


Prohlášení

Diplomová práce s názvem „**Polymorfismus kandidátního lokusu a jeho vliv na technologickou jakost mléka**“ (Polymorphism of the candidate locus and its influence on the technological quality of the milk) nemůže být kompletně vložena do systému STAG vzhledem ke skutečnosti, že zveřejnění dat obsažených ve výše zmíněné práci v roce 2018 by bránilo publikování těchto dat ve vědeckém časopisu.

Celá diplomová práce bude v tištěné podobě k dispozici v Akademické knihovně JU.

Vedoucí diplomové práce

prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.



.....

Autor diplomové práce

Bc. Monika Švarcová



.....

V Českých Budějovicích, dne 4. 4. 2018

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Studijní program: Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Diplomová práce

**Polymorfismus kandidátního lokusu a jeho vliv na
technologickou jakost mléka**

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

Konzultant diplomové práce: Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.

Autor diplomové práce: Bc. Monika Švarcová

České Budějovice, 2018

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika ŠVARCOVÁ**

Osobní číslo: **Z15399**

Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**

Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**

Název tématu: **Polymorfismus kandidátního lokusu a jeho vliv na technologickou jakost mléka**

Zadávací katedra: **Katedra zootechnických věd**

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

Ekonomická efektivnost zemědělského podniku s chovem dojených krav závisí ve značné míře na kvalitě produkovaného mléka. Vedle obsahu mléčných složek a mikrobiální kvality je v poslední době věnována velká pozornost také technologické jakosti mléka. V této souvislosti je v genetickém výzkumu analyzován vztah polymorfních kandidátních lokusů a kvality mléka. Cílem těchto postupů je zjistit, zda a do jaké míry jednotlivé polymorfní varianty u dojnic ovlivňují kvalitu mléka.

Cílem diplomové práce je provést genotypizaci kandidátního lokusu s potenciálním vztahem k užitkovým vlastnostem resp. zdraví zvířat.

Zavedete metodiku pro laboratorní analýzu kandidátního lokusu. Provedete genotypizaci panelu krav. Locus bude zvolen v závislosti na aktuální potřebě školitelského pracoviště tak, aby výsledky bylo možné použít pro zpracování komplexní asociační analýzy. Provedete statistickou analýzu vztahu genotypů resp. alel k vybraným ukazatelům kvality mléka. Budou použity vhodné statistické metody a programové balíky. Provedete interpretaci zjištěných výsledků.

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

Seznam odborné literatury:

Vlášková H., Trešlová H. (2008): Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Sborník textů. Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha.

Szewczuk M. (2015): Polymorphism of the Insulin-like growth factor 1 receptor gene (IGF1R/e10/MspI and IGF1R/e16/RsaI) in four dairy breeds and its association with milk traits. *Livestock Sci.*, 181, 43-50, DOI: 10.1016/j.livsci.2015.09.026.

Cecchinato A., Chessa S., Ribeca C., Cipolat-Gotet C., Bobbo T., Casellas J., Bittante G. (2015): Genetic variation and effects of candidate-gene polymorphisms on coagulation properties, curd firmness modeling and acidity in milk from Brown Swiss cows. *Animal*, 9, 1104-1112, DOI: 10.1017/S1751731115000440.

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

Katedra zootechnických věd

Konzultant diplomové práce: Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.

Katedra zootechnických věd


Datum zadání diplomové práce: 29. března 2016

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2017

JIHOČESKÁ UNIVERZITA 
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1888, 370 05 České Budějovice


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

L.S.


doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 29. března 2016

Prohlášení:

Tímto prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury a cenných rad vedoucího práce.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 15. 4. 2018

Podpis:

Bc. Monika Švarcová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala panu prof. Ing. Jidřichu Čítkovi, CSc. za odborné rady a pomoc při zpracování mé diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat paní Ing. Lence Hanusové Ph.D za odborné vedení při laboratorních analýzách. Poděkování v neposlední řadě patří i mé rodině za podporu a trpělivost po celou dobu inženýrského studia.

Práce byla finančně podpořena projektem QJ1510339 a GAJU-002/2016/Z Genetika, zdraví zvířat a kvalita produktů jako základ konkurenceschopnosti.

Abstrakt:

Tato diplomová práce vznikla při studiu vlivu polymorfních variant lokusu mléčného proteinu betakaseinu (BCN) na znaky produkce a technologickou jakost mléka. Genotypy β -kaseinu (gen *CSN2*) byly stanoveny metodou PCR-RFLP. Stanovení genotypů *AA*, *AB* a *BB* bylo uskutečněno u 731 dojnic. Výsledky genotypových frekvencí prokázaly, že genotyp *BB* byl ve zkoumané populaci zastoupen zhruba pětkrát častěji než heterozygoti *AB* a třicetkrát častěji než homozygoti *AA*. U 418 vzorků byl analyzován vliv genotypů BCN na produkci a složení mléka. V této části nebyl zjištěn statisticky významný vliv genotypů či alel. Následná analýza vlivu genotypů a alel na syřitelnost a kysací schopnost mléka proběhla u 119 vzorků. Výsledky nepotvrdily statisticky významný efekt na koagulaci mléka. V analýze jogurtového testu se projevil vliv genotypů. To by mohlo znamenat, že genotyp *AA* je spojen s vyšší kysací schopností a genotyp *AB* s nejnižší. Ovšem výsledky mohly být ovlivněny nižší četností souboru a nerovnoměrnou frekvencí genotypů ve zkoumané populaci.

