu skupiny PUFA (3,66 % a 2,95 %; $p < 0,001$). Zvýšené obsahy PUFA, zejména PUFAn-3 při zkrmování vojtěšky, popř. dalších jetelovin popisují rovněž Van Dorland et al. (2008), Flowers et al. (2008) či Wiking et al. (2010).

Závěr

Z výsledků vyplývá, že na přídavek čerstvé vojtěšky v krmné dávce zareagovaly dojnice českého strakatého a holštýnského skotu především zvýšeným zastoupením esenciálních mastných kyselin linolové a α -linolenové a polynenasycených mastných kyselin. Statisticky významně vyšší zastoupení bylo zjištěno i v případě konjugované kyseliny linolové. U ostatních mastných kyselin mléčného tuku, včetně celkového obsahu nasycených a nenasycených mastných kyselin byly nalezeny nevýznamné rozdíly pravděpodobně v důsledku vyššího zastoupení travní siláže ve druhé krmné dávce. Je však zřejmé, že zařazení čerstvé vojtěšky do krmné dávky má v důsledku zvýšení nutričně hodnotných mastných kyselin příznivý vliv.

Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou projektů MZe ČR QH 81210, GA JU 011/2013/Z a RO1414 (z února 2013).

Seznam literatury

- COUVREUR S., HURTAUD C., LOPEZ C., DELABY L., PEYRAUD J.L. (2006): The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. *Journal of Dairy Science*, 89, 1956-1969.
- DEWHURST R.J., SHINGFIELD K.J., LEE M.R.F., SCOLLAN N.D. (2006): Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 168-206.
- DHIMAN T.R., NA S.H., UR A.L. (2005): Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 463-482.
- DLG (1997): DLG-Futterwerttabellen - Wiederkäuer (in German). 7. vyd., Frankfurt: DLG-Verlag, 212 s. ISBN 3-7690-0547-3.
- FLOWERS G., IBRAHIM S.A., ABUGHAZALEH A.A. (2008): Milk fatty acid composition of grazing dairy cows when supplemented with linseed oil. *Journal of Dairy Science*, 91, 722-730.
- FRELICH J., ŠLACHTA M., HANUŠ O., ŠPIČKA J., SAMKOVÁ E., WEGLARZ A., ZAPLETAL P. (2012): Seasonal variation in fatty acid composition of cow milk in relation to the feeding system. *Animal Science Papers and Reports*, 30, 219-229.
- JENSEN R.G. (2002): The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85, 295-350.
- KALAC P., SAMKOVÁ E. (2010): The effect of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55, 521-537.

- KAY J.K., ROCHE J.R., KOLVER E.S., THOMSON N.A., BAUMGARD L.H. (2005): A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 72, 322-332.
- KAYLEGIAN K.E., LINDSAY R.C. (1995): *Handbook of milk fat fractionation technology and applications*. Champaign, Illinois: AOCS Press, 657 s. ISBN 0-935315-57-8.
- LEIBER F., KREUZER M., NIGG D., WETTSTEIN H.R., RICHARD M., SCHEEDER L. (2005): A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows' milk of alpine origin. *Lipids*, 40, 191-202.
- LOCK A.L., SHINGFIELD K.J. (2004): Optimising milk composition. In: KEBREAB E., MILLS J., BEEVER D.E. (Eds.): *Dairying - Using Science to Meet Consumers' Needs*. British Society of Animal Science, Nottingham University Press, Loughborough, UK, 29, 107-188.
- MOREL I., WYSS U., COLLOMB M. (2006): Grünfütter-oder Silage zu semmen set zung und Milchinhaltsstoffe. *Agrarforschung Schweiz*, 13, 228-233.
- O'DONNELL A.M., SPATNY K.P., VICINI J.L., BAUMAN D.E. (2010): Survey of the fatty acid composition of retail milk differing in label claims based on production management practices. *Journal of Dairy Science*, 93, 1918-1925.
- 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.
- PEŠEK M., SAMKOVÁ E., ŠPIČKA J. (2006): Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 51, 181-188.
- SAMKOVÁ E., ŠPIČKA J., PEŠEK M., PELIKÁNOVÁ T., HANUŠ O. (2012): Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science*, 42, 83-100.
- SAMKOVÁ E., PEŠEK M., ŠPIČKA J., PELIKÁNOVÁ T., HANUŠ O. (2009): The effect of feeding diets markedly differing in the proportion of grass and maize silages on bovine milk fat composition. *Czech Journal of Animal Science*, 54, 93-100.
- SOMMER A., ČEREŠŇÁKOVÁ Z., FRYDRYCH Z., KRÁLÍK O., KRÁLÍKOVÁ Z., KRÁSA A., PAJTÁŠ M., PETRIKOVIČ P., POZDÍŠEK J., ŠIMEK M., TRÍNÁCTÝ J., VENCL B., ZEMAN L. (1994): *Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro přežvýkavce*. 1. vyd. Pohořelice: ČZS VÚVZ, 198 s. ISBN 80-901598-1-8.
- VAN DORLAND H.A., KREUZER M., LEUENBERGER H., WETTSTEIN H.R. (2008): Comparative potential of white and red clover to modify the milk fatty acid profile of cows fed ryegrass-based diets from zero-grazing and silage systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 77-85.
- VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J. (2009): *Chemie potravin 1*. Tábor: Osis, 602 s.
- VYHLÁŠKA MZe č. 211/2004 o metodách zkoušení a způsobu odběru a přípravy kontrolních vzorků. 2004
- WIKING L., THEIL P.K., NIELSEN J.H., SØRENSEN T. (2010): Effect of grazing fresh legumes or feeding silage on fatty acids and enzymes involved in the synthesis of milk fat in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 77, 337-342.