Klíčová slova: mléko, mléčné proteiny, genetický polymorfismus, betakasein, *CSN2*

Abstract:

This thesis was developed to study the influence of polymorphic variants of the milk protein locus betacasein (BCN) on the production and technological quality of the milk. The genotypes of β -casein (*CSN2* gene) were determined by the PCR-RFLP analysis. The determination of genotypes *AA*, *AB* and *BB* was made in 731 dairy cows. The results of genotype frequencies showed that genotype *BB* represented roughly five times more frequently than the heterozygotes *AB* and thirty times more frequently than *AA* homozygotes in the population under study. The effect of the BCN genotypes on the production and composition of milk was analyzed in 418 samples. No statistically significant effect of genotypes or alleles was found in this section. Subsequent analysis of the influence of genotypes and allele on the coagulation and the determination of titratable ability of the milk was performed on 119 samples. The results did not confirm a statistically significant effect on milk coagulation. The yogurt test showed genotypic effects. This could mean that genotype *AA* is associated with higher milk acidity and *AB* genotype with lower. However, the results could be affected by lower frequency of the population and an uneven frequency of genotypes in the population surveyed.

Keywords: milk, milk proteins, genetic polymorphism, betacasein, *CSN2*

Obsah

1. Úvod	10
2. Cíl práce	11
3. Literární přehled	12
3.1 Mléko	12
3.1.1 Spotřeba mléka a mléčných výrobků	13
3.1.2 Složení mléka	15
3.2 Mléčné proteiny	17
3.2.1 Kaseinové proteiny	18
3.2.1.1 Betakasein	20
3.2.1.2 Betakasein v potravinářství	23
3.2.1.3 Betakasein ve spojitosti s lidským zdravím	24
3.2.2 Syrovátkové bílkoviny	26
4. Technologické vlastnosti mléka	27
4.1 Syřitelnost	27
5. Eukaryotní genom a gen	29
5.1 Bovinní genom	31
5.2 Genetický polymorfismus	33
5.3 Kandidátní gen	34
5.4 Lokusy kvantitativních znaků	35
5.5 Genetické markery	35
5.6 Asociační studie	36
6. Seznam zkratk	40
7. Seznam použité literatury	41

1. Úvod

Mléko je nedílnou součástí výživy lidí, kde zastupuje jednu ze základních složek. Není zvláštností, že zvyšování spotřeby tohoto živočišného produktu úzce souvisí s neustále narůstající populací člověka. S tímto faktem kontinuálně stoupají nároky na chovatelské podmínky, welfare, zdraví a výživu zvířat. Neopomíjí se ale ani jeden z předních aspektů, kterým je genetické založení jedince.

V chovu skotu stále narůstá zájem o informace týkající se genetického polymorfismu mléčných proteinů. Především s ohledem na jeho vztah ke složení, kvalitě a následnému výrobnímu zpracování mléka. Vzhledem k tomu, že kravské mléko se používá hlavně k výrobě sýrů a jogurtů, je důležitý odhad míry vlivu polymorfismu kandidátního lokusu na technologické vlastnosti mléka. Výrobci mléčných produktů by tak mohli optimalizovat zpracovávající proces přesně podle těchto údajů, aby následně zlepšili kvalitu mléčných produktů a rentabilitu výroby.

Hlubší znalosti genetického polymorfismu mléčných bílkovin a jejich dopad na technologické vlastnosti byly již dříve zájmem několika studií. Znalost genů kaseinových a syrovátkových proteinů, jež jsou závislé na mendelistické dědičnosti, je nezbytná pro objasnění jejich vlivu na složení mléka, jeho nutriční a technologické vlastnosti. Následně by tyto informace mohly být využity v oblasti selekčních postupů vedoucích k výběru krav s žádoucími genotypy.

Tato práce je zaměřena na zjištění genetické variability mléčného proteinu betakaseinu (BCN) ve vybrané populaci dojníc. A na následné zkoumání působení různých haplotypů na syřitelnost mléka a eventuální využití jeho vlivu.

2. Cíl práce

Cílů diplomové práce bylo několik:

- Provést genotypizaci kandidátního lokusu s možným vlivem na technologické vlastnosti (především syřitelnost) a jakost mléka.
- Vytvořit asociační analýzu vztahu genotypů k technologickým vlastnostem mléka.
- Vyhodnotit zjištěná data statistickými programy.
- Vhodně interpretovat dosažené výsledky.

Diplomová práce byla zpracována s podporou projektu QJ1510339 a GAJU-002/2016/Z.

3. Literární přehled

3.1 Mléko

Mléko definované jako bílá průsvitná tekutina se řadí mezi zásadní součást lidské stravy a poskytuje základy pro správný růst a vývoj (Rijnkels, 2002).

Vedle primární funkce, kterou je hlavní zdroj výživy a poskytování imunologické ochrany novorozených savců, je důležitou složkou potravinářského průmyslu vzhledem k jeho jedinečnému složení a vlastnostem jednotlivých složek (Holt a kol., 2013).

Mléko různých živočišných druhů od kravského, kozího, ovčího, přes kobyli a velbloudí až po buvolí je hojně zahrnuto ve stravě nejen dětí, ale i většiny dospělých lidí. Mléko a jiné mléčné výrobky poskytují vysoce kvalitní zdroj energie, bílkovin, minerálních látek, sacharidů, mastných kyselin, růstových faktorů, imunitních modulátorů a dalších prospěšných látek pro většinu lidské populace (Jaiswall a Sarsavan, 2014).

Tento živočišný produkt je velmi ceněn i pro obsah mnoha prvků jako je např. vápník, hořčík nebo fosfor a také poskytuje několik bioaktivních peptidů (Belitz a Grosch, 2004).