Kontaktní adresa:

doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.,
Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů,
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Zemědělská fakulta, Studentská 13,
370 05 České Budějovice, Česká republika,
e-mail: samkova@zf.jcu.cz

Přijato do tisku: 4. 11. 2014

Lektorováno: 28. 11. 2014

Příloha 4:

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

Porovnání metod stanovení mastných kyselin v mléce

E. Samková¹, O. Hanuš², J. Spíčka¹, R. Kala¹, J. Koubová¹, P. Smetana¹, L. Hasoňová¹, Z. Křížová¹, P. Kopunec³, J. Kopecký²
¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, ²Výzkumný ústav mlékárenský Praha, ³Českomoravská společnost chovatelů a. s., Hradištko

Souhrn

V chovech českého strakatého a holštýnského skotu bylo odebráno celkem 78 individuálních vzorků mléka pro porovnání dvou metod analýzy mastných kyselin – rutinní (pomocí infračervené spektroskopie – MIR-FT) a referenční (pomocí plynové chromatografie – GC). Z výsledků vyplývá, že mastné kyseliny C16:0 a C18:1 a skupiny nasycených a nenasycených mastných kyselin lze stanovit pomocí MIR-FT s poměrně vysokou mírou věrohodnosti (korelace 0,7543, 0,7607, 0,8424 a 0,9492; $p < 0,001$). V případě skupiny polyneenasycených mastných kyselin je validační koeficient korelace nižší (0,2891; $p < 0,05$).

Klíčová slova: kráva; individuální vzorek mléka; plynová chromatografie; infračervená spektroskopie; věrohodnost analytických výsledků; korelace; kalibrace; validace

Summary

78 individual milk samples were taken in the Czech Fleckvieh and Holstein dairy cow herds to compare two methods for analyses of fatty acids – routine (using infrared spectroscopy – MIR-FT) and reference (by gas chromatography – GC). The results show that the fatty acids C16:0 and C18:1 and the group of saturated and unsaturated fatty acids can be determined using MIR-FT with a relatively high reliability (correlations 0.7543, 0.7607, 0.8424 and 0.9492; $p < 0.001$). In case of polyunsaturated fatty acids is the validation correlation coefficient lower (0.2891; $p < 0.05$).

Keywords: cow; individual milk sample; gas chromatography; infrared spectroscopy; analytical result reliability; correlation; calibration; validation



Tab. 1 – Parametry chromatografické analýzy

Parametr	Hodnota
Kolona	SelectFAME (Varian), 50 mV, 0,25 mm
Detektor	FID (plamenově ionizační)
Teplota:	
– kolona	55 °C – 5 min, 40 °C/min – 170 °C, 2 °C/min – 196 °C, 10 °C/min – 210 °C – 8 min
– injektor	250 °C
– detektor	250 °C
Nosný plyn	helium
Průtok helia	1,8 ml/min
Nástřik	1 μl, split 10

Tab. 2 – Základní statistické charakteristiky vybraných mléčných ukazatelů

Ukazatel	Český strakatý skot (n = 39)			Holštýnský skot (n = 39)			Celkem		
	x	s _x	v%	x	s _x	v%	x	s _x	v%
Dojnost (kg)	24,6	6,8	27,7	29,9	8,9	29,8	27,2	6,3	30,5
Tuk (%)	4,27	0,54	12,8	3,61	0,89	24,7	3,94	0,81	20,5
Bílkoviny (%)	3,51	0,36	10,2	3,25	0,34	10,5	3,38	0,37	11,0
Laktóza (%)	5,00	0,23	4,6	4,87	0,24	4,9	4,94	0,24	4,9

x = aritmetický průměr, s_x = směrodatná odchylka, v% = variační koeficient = (s_x/x) * 100;

Tab. 3 – Základní statistické charakteristiky zastoupení vybraných mastných kyselin (MK) a jejich skupin při stanovení plynovou chromatografií (GC) a infračervenou spektroskopií (MIR) přečtené na shodné jednotky s GC

	GC, g/100 g všech MK			MIR, g/100 g všech MK			r _{xy}	p	R ² %
	x	s _x	v%	x	s _x	v%			
C16:0	33,56	3,63	10,8	38,73	2,90	7,5	0,7543	0,001	56,9
C18:1	17,99	2,97	16,5	27,37	3,50	12,8	0,7607	0,001	57,9
PUFA	3,26	0,62	18,9	8,44	1,38	16,4	0,2891	0,05	8,4
SFA	69,54	3,62	5,5	70,85	3,16	4,5	0,8424	0,001	71,0
UFA	27,22	3,93	14,4	27,32	4,15	15,2	0,9492	0,001	90,1

x = aritmetický průměr; s_x = směrodatná odchylka; v% = variační koeficient = (s_x/x) * 100; r_{xy} = validační koeficient korelace; R² = koeficient determinace = (r_{xy})²; PUFA = polyneenasycené MK včetně konjugované kyseliny linolové; SFA = nasycené MK se sudým a lichým počtem uhlíků; UFA = nenasyčené MK

Úvod

Způsob, jak cíleně modifikovat profil mastných kyselin mléčného tuku pro podporu zdraví spotřebitelů, případně vhodnější technologické vlastnosti mléka (Barlowska et al., 2011), může být více. Mezi nejrychlejší způsoby patří především změna krmné dávky nebo výběr mléčné suroviny od určitých dojnic. Pravidelnému sledování zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku dnes brání poměrně náročná (časově i finančně) referenční metoda analýzy mastných kyselin pomocí plynové chromatografie (Kaylegian et al., 2009). Určitou naději do budoucna by se mohlo stát rutinní stanovení některých mastných kyselin nebo jejich specifických skupin pomocí infračervené spektroskopie s následným vyhodnocením signálu Fourierovými transformacemi (MIR-FT). Metoda je v současnosti využívána v analytice mlékařství pro kontrolu kvality syrového mléka nebo pro stanovení některých minoritních složek mléka (močovina,

kyselina citrónová, volné mastné kyseliny, ketony) – např. Hering et al., 2008. Cílem práce bylo validační porovnání zastoupení vybraných mastných kyselin a jejich skupin v individuálních vzorcích mléčného tuku dojnic stanovených referenční a rutinní metodou.

Materiál a metodika

Odběry individuálních vzorků mléka byly realizovány v lednu a únoru 2015 v chovech plemen české strakaté (n = 39) a holštýnské (n = 39). Získané vzorky byly rozděleny na dvě části, z nichž první byla použita pro stanovení základního chemického složení mléka a rutinní stanovení mastných kyselin pomocí pravidelně kalibrovaného zařízení Combifoss FT+ (MilkoScan FT+ 76150, Fossomatic FC 79910), 500 vzorků/hod. (Foss Analytical A/S, Denmark) metodou MIR-FT (dále jen **MIR**). Druhá část byla využita pro stanovení mastných kyselin metodou plynové chromatografie (dále jen **GC**) po předchozí lyofilizaci vzorků, extrakci

tuku petroletherem a převedení na metylestery mastných kyselin (alkalickou katalýzou) podle předepsaných parametrů (tab. 1).