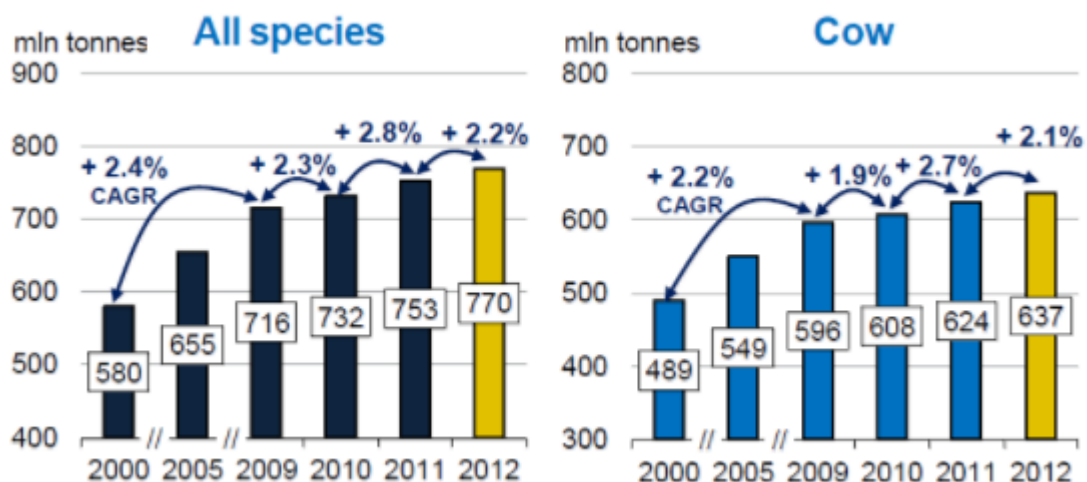
Produkce mléka u skotu je funkcí bezpočtu epitelových buněk mléčného parenchymu a jeho tvorba probíhá neustále bez ohledu na stupeň laktace. Je známo, že některé složky mléka jsou přiváděny krevním řečištěm poté, co dojde ke vzniku jejich prekurzorů v játrech a některé jsou syntetizovány přímo v alveolárních buňkách (Miller a kol., 2006). Intenzivní krvení mléčné žlázy je tedy základem sekrece mléka přičemž se udává, že na jeden litr vyprodukovaného mléka proteče vemenem okolo 500 litrů krve (Tančín 2013).

Vlivů ovlivňujících laktaci je mnoho a základní rozdělení se určuje dle genetické podmíněnosti či podmínění prostředím. Mezi vnější vlivy podmíněné prostředím lze řadit věk a zdravotní stav dojnice, výživu, pohyb, techniku dojení a systém ustájení, sezónnost, věk při prvním otelení, pořadí a stádium laktace, ale třeba i lidský faktor

(Chandan, 2007). Do dědičně založených vlivů patří druh zvířete, plemeno a genetické založení daného jedince (Gajdůšek, 2003).

3.1.1 Spotřeba mléka a mléčných výrobků

Kravné mléko zastupuje největší část (okolo 80%) z celkového objemu konzumovaného mléka a ze studie prováděné v letech 1990 až 2010 zahrnující 187 zemí a téměř 700 000 lidí vyplývá, že spotřeba syrového mléka u jedinců ve věku nad 20 let činí v průměru asi 135 ml za den (Singh a kol., 2015). Obecně platí, že při takto rozsáhlém výzkumu se údaje z různých zemí zásadně liší (Amigo a kol., 2000). Největšími spotřebiteli mléka na světě byli v roce 2010 obyvatelé Švédska a Islandu, kteří vypili asi 568 ml mléka denně, zatímco nejmenší spotřeba byla registrována v severní Koreji, jejichž údaje jsou jen okolo 14 ml konzumovaného mléka za den (Singh a kol., 2015).



Obrázek č. 1: Roční produkce mléka všech druhů zvířat a kravného (v mil. tun) k roku 2012, Zdroj: Bull. IDF 470/2013

Mléčné výrobky, zejména ty, které pocházejí z kravného mléka, jsou hlavní výživovou složkou stravy člověka a jejich konzumace se po celém světě stále zvyšuje (Ul Haq a kol., 2014). V tabulce č. 1 je uvedena světová spotřeba mléka a mléčných výrobků k roku 2012.

Kontinent	Spotřeba (mil. tun)	Spotřeba na obyvatele (kg)	Podíl na světové spotřebě (%)	Podíl na světové výrobě (%)
Asie	311,6	73,1	40,6	37,7
Evropa	207,5	280,3	27	28,4
Severní Amerika	95,6	274	12,5	12,9
Střední Amerika	20,4	127,6	2,7	2,2
Jižní Amerika	69,6	175,2	9,1	9,1
Afrika	53,3	49,7	6,9	6,0
Oceánie	9,4	254,7	1,2	3,8

Tabulka č. 1: Světová spotřeba mléka a mléčných výrobků k roku 2012,
Zdroj: Bull. IDF na podkladě FAO Food Outlook

V roce 2011 vykazovala světová produkce sýra více než 18 milionů tun ročně (Gregersen a kol., 2015). EU se ve světové výrobě mléčných produktů řadí mezi první příčky. Výroba mléčných produktů v EU k roku 2012 je zaznamenána v tabulce č. 2. V roce 2012 byla u konzumního mléka na prvním místě před USA a Čínou. Co se týče výroby sýrů, zastala také první příčku před USA a Brazílií, u zakysaných výrobků taktéž před Čínou a Iránem. U ostatních výrobků je to podobné, kdy se střídá na prvním místě v produkci s Novým Zélandem nebo např. Indií.

EU	Výroba (mil. tun)	Meziroční růst (%)
Konzumní mléko	32,9	- 0,4
Zakysané výrobky	9,3	- 1,5
Máslo a jiné formy mléčného tuku	2	+ 1
Sýry vyrobené z kravského mléka	8,8	+ 1,4
Sušené plnotučné mléko	0,7	-2,9
Sušené odstředěné mléko	1,2	- 0,1

Tabulka č. 2: Výroba mléčných produktů v EU k roku 2012,
Zdroj: Bull. IDF 470/2013

Zejména v posledních letech je mléko velmi diskutovaným živočišným produktem ve spojení s lidským zdravím. Mléko a mléčné výrobky obsahují mimo jiné také nasycené tuky a jejich spotřeba často zapříčiní zvýšení hladiny cholesterolu v plazmě (Sun a kol, 2007). To zřejmě vede k širšímu přesvědčení, že mléko a mléčné výrobky jsou faktorem obezity a chronických onemocnění, a tudíž by jejich spotřeba měla být omezena (Rice a kol., 2013).

Vyvozování závěrů o důsledcích konzumace mléka na základě jednoho údaje, jako je hladina cholesterolu, je však zcela nepřiměřené, protože ignoruje skutečnost, že mléko, které je složitým produktem s množstvím živin, pravděpodobně ovlivňuje mnoho mechanismů zásadních pro lidský vývoj. Analýzy, které jsou v této věci prezentovány, dokazují, že u jedinců, kteří pijí nejvíce mléka, dochází k malému avšak užitečnému snížení rizika koronárního srdečního onemocnění či snížení míry pravděpodobnosti výskytu mozkové mrtvice (Elwood a kol., 2010).

3.1.2. Složení mléka

Složení mléka je nezbytně zkoumaným aspektem především proto, že svými chemicko-fyzikálními vlastnostmi zásadně ovlivňuje kvalitu mléčných výrobků. Sledování složení mléka je zásadní pro výrobu kvalitních a výživově hodnotných mléčných produktů a je často prováděno u jednotlivých vzorků i několikrát v průběhu zpracování (Rafiq a kol., 2016).

Mezi hlavní složky mléka jsou řazeny voda, tuk, bílkoviny, laktóza a minerální látky. V tabulce č. 3 jsou uvedeny mezní i střední hodnoty procentického obsahu těchto látek v kravském mléce. Obsahuje však i stopové množství dalších látek, jako jsou vitamíny, enzymy, pigmenty, fosfolipidy a plyny (Moran a kol., 2017).

Hlavní složky mléka	Mezní hodnoty (%)	Střední hodnota (%)
Voda	85,5 – 89,5	87,2
Sušina	10,5 – 14,5	12,8
Tuky	2,5 – 6	3,8
Proteiny	2,9 – 5	3,4
Sacharidy	3,6 – 5,5	4,8
Minerální látky	0,6 – 0,9	0,8

Tabulka č. 3: Procentický obsah látek v kravském mléce,
Zdroj: Kořínek, 2000

Mléko obsahuje z největší části vodu, v sušině jsou pak nejhojněji zastoupeny sacharidy, tuky či proteiny a minerální látky tvoří méně než jedno procento celkového obsahu (Kořínek, 2000). Velké rozdíly pak lze zaznamenat mezi různými druhy savců, jak je vidět i v tabulce č. 4, kde je vypsán procentický obsah hlavních složek mléka u člověka a některých hospodářských zvířat.

Druh	Voda (%)	Tuky (%)	Proteiny (%)	Sacharidy (%)	Min. látky (%)
Skot	87,2	3,8	3,4	4,8	0,8
Ovce	80	9	6	4,1	0,9
Koza	86,7	4,2	3,8	4,5	0,8
Prase	81,2	6,2	6,3	4,5	1,1
Člověk	87	4,3	1,4	6,5	0,3

Tabulka č. 4: Procentický obsah látek v mléce savců,
Zdroj: Savci.upol.cz, 2002

3.2 Mléčné proteiny

Kravske mléko je jednou z nejdůležitějších potravin pro kojence, děti i dospělé na celém světě. Je řazeno mezi nejčastější zdroj živočišných bílkovin a stopových prvků (Jaiswal a Sarsavan, 2014). Mléko obsahuje mnoho komponent a jednou z nich je i složitá směs stovek druhů jednoduchých, globulárních a konjugovaných proteinů, které tvoří komplikovaný souhrn dusíkatých látek (Laible a kol., 2016).

Mléčné proteiny jsou mimo jiné významné tím, že jsou přirozeným nosičem bioaktivních látek. Jejich strukturální a fyzikálně-chemické vlastnosti umožňují tuto jejich funkci v systému navázání a dodávání potřebných látek (Livney, 2010).

Mléčné bílkoviny se takto přirozeně vyvinuly k dodání např. vápníku a fosforu, ale i složek imunitního systému jako třeba imunoglobulinů a laktoferrinu od matky pro novorozená mláďata (Thompson a kol., 2009).

Jedinečnou zajímavostí je i fakt, že lidé jako jediní savci konzumují mléko jiných živočišných druhů jako hlavní zdroj potravy. Nicméně, kravske mléko má zřetelně odlišnou skladbu proteinů ve srovnání s ostatními druhy mléka, tudíž i s mateřským. Celkový obsah bílkovin v mateřském mléce je nižší a obsah laktózy naopak vyšší ve srovnání s mlékem kravským (Boudry a kol., 2010). I z tohoto důvodu dochází stále více ke zkoumání nejen složení proteinů, ale i jejich možné úpravě v kravském mléce pomocí zkoumání genetických variant proteinů a možnosti jejich následného využití v selekci zvířat (Laible a kol., 2016).

Různost bílkovin výrazně přispívá k jedinečné nutriční a funkční kvalitě kravského mléka. Bylo zjištěno, že např. ročním obdobím je ovlivněn α - a β -kasein stejně jako i α -laktalbumin. Tento vliv je uveden v tabulce č. 5. Dále byly pozorovány účinky v době stresových situací a v důsledku toho vzrostla relativní koncentrace β -kaseinu (Gellrich a kol., 2014). Výsledkem je, že podstatné odchylky ve složení mléčných bílkovin mohou být způsobeny vlivem mnoha různých faktorů ať už druhem zvířete, plemenem, individuálním genetickým založením, pořadím laktace a dalšími (Hallén a kol., 2008).