V programu Microsoft Excel byly hodnoty o obsahích mastných kyselin získané rutinní metodou přepočítány na hodnoty odpovídající vyjádření referenční metody, tedy plynové chromatografie (g/100 g všech mastných kyselin) podle vzorce: (**An** * 100)/(**Bn** * 0,95), kde **An** je hodnota mastných kyselin vyjádřená v g/100 g mléka, **Bn** je hodnota obsahu tuku v g/100 g mléka a 0,95 je koeficient přepočtu obsahu tuku na mastné kyseliny.

Pro statistické výpočty (popisné statistiky, korelační a regresní analýza) byla zvolena nabídka programu Statistica 12.0 (StatSoft 2013).

Výsledky a diskuse

Základní statistické charakteristiky pro dojnost a základní složení mléka dojnic (tab. 2) vypovídají o velmi dobře vyváženém souboru. Nejvyšší variabilita daná hodnotou variačního koeficientu byla pochopitelně zjištěna u dojivosti (30,5 %) a tučnosti (20,5 %), tradičně nejnižší variabilita pak u obsahu laktózy (4,9 %). Variabilita v jednotlivých ukazatelích byla předpokladem pro zajištění

velkého rozpětí i v zastoupení mastných kyselin a jejich skupin. Vyšší hodnoty variačních koeficientů byly v souladu s literaturou (Pešek et al., 2006) zjištěny u nenasyčených mastných kyselin (C18:1, PUFA, UFA), nižší u nasycených mastných kyselin (C16:0, SFA), a to u obou metod stanovení (tab. 3).

Průměrná zastoupení vyše uvedených mastných kyselin a jejich skupin zjištěná oběma metodami (GC a MIR) se liší zejména v případě PUFA, kdy byl stanoven i nízký korelační koeficient (r_{xy} = 0,2891; p < 0,05). Mnohem spíše totiž odpovídá skutečnosti hodnota mastných kyselin stanovených GC (3,26 %), neboť při nevyužití pastvy bývá zastoupení PUFA nižší (Samková et al., 2011). Velmi shodné údaje byly naopak zjištěny u skupin SFA (r_{xy} = 0,8424; p < 0,001; obr. 1) a UFA (r_{xy} = 0,9492; p < 0,001). Obě tyto skupiny by bylo možné stanovovat pomocí MIR s vyšší mírou věrohodnosti. To znamená, že 71,0 a 90,1 % variability v hodnotách SFA a UFA podle nepřímé rutinní metody (MIR) je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční metody (GC). Uvedené lze označit za dobrou schopnost analytické výpovědi nepřímé metody, resp. její zcela akceptovatelnou věrohodnost výsledků k praktické



Chybí vám pohotová energie ve formě jednoduchých cukrů do TMR pro dojnice?

SUGAR 45

DOPLŇKOVÉ KRMIVO PRO DOJNICE

- Je vhodný doplněk krmných dávek notoricky chudých na cukry
- zlepšuje stravitelnost vlákniny
- doplňuje energii jiným způsobem a nezvyšuje nebezpečí bachorových acidóz
- je ideální také v případě rizika druhotné fermentace TMR
- zvlhčuje TMR a udržuje její homogenitu

Bližší informace u zástupců firmy TREWIT s.r.o.



www.trewit.cz

TREWIT s.r.o.
Za dvorem 305, Zlín 12 – Štípa
tel./fax: +420 577 915 448
e-mail: trewit@trewit.cz



interpretaci. Většina uvedených validačních korelací mezi výsledky sledovaných metod (tab. 3) byla v podobných hodnotách (s ohledem na těsnost vztahu a sledovanou mastnou kyselinu nebo skupinu mastných kyselin) v porovnání k dosud publikovaným výsledkům (Soyeurt et al., 2006).

Odlišné výsledky vykazovalo zastoupení obou obsahově bohatých mastných kyselin. Hodnoty zjištěné pomocí MIR pro C16:0 byly mírně, pro C18:1 pak výrazně nadhodnocené, což si lze u C18:1 vysvětlit množstvím *cis*, resp. *trans* izomerů. Zatímco hodnota C18:1 stanovená GC je pouze hodnotou kyseliny olejové (C18:1*cis9*), v případě MIR mohlo jít o izomerů více. V obou případech však byly validační korelační koeficienty statisticky vysoce významné ($r_{xy} = 0,7543$; resp. 0,7607; $p < 0,001$). V daných případech 56,9 a 57,9 % variací v hodnotách C16:0 a C18:1 podle MIR je vysvětlitelných variabilitou v hodnotách GC. To je stále možné označit metodicky za akceptovatelnou věrohodnost výsledků pro praktické použití. Navíc, průměrný posun výsledných hodnot, obecně při

nepřímých analýzách a jejich kalibracích, není závažným metodickým problémem (rozhodující je těsnost vztahů výsledků mezi metodami), neboť lze kompenzovat statisticky, tj. kalibrací MIR na výsledky GC podle lokálních podmínek, resp. kalibračním přestavením přístroje, nebo korekcí adjustovaným specifickým korekčním faktorem (podle konkrétních výsledků GC).

Závěr

Podle získaných výsledků validace analytické kalibrace se ukázalo, že metoda MIR-FT pro určení profilu mastných kyselin mléčného tuku u krav je dostatečně efektivní, při porovnání k výsledkům metody referenční chromatografické, pro případný screening a selekci mléčné suroviny ke garanci produkce specifických mléčných výrobků se zvýšeným obsahem zdraví prospěšných mastných kyselin.

Seznam literatury

- Barłowska J., Szwałkowska 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 (6): 291-302.
- Hering P., Hanuš O., Frellich J., Pytloun J., Macek A., Janů L., Kopecký J. (2008): Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech Journal of Animal Science*, 53 (2): 64-76.
- Kaylegian K. E., Dwyer D.A., Lynch J.M., Bauman D. E., Fleming J. R., Barbano D.M. (2009): Impact of fatty acid composition on the accuracy of mid-infrared fat analysis of farm milks. *Journal of Dairy Science*, 92 (6): 2502-2513.
- Pešek M., Samková E., Špička J. (2006): Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 51 (5): 181-188.
- Samková E., Pešek M., Hanuš O., Šlachta M., Špička J., Frellich J., Kopecký J., Jedelská R. (2011): Zastoupení významných mastných kyselin v mléčném tuku dojnic v období pastvy. *Náš chov*, 71 (11): 68-70.
- Soyeurt H., Dardenne P., Dehareng F., Lognay G., Veselko D., Marlier M., Bertozzi C., Mayeres P., Gengler N. (2006): Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 89 (9): 3690-3695.