Mléčné proteiny	Roční období			
	Jaro	Léto	Podzim	Zima
α -kasein	34,1 ± 0,5	33,8 ± 0,5	34,8 ± 0,4	34,7 ± 0,4
β -kasein	31,8 ± 0,3	32,6 ± 0,4	31,7 ± 0,3	31,2 ± 0,3
κ -kasein	16,2 ± 0,7	15,5 ± 0,7	15,9 ± 0,7	15,8 ± 0,7
α -laktalbumin	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1
β -laktoglobulin	9,9 ± 0,4	9,6 ± 0,4	9,6 ± 0,4	9,8 ± 0,4
ostatní proteiny	6,5 ± 0,4	6,2 ± 0,4	5,6 ± 0,4	6,3 ± 0,4
Jaro (březen-květen), Léto (červen-srpen), Podzim (září-listopad), Zima (prosinec-únor)				

Tabulka č. 5: Průměrné koncentrace hlavních mléčných proteinů v průběhu ročních období, Zdroj: Gellrich a kol., 2014

V mléce jsou přítomny dvě hlavní proteinové skupiny, nazývané kaseiny a syrovátkové bílkoviny (Chandan, 2007). Kaseinové bílkoviny v kravském mléce představují až 80% a syrovátkové zastupují okolo 20% z celkového poměru mléčných proteinů a mléko krav je tedy řazeno mezi kaseinové. Dalším typem je mléko albuminové, které se vyskytuje u monogastrů, kde je menší zastoupení kaseinových bílkovin (McLachlan, 2006).

3.2.1 Kaseinové proteiny

Mléčné proteiny, které řadíme mezi kaseiny lze charakterizovat tím, že jsou syntetizovány v mléčné žláze, patří mezi ně několik fosfoproteinů a glykoprotein a jsou sekretovány jako koloidní komplexy nazývané micely (Zhang a kol, 2005). Dochází u nich ke srážení při pH 4,6 a při 20°C (Farrell a kol., 2004).

Skládají se ze čtyř autosomálních genů *CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2* a *CSN3*, které jsou zodpovědné za syntézu α 1-kasein, α 2-kasein, β -kasein a κ -kasein. U skotu jsou geny kaseinů lokalizovány na chromozómu 6 a tyto proteiny tvoří okolo 80% z celkového obsahu bílkovin v mléce (Vincent a kol., 2014).

V kravském mléce jsou tedy přítomny čtyři druhy kaseinových proteinů. Kasein α 1-kasein označující se jako *CSN1S1*, který zastupuje 39 – 46% z celkového objemu kaseinu, α 2-kasein pod zkratkou *CSN1S2* s 8 – 11%, β -kasein s označením *CSN2* a s nejvyšším obsahem 25 – 35% a poslední κ -kasein *CSN3*, který se v mléce vyskytuje v poměru 8 – 15% (Jaiswal a Sarsavan, 2014).

Kaseinové proteiny nejsou v mléce jen jako monomerní struktury. Mají méně uspořádané sekundární a terciální struktury ve srovnání s typickými globulárními bílkovinami, ale jsou uspořádány do komplexních micel, které umožňují extrémně vysokou koncentraci proteinu až 30 mg / ml kravského mléka, při zachování nízké viskozity s vysokou rozpustností (Laible a kol., 2016).

Až 95% kaseinů je sestaveno do kaseinových micel. Jsou to koloidní částice o průměru 50-300 nm (v průměru 150 nm) a molekulové hmotnosti v rozmezí 10^6 až 3×10^9 Da. Obsahují okolo 94% proteinů a 6% nízkomolekulárních sloučenin v podobě malých iontů, především vápníku, fosforu, hořčíku a citrátu, obecně nazývaných jako koloidní fosforečnan vápenatý. Micely obsahují asi 2 g vody / 1 g bílkovin a v 1 ml mléka se nachází 10^{14} až 10^{16} micel (Fox a McSweeney, 2003). Jejich hlavní funkcí je soustředění, stabilizace a dodávání vápníku, fosfátu a bílkovin od matky k novorozenci. Kaseiny váží hydrofobní molekuly několika mechanismy včetně hydrofobních interakcí, van der Waalsových sil a vodíkových vazeb (Livney, 2010).

Tato struktura kulovitěho tvaru vykazuje značné rozdíly nejen ve složení, struktuře a velikosti, ale i v minerálním složení za různých podmínek. Rozdíly viskozity, vlastností a velikosti micel jsou v mléce různých živočišných druhů odlišné a bylo prokázáno, že mají také vliv na zpracovatelské vlastnosti mléka. Tyto funkce a vlastnosti micel jsou dány právě mléčnými bílkovinami, které mají otevřené a flexibilní konformace a sestávají z hydrofilních a hydrofobních segmentů (Holt a kol., 2013).

Stabilita kaseinů a kaseinových micel během ohřevu, mražení a sušení je cenná především při dodávání potravinových přísad a bioaktivních látek. Nicméně, environmentální modifikace jako například změny pH, narušují stabilitu struktury kaseinových micel (Fox a McSweeney, 2003).

Kaseiny jsou používány jako složka bílkovin v různých potravinářských výrobcích, kde zlepšují jejich fyzikální a funkční vlastnosti. Mezi hlavní patří hustota, pění, emulgace, struktura a především výživová hodnota (Livney, 2010). Kaseiny jsou obecně považovány za bezpečné a zdravotně nezávadné a mají vynikající vazebnou kapacitu pro ionty a malé molekuly, vynikající vlastnosti emulgace a samozásobení a schopnost tvoření gelu a vázání vody. Z těchto důvodů jsou tedy jednotlivé kaseiny a kaseinové micely vybírány jako dobří kandidáti s vhodnými vlastnostmi nosiče k dodávání citlivých látek v potravinářském a farmaceutickém průmyslu (Elzoghby a kol., 2011).

Genetický polymorfismus mléčných bílkovin je stále velkým zájmem v chovu skotu především kvůli provázanosti se složením, kvalitou a technologickou stránkou zpracování mléka (Sharma a kol., 2012). Řada studií ukázala, že produkce, složení a kvalita mléka jsou ovlivněny genetickými variantami mléčných proteinů. Bylo popsáno, že některé varianty β -kaseinu a κ -kasein jsou spojeny s vyšší dojivostí ve srovnání s jinými genotypy. Proto představuje identifikace variant mléčných bílkovin důležitý nástroj pro zlepšení výnosu, kvality a technologických vlastností mléka (Vincent a kol., 2014).

3.2.1.1 Betakasein

Betakasein (BCN) je jednou z hlavních složek kaseinových bílkovin a v kravském mléce je jeho průměrný obsah 35 mg / ml (Esmaili a kol., 2011). Jedná se o molekulu, která se skládá z jediného řetězce o 209 aminokyselinách a její molekulová hmotnost je 24 kDa (Antonioni a kol., 2011). Je také třeba poznamenat, že β -kasein popisovaný v této práci se liší např. od lidského BCN.

Betakasein má amfifilní charakter, může tvořit micelární nanostruktury a spolu s vysokou povrchovou aktivitou dochází k získání významných vlastností, jako je dobrá pěnívost a vysoká emulgační schopnost (Faizullin a kol., 2017).

Lokus kódující β -kasein je označován *CNS2* a nachází se na 6. chromozomu bovinního genomu. Tento protein patří mezi nejvíce polymorfní gen mléčných bílkovin. Celkově zahrnuje až 13 genetických variant (Caroli a kol., 2009). V tabulce

č. 6 můžeme vidět změny aminokyselinové sekvence u 12 alelických variant: *A1*, *A2*, *A3*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H1*, *H2*, a *I*. Pro alelu *A4* nalezenou v mléce korejského původního skotu, která není zobrazena v tabulce č. 6, nebyla dosud rozpoznána substituce nukleotidů (Kaminski a kol., 2007).

	Změna v aminokyselinové sekvenci													
	18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	117	122	137	138
<i>A2</i>	SerP	Arg	SerP	Glu	Glu	Pro	Glu	Leu	Gln	His	Gln	Ser	Leu	Pro
<i>A1</i>						His								
<i>A3</i>										Gln				
<i>B</i>						His						Arg		
<i>C</i>			Ser		Lys	His								
<i>D</i>	Lys													
<i>E</i>				Lys										
<i>F</i>						His								Leu
<i>G</i>						His						Leu		
<i>H1</i>		Cys						Ile						
<i>H2</i>										Leu				Glu
<i>I</i>										Leu				

Tabulka č. 6: Změny aminokyselinové sekvence různých genetických variant β -kaseinu, Zdroj: Kaminski a kol., 2007

Pro všechna plemena jsou obecně nejběžnější varianty *CSN2 A1* a *A2*, následuje genetická varianta *B*, která se vyskytuje s vyšší frekvencí u některých plemen, jako je např. Normandský a Jerseyký skot, kde je frekvenční rozsah 0,30 - 0,45 nebo Montbeliardský skot, plemeno Reggiana, Modenese a italská plemena skotu s frekvenčním rozsahem 0,10 - 0,25 (Chessa a kol., 2013). Naposledy identifikovaná alelická varianta *CSN2 I* je běžná spíše u Holštýnského skotu s frekvencí 0,12 a Red Pied plemene, u kterého byla zjištěna frekvence: 0,14 (Jann a kol., 2002). Jiný zdroj však uvádí, že frekvence této genetické varianty β -kaseinu je u Holštýnského skotu

až 0,19 (Visker a kol., 2010). Důležitou informací je i heritabilita, ta se pro β -kasein pohybuje od 0,63 do 0,69 (Bonfatti a kol., 2011).

Nejběžnější formy β -kaseinu *A1* a *A2* jsou také nejdiskutovanějšími a nejvíce zkoumanými genetickými variantami (Farrell et al., 2004). U jedinců s genetickou variantou *A1* bylo zjištěno menší množství nadojeného mléka a nižší obsah proteinů oproti dojnícím nesoucí alelu *A2*. Vznik těchto 2 geneticky odlišných forem je výsledkem polymorfismu jediné aminokyseliny (Jaiswal a Sarsavan, 2013). Liší se pouze v poloze 67 β -kaseinového řetězce, kde je u formy *A2* kódována aminokyselina prolin, zatímco u varianty *A1* je v této poloze substituována aminokyselina histidin (Roginski a kol., 2003).

Důležitým poznatkem mimo odlišnostmi mezi *CSN2 A1* a *A2* je i polymorfismus u genetické varianty *B*. Ta se genetickou strukturou řetězce více podobá variantě *A1* díky histidinu v poloze 67, avšak liší se od ní aminokyselinou v pozici 122, kde je kódován arginin místo serinu (Jaiswal a Sarsavan 2014).

V tabulce č. 7 je uvedeno srovnání frekvencí alel *CSN2* u italských fríských krav, kdy vzorky byly analyzovány nejprve v roce 2003 a následně v roce 2012.

Gen <i>CSN2</i>	Rok odebrání vzorků	
	2003	2012
Alela		
<i>A1</i>	0,392	0,395
<i>A2</i>	0,533	0,530
<i>A3</i>	0,005	0
<i>B</i>	0,070	0,035
<i>I</i>	N.D.	0,040
N.D.: not determined = neurčeno (varianta <i>CSN2I</i> nebyla odlišována od <i>CSN2A2</i>)		

Tabulka č. 7: Srovnání frekvencí alel *CSN2* u italských fríských krav vzorkovaných v roce 2003 a 2012, Zdroj: Chessa a kol., 2013

3.2.1.2 Betakasein v potravinářství

Betakasein má vynikající funkční vlastnosti, především pěnovost a emulgaci a je proto vhodný pro použití v různých aspektech potravinářské výroby (Chessa a kol., 2013). Kaseinový koncentrát s vyšším podílem β -kaseinu vytváří pěnu s dobrou stabilitou. Tato vlastnost je užitečná v potravinářství při aplikacích využívajících šlehání nebo pění (Siebel a kol., 2015)

Na druhou stranu hydrolyza BCN zlepšuje tepelně indukované funkční vlastnosti sýrů, zejména jejich tavitelnost. Snížení koncentrace β -kaseinu v mléce (tj. zvýšení poměru $\alpha 1$ -: β -kaseinu) zlepšuje funkční vlastnosti sýrů (O'Mahony a kol., 2014). Při změně poměru a zpracování mléka s nižším obsahem BCN vykazuje vyrobený sýr lepší roztíratelnost a v průběhu stárnutí méně hořkou chuť (Siebel a kol., 2015). Peptidy uvolněné z β -kaseinu během zrání sýrů jsou totiž známy jako primární přispěvatelé hořkosti v těchto mléčných produktech (Iwaniak a Minkiewicz, 2007).