Další literatura je k dispozici u autorů.

Článek byl odborně recenzován.

Tato práce byla uskutečněna s podporou projektu MZe NAZV KUS QJ1510336 a výzkumného záměru MSM16007665806. Autoři rovněž děkují majitelům farem za spolupráci při realizaci této studie.

*Doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.,¹⁾
doc. Ing. Jiří Špička, CSc.,¹⁾
Ing. Robert Kala,¹⁾
Ing. Jana Koubová,¹⁾
Ing. Pavel Smetana, Ph.D.,¹⁾
MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.,²⁾
Ing. Zuzana Křížová³⁾
prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.,²⁾
Jaroslav Kopecký²⁾
Ing. Pavel Kopunec²⁾
¹⁾ Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
²⁾ Výzkumný ústav
mlékárenský, s. r. o., Praha
³⁾ Českomoravská společnost
chovatelů, a. s.
Kontakt: samkova@zf.jcu.cz*

Příloha 5:

*Kváč M., Tomanová V., Samková E., **Koubová J.**, Kotková M., Hlásková L., Sak B. (2016): Encephalitozoon cuniculi in raw cow's milk remains infectious after pasteurization. Foodborne Pathogens and Disease, 13 (2), 77-79.*

Encephalitozoon cuniculi in Raw Cow's Milk Remains Infectious After Pasteurization

Martin Kváč^{1,2}, Vendula Tomanová², Eva Samková², Jana Koubová²,
Michaela Kotková^{1,2}, Lenka Hlásková¹, John McEvoy³, and Bohumil Sak¹

Abstract

This study describes the prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in raw cow's milk and evaluates the effect of different milk pasteurization treatments on *E. cuniculi* infectivity for severe combined immunodeficient (SCID) mice. Using a nested polymerase chain reaction approach, 1 of 50 milking cows was found to repeatedly shed *E. cuniculi* in its feces and milk. Under experimental conditions, *E. cuniculi* spores in milk remained infective for SCID mice following pasteurization treatments at 72°C for 15 s or 85°C for 5 s. Based on these findings, pasteurized cow's milk should be considered a potential source of *E. cuniculi* infection in humans.

Introduction

PARASITIC PROTOZOANS CAN CAUSE food- and waterborne disease in humans. Microsporidia are ubiquitous parasitic protozoans that cause human microsporidiosis, a disease that can range in severity from subclinical to lethal. Microsporidia are considered neglected parasites, and their role in foodborne disease is poorly understood (Sak *et al.*, 2011). In studies to date on microsporidia in food, two genera—*Enterocytozoon* and *Encephalitozoon*—have been reported (Robertson *et al.*, 2014). *Encephalitozoon cuniculi*, which was identified as the likely cause of a 2012 foodborne outbreak in Sweden in individuals consuming sandwiches and salad containing cucumber slices (Decraene *et al.*, 2012), is among the most frequently detected microsporidia species in immunocompetent and immunodeficient humans. *E. cuniculi* infects most cell types, including phagocytes, and produces systemic infections that may be due in part to the trafficking of infected macrophages (Didier and Khan, 2014). Various microbial pathogens have been identified in raw milk and milk-derived products (Claeys *et al.*, 2013; Domenech *et al.*, 2013; Kalmus *et al.*, 2015), but microsporidia in milk have not been reported. It is conceivable that milk could become contaminated in the mammary gland, particularly if there is macrophage infiltration of the gland during an infection or by contamination during milking (Claeys *et al.*, 2013). This study aimed to determine the occurrence of *E. cuniculi* in raw cow's milk and its infectivity following pasteurization for

microsporidial animal model hosts—severe combined immunodeficient (SCID) mice.

Materials and Methods

Fifty lactating multiparous Holstein cows (Czech Republic) were included in the study. Five samples each of feces (3 g), urine (50 mL), and milk (50 mL; 12.5 mL from each quarter) were obtained from each cow during five consecutive milking periods. Samples were placed in sterile tubes and stored at 4°C until screening. A somatic cell count (SCC) was determined for each milk sample using a Fossomatic 90 instrument (Foss Electric, Hillerod, Denmark). Prior to DNA extraction, milk and urine were centrifuged for 20 min at 3000×g and 4°C. Two hundred milligrams of feces, 200 mg of milk sediment, or the entire sample of urine sediment were homogenized by bead disruption using 0.5-mm glass beads (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) in a FastPrep[®]-24 Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) at a speed of 5 m/s for 1 min. DNA was extracted using the QIAamp[®] DNA Stool Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and a nested polymerase chain reaction (PCR) protocol was used to amplify the ribosomal internal transcribed spacer (Katzwinkel-Wladarsch *et al.*, 1996). PCR amplicons were sequenced directly in both directions with an ABI 3130 sequence analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The identities of the obtained sequences were determined by a BLAST search (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). The real-time quantitative PCR was performed according to

¹Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic.

²Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic.

³Department of Veterinary and Microbiological Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota.

the protocol of Wolk *et al.* (2002). Each set of PCR assays contained external standard presented as DNA isolated from a specific amount of *E. cuniculi* spores. A standard curve was established between the Ct values and the spore numbers ranging from 10^1 to 10^7 . For each specimen, this standard curve was used to estimate the spore number by interpolation of the Ct value obtained by real-time PCR. Negative control (distilled water) was included in each set of experiments.

Spores of *E. cuniculi* strain II, cultivated at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences and purified from cells by centrifugation over 50% Percoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), were used for pasteurization experiments. Six groups of 8-week-old Severe Combined Immunodeficient (SCID) mice (three animals per group) (Charles River, Sulzfeld, Germany) were bred in plastic cages with sterilized wood-chip bedding situated in IVC Air Handling Solutions (Techniplast, Buguggiate, Italy) with high-efficiency particulate air filters. All mice were supplied with a sterilized diet (TOP-VELAZ, Praha, Czech Republic) and sterilized water *ad libitum*. Mice were orally inoculated by intragastric gavage with 1×10^6 spores of *E. cuniculi* in 200 μ L of milk from the different pasteurization treatments (Table 1). Pasteurization treatments were simulated in a PCR cyclor in a 100- μ L volume. Tested pasteurization of raw milk satisfied the requirements laid down in Chapter XI of Annex II to Regulation (EC) No 852/2004. Milk pasteurization was verified by testing for activity of the enzymes alkaline phosphatase and peroxidase in accordance with Commission Regulation (EC) No 1664/2006 and Commission Decision No 91/180/EEC.

Animal groups inoculated with microsporidia-free milk or spores in milk without pasteurization treatment were used as negative and positive controls, respectively. Each group of animals was housed separately in individually ventilated cages (Techniplast) and fed sterile food and water *ad libitum*. Each mouse was sacrificed 21 days postinoculation and kidney, liver, spleen, and brain tissues were examined for the presence of *E. cuniculi* DNA. DNA extraction and PCR analysis were performed as described earlier with the exception that DNA was extracted using a QIAamp[®] DNA Tissue Mini Kit. If at least one tissue specimen was *E. cuniculi* positive, the spores were considered infective.

All housing, feeding, and experimental procedures were conducted under protocols approved by the Institute of Para-

sitology, Biology Centre and Central Commission for Animal Welfare, Czech Republic (#152/2012).

Results and Discussion

E. cuniculi was detected in only 1 of 50 cows examined in this study, which is consistent with the findings of Halanova *et al.* (1999) and Abu-Akkada *et al.* (2015), and suggests that cattle are less frequently infected by *E. cuniculi* than are other domestic animals and humans, where prevalence can reach 80% (Snowden, 2014). Detection of *E. cuniculi*-specific DNA in multiple samples of feces (three of five positive samples) and milk (two of five positive samples) collected on different days from one animal demonstrated an active infection. Previous studies have shown that *E. cuniculi* infections can persist for months (Sak *et al.*, 2011); therefore, a single infected cow could produce a considerable amount of contaminated milk (i.e., our cow produced 1.2×10^5 spores/L of milk). Taking into consideration the dilution in tank milk on the particular farm, which had 100 cows, there was a burden of 1.2×10^3 spores/L of tank milk.

Given that *E. cuniculi* frequently infects phagocytes serving as vehicles of infection within a host body (Didier and Khan, 2014), we hypothesized that milk from a cow with evidence of mastitis, thus those with a SCC >100,000, would be more frequently contaminated than milk from a healthy mammary gland, because >90% of SCC are composed of leukocytes (Bradley and Green, 2005). Although SCCs in particular milk samples in our study varied between 13,000 and 364,000 with the mean of $141,000 \pm 95,000$, the finding of *E. cuniculi* in milk with a SCC <80,000/mL did not support that hypothesis.

Raw milk represents a potential source of various pathogens including bacteria, protozoa, and viruses originating from blood, mastitis, or contamination of milk from feces, skin, or environment (Claeys *et al.*, 2013). Therefore, raw milk is pasteurized by heating to kill these pathogens (Langer *et al.*, 2012). Contrary to results of Domenech *et al.* (2013), who did not detect any pathogenic bacteria in cheese and ice cream despite positive findings of a microorganism indicator of unhygienic processing practices implying correct pasteurization and a possible postrecontamination during processing, we detected microsporidial DNA in raw milk. Moreover, the experiments performed in this study showed that after pasteurization at 72°C for 15 s or 85.0°C for 5 s, spores of *E.*

TABLE 1. EFFECT OF DIFFERENT PASTEURIZATION TREATMENTS ON INFECTIVITY OF *ENCEPHALITOZOON CUNICULI* SPORES FOR SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENT (SCID) MICE INCLUDING VERIFICATION OF PASTEURIZATION PROCESS

Pasteurization treatment (°C/time)	Verification of pasteurization process		Presence of <i>E. cuniculi</i> -specific DNA in SCID mice tissue			
	Alkaline phosphatase	Peroxidase	Kidney	Liver	Spleen	Brain
Low temperature, long time (63°C/30 min)	Active	Active	—	—	—	—
High temperature, short time (72°C/15 s)	Inactive	Active	Positive	Positive	Positive	Positive
Higher heat, shorter time (85°C/5 s)	Inactive	Inactive	Positive	Positive	Positive	Positive
Higher heat, shorter time (95°C/5 s)	Inactive	Inactive	—	—	—	—
Negative control ^a	Active	Active	—	—	—	—
Positive control ^b	Active	Active	Positive	Positive	Positive	Positive

^aAnimal inoculated with *E. cuniculi*-free raw milk.

^bAnimal inoculated with *E. cuniculi* in raw milk without any treatment.

cuniculi remained infective for SCID mice (Table 1), leading to acute infection spread within mice. High-temperature short-time pasteurization at 72°C and 85°C is used for the production of drinking milk, yogurts, or cheese. Although the prevalence of *E. cuniculi* in cow's milk is low, drinking milk pasteurized at 72°C and 85°C could be sources of *E. cuniculi* infection in humans.

Although European regulations on foodstuffs demand good manufacturing practices and standard sanitation operating procedures within Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) from all food manufacturers (Domenech *et al.*, 2007, 2009), microsporidia are not listed as controlled pathogens. Our results suggest that examination for the presence of microsporidia should be implemented into HACCP in the milk industry, as implementation of HACCP was shown to be an adequate cost–benefit relationship in yogurt production despite additional costs (Cusato *et al.*, 2014).

Future studies should address the influence of post-pasteurization processes such as fermentation and maturation of yogurt and cheese on the survivability of *E. cuniculi*.

Acknowledgment

This study was supported by a grant of the Grant Agency of the Czech Republic (P302-14-20684S) and the Grant Agency of University of South Bohemia (011/2013/Z).