Velmi důležitým aspektem je také genotyp. Ve skutečnosti jsou β -kaseinové micely nesoucí alelu *B* celkově stabilnější než s alelou *A*, ale zároveň také citlivější vůči chymosinovému účinku. Tvarová rychlost je vyšší u mléka s genotypem *B* v porovnání s mlékem β -kaseinu *A*, zatímco velikost micel je zde menší, což by mohlo vysvětlovat lepší koagulační vlastnosti (Hayes a kol., 2009).

Výzkumy také odhalily, že genotyp *A1A1* významně ovlivňuje doživost. Genotyp *A2A2* zase obsah tuku a bílkovin v mléce a zároveň s tím snižuje cholesterol. Vyšší obsah bílkovin a tuku je také asociován s alelou *B* a zvýšení koagulačních vlastností především s genotypem *BB* (Miluchová a kol., 2009; Jaiswal a Sarsavan, 2014). Celkově vyšší obsah β -kaseinu je asociován s genotypy *A1A2*, *A1B*, *A2B* a *A3B* (Heck a kol., 2009) Nejvyšší obsah tuku a proteinů byl zaznamenán u dojnic s genotypem *A2A3* a genotyp *A1A3* zase vykazoval nejvyšší doživost, ale nižší procento proteinů (Kučerová a kol., 2006).

Velký vliv genetických variant na lepší vlastnosti mléčných produktů naznačuje vhodnost výběru specifických alel nebo haplotypů, které by mohlo být užitečným nástrojem při zpracování mléka s žádoucím proteinovým složením a technologickými vlastnostmi (Pärna a kol., 2012). Chovné programy mohou vést

ke dvěma hlavním výhodám. Zvýšení plemenné hodnoty pro obsah proteinu a snížení frekvence genotypu *A1*, který je považován za rizikový faktor v lidské výživě. Betakasein je velice polymorfní gen, který je v této době vyhodnocen s mírnou převahou genotypu *A1* (Jaiswal a Sarsavan, 2014).

3.2.1.3 Betakasein ve spojitosti s lidským zdravím

Dvě nejčastější genetické varianty BCN *A1* a *A2* jsou v posledních letech středem zájmu hlavně pro jejich potencionální vliv na lidské zdraví, spojené především se stále častějším výskytem intolerance laktózy (Kaminski a kol., 2007; Jaiswal a Sarsavan, 2013; Brüssow, 2013).

Dle výzkumů prováděných pomocí trávicích enzymů je jednoznačné, že u kravského mléka dochází k proteolýze u typu *CSN2 A1*, ale ne u varianty *A2* (Caroli a kol., 2016). Dojnice mohou být homozygotní pro jeden ty nebo heterozygotní s alelickou kodominancí, kdy jsou v mléce vyjádřeny obě alely. Aminokyselina histidin nacházející se u typu *A1* a příbuzných subvariantách *B* a *C* na pozici 67 snadno umožňuje enzymatickou hydrolyzu, ovšem na rozdíl od toho, prolin v této pozici u varianty *A2*, *A3* a *D* brání proteolytickému štěpení (Deth a kol., 2016).

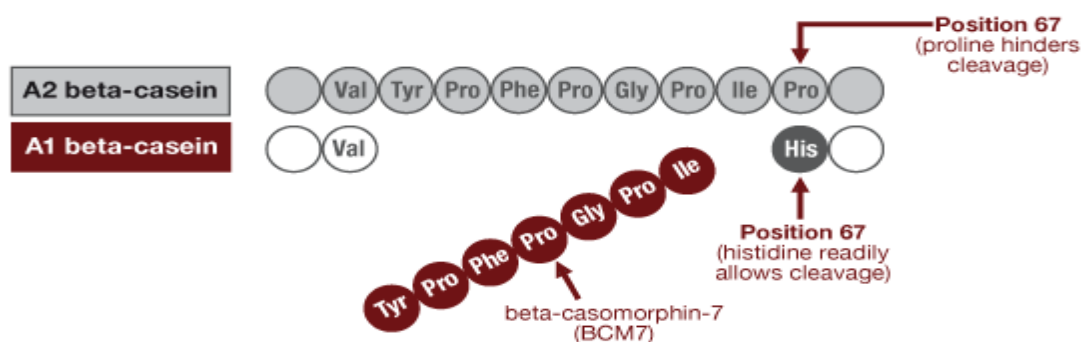
Během trávení se proteiny v mléce rozkládají na peptidy (Truswell, 2005). Většina těchto peptidů se přemění na aminokyseliny, které jsou absorbovány krevním řečištěm, další z nich jsou vyloučeny ve stolici a malé množství projde přes střevní stěnu do krevního oběhu, zatímco stále zůstávají ve formě peptidu (Sharma a kol., 2012).

Některé mléčné proteiny a jejich aktivní peptidy pak mohou být zdrojem tzv. opioidů (Kostyra a kol., 2004). Pod tímto pojmem se rozumí chemické látky, které vykazují v těle aktivitu morfinu. Některé z nich jsou známy tím, že hrají důležitou roli v reakcích na stres, bolest či kontrolu příjmu potravy. Tyto látky působí vazbou na opioidní receptory, které se nacházejí hlavně v centrálním nervovém systému a gastrointestinální traktu (Teschmacher, 2003). Proteolýza probíhající při trávení mléka a sýrů, rovněž vede ke vzniku různých bioaktivních peptidů (Jaiswal a Sarsavan, 2014).

Hydrolyza β -kaseinu vede ke vzniku hexapeptidu Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn (63 ± 68) a tripeptidu Leu-Leu-Tyr (191 ± 193). Betakasein obsahuje tzv. betakasomorfíny, to jsou fragmenty sekvence β -kaseinu 60 ± 70 o délce 4-11 aminokyselin, které mají opiátové vlastnosti. Bylo prokázáno, že tyto betakasomorfíny modulují imunitní systém (Sodhi a kol., 2012).