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Abu-Akkada SS, Ashmawy KI, Dweir AW. First detection of an ignored parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in different animal hosts in Egypt. *Parasitol Res* 2015; 114:843–850.
- Bradley A, Green M. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. In *Practice* 2005;27:310–315.
- Claeys WL, Cardoen S, Daube G, *et al.* Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* 2013;31:251–262.
- Cusato S, Gameiro AH, Sant'Ana AS, Corassin CH, Cruz AG, de Oliveira CAF. Assessing the costs involved in the implementation of GMP and HACCP in a small dairy factory. *Qual Assur Saf Crop* 2014;6:135–139.
- Decraene V, Lebbad M, Botero-Kleiven S, Gustavsson AM, Lofdahl M. First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiol Infect* 2012; 140:519–527.
- Didier ES, Khan IA. The immunology of microsporidiosis in mammals. In: *Microsporidia Pathogens of Opportunity*. Weiss LM, Becnel JJ (eds.). Ames, IA: Wiley Blackwell, 2014, pp. 307–325.
- Domenech E, Amoros JA, Escriche I. Effectiveness of prerequisites and the HACCP plan in the control of microbial contamination in ice cream and cheese companies. *Foodborne Pathog Dis* 2013;10:222–228.
- Domenech E, Escriche I, Martorell S. Quantification of risks to consumers' health and to company's incomes due to failures in food safety. *Food Control* 2007;18:1419–1427.
- Domenech E, Escriche I, Martorell S. An approach for assessing CCP effectiveness in food production applications by predictive QRA modelling. *Reliab Eng Syst Safe* 2009;94:1451–1460.
- Halanova M, Letkova V, Macak V, Stefkovic M, Halan M. The first finding of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cows in Slovakia. *Vet Parasitol* 1999;82:167–171.
- Kalmus P, Kramarenko T, Roasto M, Meremae K, Viltrop A. Quality of raw milk intended for direct consumption in Estonia. *Food Control* 2015;51:135–139.
- Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Helse W, Loscher T, Rinder H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop Med Int Health* 1996;1:373–378.
- Langer AJ, Ayers T, Grass J, Lynch M, Angulo FJ, Mahon BE. Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks, and state laws—United States, 1993–2006. *Emerg Infect Dis* 2012;18: 385–391.
- Robertson LJ, Björkman C, Axén C, Fayer R. Cryptosporidiosis in farmed animals. In: *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Cacciò SM, Widmer G (eds.). Vienna, Austria: Springer, 2014, pp. 149–236.
- Sak B, Kváč M, Kučerová Z, Květoňová D, Saková K. Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals—A longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1162.
- Snowden KF. Microsporidia in higher vertebrates. In: *Microsporidia Pathogens of Opportunity*. Weiss LM, Becnel JJ (eds.). Ames, IA: Wiley Blackwell, 2014, pp. 469–491.
- Wolk DM, Schneider SK, Wengenack NL, Sloan LM, Rosenblatt JE. Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:3922–3928.

Address correspondence to:

Bohumil Sak, PhD

Institute of Parasitology

Biology Centre of the Czech Academy of Sciences

Branišovská 31

České Budějovice, Czech Republic

E-mail: casio@paru.cas.cz

Příloha 6:

1. *Kala R., Krůčková L., Samková E., Hasoňová L., **Koubová J.**, Křížová Z., Švarcová A., Frejlich T. (2015): Sensorické posouzení konzumních mlék. Ingrovy dny, XLI. Konference o jakosti potravin a potravinových surovin, 4. března 2015, Mendelova univerzita v Brně - Agronomická fakulta, 183-188.*

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ

Agronomická fakulta

Ústav technologie potravin



FULLTEXTOVÝ SBORNÍK

XLI. KONFERENCE O JAKOSTI POTRAVIN

A POTRAVINOVÝCH SUROVIN

FULL-TEXT PROCEEDINGS OF THE 41st FOOD QUALITY

AND SAFETY CONFERENCE

4. března 2015

4^h March 2015

MENDEL UNIVERSITY IN BRNO, CZECH REPUBLIC

Miroslav Jůzl – Libor Kalhotka – Yvona Dostálová – Soňa Bogdanovičová

SENZORICKÉ POSOUZENÍ KONZUMNÍCH MLÉK

SENSORY ASSESSMENT OF DRINKING MILK

Robert Kala¹ – Lucie Krůčková¹ – Eva Samková¹ – Lucie Hasoňová¹ – Jana Koubová¹ –
Zuzana Křížová² – Anna Švarcová² – Tomáš Frejtlach²

¹Katedra kvality zemědělských produktů, ZF, Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích, Studentská 13, 370 05 České Budějovice

²Katedra zootechnických věd, ZF, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Studentská 13, 370 05 České Budějovice

ABSTRACT

Sensory evaluation was find out using ranking according to ISO 8587th. Four samples of drinking milk were evaluated – long life milk treated by UHT with 120 days durability, fresh milk treated by pasteurization with 10 days durability, milk with longer fresh treated by pasteurization with 14 days durability and ESL milk treated by pasteurization with 18 days durability. UHT milk sample (sample 1) was evaluated as the best sample by 50% of all 18 evaluators. Sample 2 (fresh milk, treated by pasteurization) was chosen by 78% of all evaluators as the worst (rank 3 or 4). Statistical significant differences were found out between these two samples ($p < 0.01$). The results of assessment among individual samples show that the greatest differences were between sample 1 and 2, and the smallest between sample 3 and 4 (1.9 resp. 2.8). These results confirm our findings that sample 1 (UHT milk sample) was evaluated as the best and sample 2 (fresh milk sample) as the worst by most of evaluators.

Keywords: drinking milk, heat treatment, pasteurization, organoleptic characteristic

ÚVOD

V současné době je mléko považováno za jednu z nejdůležitějších potravin živočišného původu. Jsou v něm obsaženy nutričně významné látky, které jsou snadno stravitelné a jsou ve vyváženém poměru. Dle *Sørhauga a Stepaniaka (1997)* je vzhledem k obsahu enzymů, či kontaminujících mikroorganismů syrové mléko považováno za surovinu rychle podléhající zkáze. U mléka určeného pro lidskou výživu je tedy nutné jeho tepelné ošetření. Následkem tohoto ošetření a dalšího zpracování mléka však dochází k ovlivnění jeho organoleptických vlastností.

Organoleptické vlastnosti mléka jsou ovlivňovány faktory, jako jsou kvalita syrového mléka, způsob a podmínky tepelného ošetření, koncentrace kyslíku během zpracování a skladování, teplota skladování a obal (*Jankovská, 2008*).

K základním organoleptickým vlastnostem mléka patří barva, konzistence, struktura, chuť a vůně. Chuť a vůně jsou mimo jiné ovlivňovány obsahem sensoricky aktivních vonných a chuťových látek. Primární sensoricky aktivní látky jsou metabolickými produkty vnitrobuněčných procesů organismu, jejich obsah a zastoupení jsou dané geneticky a částečně mohou být ovlivněny zevními faktory (*Hálková a kol., 2001; Velíšek, 2002*). Skladováním a zpracováním mléka dále vznikají sekundární sensoricky aktivní látky (produkty enzymových a neenzymových reakcí hlavních složek mléka). Výsledná chuť a vůně mlékařenské suroviny je rovněž ovlivněna dalšími chemickými sloučeninami – zejména volnými mastnými kyselinami, aminy, sulfidy, laktony a ketony (*Moio a kol., 1993*).

Mezi operace využívané při zpracování mléka patří odstředování, standardizace tučnosti, homogenizace, deaerace, baktofugace a pasterace (*Kadlec a kol., 2009*). Pasterace mléka je prováděna několika způsoby. Šetrná pasterace probíhá při 72 °C po dobu 15 s a je při ní dosahováno pasteračního efektu 99,9 %. Vysoká pasterace probíhá při 85 °C po dobu 5 s a je při ní dosahováno vyššího pasteračního efektu (nad 99,99 %). Jedná se o nejběžněji využívaný způsob pasterace. Při tomto procesu dochází k denaturaci zhruba 50 % sérových bílkovin, je změněna rozpustnost vápníku na koloidní formu, jsou zničeny bakteriostatické vlastnosti mléka a projevují se změny v chuti mléka (vařivá příchut'). Dlouhodobá pasterace probíhá při 63 °C po dobu 30 min.

Dalšími způsoby tepelného ošetření mohou být ultra vysoký záhřev (UHT, ultra high temperature) a tzv. mléko s prodlouženou trvanlivostí (ESL, extended shelf life), (*Krůčková, 2012*). Použitím těchto technologií je vyráběno trvanlivé mléko. *Kadlec a kol. (2009)* uvádí dva způsoby výroby trvanlivého mléka – sterilaci v obalu (např. 115-120 °C po dobu 20-30 min) a UHT (kontinuální záhřev na 135-150 °C po dobu několika sekund s následným aseptickým balením).

Cílem práce bylo sensorické hodnocení různě tepelně ošetřených konzumních mlék prostřednictvím pořadového testu.

MATERIÁL A METODY

Senzorická analýza byla provedena podle podmínek a zásad sensorického hodnocení (ČSN ISO 8589) ve skupině vybraných hodnotitelů (n=18), kde pro vyhodnocení čtyř vzorků

konzumních mlék byla použita metoda pořadového testu (seřazení vzorků podle chuti od nejlepšího po nejhorší a vzájemné posouzení rozdílů mezi vzorky – *velké, střední, malé, nepatrné, téměř žádné*). Pro sensorické hodnocení byly v tržní síti zakoupeny čtyři vzorky odlišně tepelně ošetřených konzumních mlék (tučnost 1,5 %). Jejich charakteristika z hlediska tepelného ošetření je uvedena v tabulce 1.

Tabulka 4. Charakteristika vzorků konzumních mlék

Vzorek	Označení mlék	Technologie výroby	Trvanlivost dle výrobce (dny)
1	trvanlivé	UHT	120
2	čerstvé	pasterace	10
3	déle čerstvé	pasterace	14
4	ESL	pasterace	18

UHT = ultra vysoký záhřev, ESL = s prodlouženou trvanlivostí

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno s využitím programů MS Excel 2010 a Statistica 9.1 (StatSoft ČR). Sensorické posouzení pořadovým testem bylo provedeno dle normy ČSN ISO 8587. Analýza dat byla provedena prostřednictvím neparametrické statistiky. Dále byla použita Friedmanova ANOVA, pro posouzení rozdílů v pořadích pak Wilcoxonův párový test na hladině významnosti $p < 0,01$.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Pořadový test je používán většinou při porovnání více vzorků. Dle *Neumanna (1990)* je prováděn nejen v případě, kdy je porovnáván sensorický rozdíl vzorků, ale také když mají být vzorky seřazeny dle chuti, intenzity některých organoleptických vlastností či oblíbenosti. Norma ČSN ISO 8587 popisuje metodu sensorického hodnocení s cílem uspořádání série zkoušených vzorků do pořadí. Jedná se tedy o metodu umožňující hodnocení rozdílů mezi několika vzorky na základě intenzit jednoho či více deskriptorů, nebo celkového dojmu.

Dle způsobu tepelného ošetření lze jednotlivé vzorky vymezit porovnáním doby trvanlivosti – mléko pasterované (dny), mléko ESL (týdny) a mléko UHT (měsíce). Nevýhodou UHT technologie je změna organoleptických vlastností mléka (*Nursten, 1997*). Na druhou stranu pasterované mléko s trvanlivostí 1-2 týdny musí být skladováno v chladu, což je nevýhodné pro přepravu. ESL mléko je považováno za výhodné jak z hlediska trvanlivosti, tak z hlediska svých nutričních a organoleptických vlastností.

Výsledky potvrzují, že 9 z 18 hodnotitelů vybralo jako nejlepší vzorek 1 – mléko trvanlivé, ošetřené UHT technologií. Naproti tomu vzorek 2 (mléko čerstvé, ošetřené pasterací) označilo 10 z 18 hodnotitelů jako nejhorší. Tato skutečnost je zřejmě způsobena tím, že pro většinu hodnotitelů je dostupné spíše trvanlivé mléko, než mléko čerstvé, jehož chuť pro ně může být poněkud neobvyklá. Z tabulky 2 vyplývá, že výsledky jsou také potvrzeny průměrnými hodnotami mezi vzorkem 1 a 2 – čím nižší průměrnou hodnotu vzorek měl, tím více hodnotitelů jej upřednostnilo (1,89, resp. 3,44). *Jankovská (2008)* ve svém článku uvádí, že prodej čerstvého mléka klesá na úkor UHT mléka.

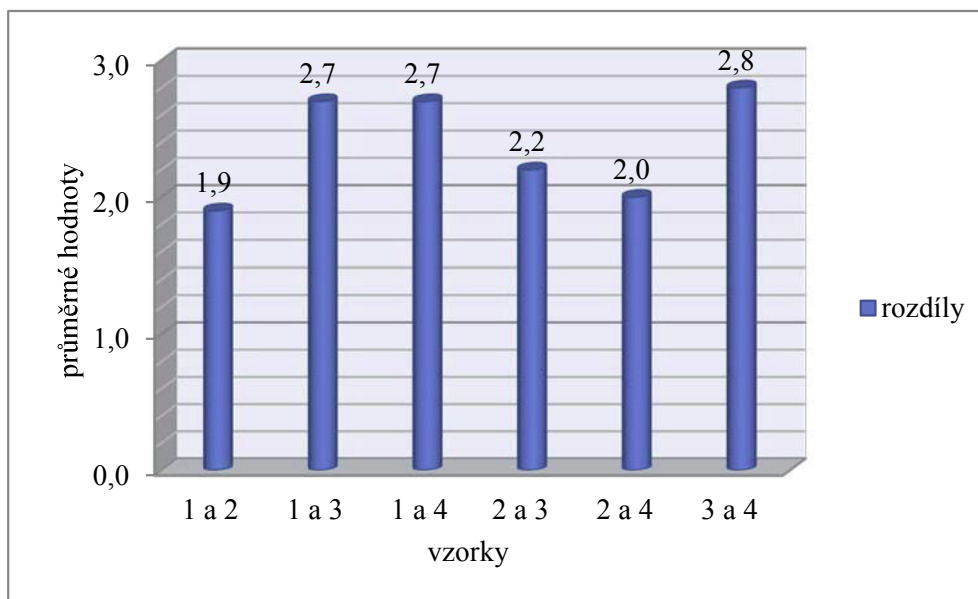
Tabulka 5. Výsledky senzoričského posuzování pořadovým testem ve skupině vybraných hodnotitelů (n=18)

Vzorek	Četnosti								\bar{x}	p
	pořadí 1		pořadí 2		pořadí 3		pořadí 4			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
1	9	50	1	6	3	17	5	28	1,89	0,0012
2	4	22	0	0	10	56	4	22	3,44	
3	3	17	7	39	5	28	3	17	2,11	
4	2	11	10	56	0	0	6	33	2,56	

p<0,01

Dále byly posuzovány vzájemné rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Na stupnici 1 – 5 (1 – velké, 5 – téměř žádné) byly zjištěny největší rozdíly mezi vzorky 1 a 2, nejmenší pak mezi vzorky 3 a 4 (1,9, resp. 2,8). Tento fakt rovněž potvrdil, že vzorek 1 je hodnotiteli považován za nejlepší, vzorek 2 pak za nejhorší (graf).

Graf. Průměrné hodnoty rozdílů mezi jednotlivými vzorky



ZÁVĚR

Z uvedených výsledků vyplývá, že mezi hodnotiteli byl nejlépe hodnocen vzorek 1 – mléko trvanlivé, ošetřené UHT. Naopak vzorek 2 (mléko čerstvé, ošetřené pasterací) byl hodnocen jako nejhorší. Výsledky byly také potvrzeny vzájemným posouzením rozdílů mezi jednotlivými vzorky.

PODĚKOVÁNÍ

Príspevek byl součástí řešení projektu GAJU 011/2013/Z a OP VK CZ.1.07/2.3.00/09.0081: „Komplexní vzdělávání lidských zdrojů v mlékařství“.

SOUHRN

Senzorické hodnocení bylo provedeno pořadovým testem dle normy ČSN ISO 8587. Hodnoceny byly čtyři vzorky konzumních mlék – trvanlivé mléko ošetřené UHT s trvanlivostí 120 dnů, čerstvé mléko pasterované s trvanlivostí 10 dnů, déle čerstvé mléko pasterované s trvanlivostí 14 dnů a ESL mléko s trvanlivostí 18 dnů. Vzorek 1 byl 50 % z 18 hodnotitelů vyhodnocen jako nejlepší (mléko trvanlivé, ošetřené UHT). Vzorek 2 (mléko čerstvé, ošetřené pasterací) bylo vybráno 78 % hodnotitelů jako nejhorší (pořadí 3 nebo 4). V souhrnu byly rozdíly mezi těmito dvěma vzorky statisticky významné ($p < 0,01$). Z výsledků posouzení mezi jednotlivými vzorky vyplývá, že největší rozdíly byly zjištěny mezi vzorky 1 a 2, nejmenší pak mezi vzorky 3 a 4 (1,9, resp. 2,8). Tyto výsledky potvrzují naše zjištění,

že vzorek 1 (UHT vzorek mléka) byl hodnocen většinou hodnotitelů jako nejlepší a vzorek 2 (čerstvý vzorek mléka) jako nejhorší.

Klíčová slova: konzumní mléko, tepelné ošetření, pasterizace, organoleptické vlastnosti

LITERATURA

ČSN ISO 8587 (56 0033), Sensorická analýza – Metodologie – Pořadová zkouška.

ČSN ISO 8589 (56 0036), Sensorická analýza – Obecné pokyny pro uspořádání sensorického pracoviště.

Hálková, J., Rumíšková, M., Riegrová, J. (2001): *Analýza potravin*, 2. vyd., Straka, Újezd u Brna, 94 s. ISBN 80-86494-02-0

Jankovská, R. (2008): Inovační aktivita – významný nástroj k udržení se na silném konkurenčním trhu, *Sborník přednášek odborné konference, III. ročník*, 27-29.

Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M. a kol. (2009): *Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 536 s.

Krůčková, L. (2012): *Senzorické hodnocení konzumních mlék v závislosti na technologii výroby*. [Diplomová práce], Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů, České Budějovice, 61 s.

Moio, L., Dekimpe, J., Etievant, P., Addeo, F. (1993): Neutral volatile compounds in the raw milks from different species, *Journal of Dairy Research* 60 (2), 199-213.

Neumann, R., Molnár, P., Arnold, S. (1990): *Senzorické skúmanie potravín*, Alfa, Bratislava, 352 s.

Nursten, HE. (1997): The flavour of milk and dairy products: I. Milk of different kinds, milk powder, butter and cream, *International Journal of Dairy Technology* 50 (2), 48-56.

Sørhaug, T., Stepaniak, L. (1997): Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects, *Trends in Food Science & Technology* 8 (2), 35-41.

Velíšek, J. (2002): *Chemie potravin 2*, 2. vyd., Osis, Tábor, 239 s. ISBN 80-902391-4-5

Kontaktní adresa: Ing. Robert Kala, Katedra kvality zemědělských produktů, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Česká republika, e-mail: kalarobert@seznam.cz

V současné době jsou v redakčním řízení vědeckých časopisů s IF následující články:

1) Variability in nutritionally desirable fatty acids including CLA of cow's milk fat explained by animal and feed factors.

2) Joint effects of breed, parity, month of lactation, and cow individuality on the milk fatty acids composition.