Při trávení BCN genotypu *AI* dochází mimo jiné k uvolňování opioidu s názvem betakasomorfín 7 (BCM7), který je spojován s řadou onemocnění. Zkoumán je především ve spojitosti s autismem, diabetes typu 1, syndromem náhlého úmrtí kojenců, roztroušenou sklerózou, parkinsonovou chorobou nebo schizofrenií (Sharma a kol., 2012).

Bovinní a humánní BCM7 se liší o 2 aminokyseliny v peptidu. Struktura lidského BCM7 je H-Tyr51-Pro52-Phe53-Val54-Glu55-Pro56-Ile57-OH, zatímco u skotu je to H-Tyr60-Pro61-Phe62-Pro63-Gly64-Pro65-Ile66-OH (Jaiswal a Sarsavan, 2014). Tyto strukturální rozdíly mají vliv na opioidní aktivitu BCM7. Betakasomorfín 7 uvolňovaný z mléka skotu je nejméně 10 krát účinnější (tzn. má vyšší vazebnou afinitu pro opioidní receptory), než lidský BCM7. To může mít různé důsledky na životní funkce jedince s příjmem mléka genotypu *AI* (Ul Haq a kol., 2014).



Obrázek č. 2: Uvolňování BCM7 z BCN *AI*, Zdroj: www.urgeschmack.de

Úloha výzkumu vlivu β -kaseinu v oblasti zdraví a rozvoje lidí je tématem rozsáhlých vědeckých debat. Výběr a chov zvířat se žádoucími genotypy má zásadní

význam pro šlechtění dojnic. Studie důrazně doporučují znát genotypy dojnic ve vztahu k následným výrobním procesům, avšak dosud bylo provedeno poměrně málo srovnávacích studií obsahujících pouze BCN s genotypem *A1* a *A2* (Ho S a kol., 2014; Jianquin a kol., 2016).

3.2.2 Syrovátkové bílkoviny

V mléce jsou přítomny vedle početněji zastoupené kaseinové skupiny i syrovátkové bílkoviny, které tvoří okolo 20% z celkového poměru mléčných proteinů (McLachlan, 2006). Jsou zde přítomny ve formě koloidního roztoku, jsou řazeny mezi termolabilní a na rozdíl od kaseinů tedy denaturují při teplotě 60 – 70°C. Vyznačují se tvorbou proteinů syrovátky, k jejíž čistému zisku dochází po vysrážení kaseinu při pH 4,6 (Chandan, 2007).

Syrovátkové bílkoviny jsou složeny z β -laktoglobulinu, který tvoří téměř polovinu celkových syrovátkových proteinů. Další důležitou složkou je α -laktoglobulin a jiné doplňující prvky jako jsou imunoglobuliny, bovinní sérový albumin a malé proteiny jako je laktoperoxidáza, lysozym a laktoferin (Farrell a kol. 2004; Kaminski a kol., 2007).

4. Technologické vlastnosti mléka

Živočišná výroba se tradičně zaměřuje především na dosažení vysokého výnosu při nízkých nákladech. V poslední době je však kladen velký důraz i na kvalitu a technologické aspekty. Technologické vlastnosti mléka udávají, zda je surové mléko vhodné pro výrobu mléčných produktů. Nyní se zvyšuje zájem o parametry mléka, jako jsou koagulační vlastnosti, obsah tuků a bílkovin, ale i celkové množství získaných mléčných výrobků (Cecchinato a kol., 2015). Značný význam na celkovém množství a složení sýrů mají totiž vedle složení mléka i jeho vlastnosti. Proto je dnes velkým tématem snaha optimalizovat výrobu dle technologických vlastností mléka (Gregersen a kol., 2015).

Mezi základní technologické vlastnosti mléka se řadí syřitelnost, tepelná stabilita, kyselost (pH) a kysací schopnost (Samková, 2012). Tento pojem ovšem zahrnuje i vlastnosti jako je počet somatických buněk, podíl mléčného tuku a bílkovin, alkoholová stabilita, titrační kyselost, koagulace a pevnost sýřeniny, kasein, laktóza a mnoho dalších.

Genetické varianty určitých lokusů mohou ovlivňovat technologické vlastnosti. Většina studií zkoumající účinky genů na složení mléka a jeho vlastnosti se opírá o rozdíly genetických variant hlavních mléčných složek (Caroli a kol., 2009).

Kasein členěný v mléce může také výrazně ovlivňovat jeho vlastnosti. Kratší doba koagulace, snížená pevnost a nižší výnos tvarohu a sýrů vyplývají z proteázové aktivity v mléce (Cattaneo a kol., 2014). Přiřazení vlivů určitých kaseinových genů je však obtížné, jelikož jsou mezi sebou pevně propojeny a i změny jejich poměru mohou být ovlivňujícím faktorem (Bittante a kol., 2012).

4.1 Syřitelnost

Syřitelnost je jednou ze základních technologických vlastností mléka. Zásadní je především ve spojitosti s výrobou, množstvím a kvalitou získaných sýrů. Tato

schopnost vytvoření pevné hmoty za přítomnosti syřidla a kyselého prostředí je ovlivněna mnoha faktory včetně genetického polymorfismu mléčných proteinů (Bonfatti a kol., 2010; Samková, 2012). Ačkoliv genetický vliv na koagulaci mléka byl prokázán, jen málo studií dokázalo kvantifikovat do jaké míry tomu tak je. Zaznamenané odhady heritability pro syřitelnost jsou udávány v rozmezí od 0,15 do 0,40 (Vallas a kol., 2010, Poulsen a kol., 2014).

Vedle tohoto vlivu je dokázáno, že syřitelnost závisí také na koncentraci vápníku, pH, stupni a období laktace a také na plemenné příslušnosti dojnice (Marchi a kol., 2008). Koagulace mléka je komplexní proces ovlivňovaný mnoha faktory, při kterém dochází k proteolýze κ -kaseinu a následně i degradaci ostatních kaseinových proteinů (Vallas a kol., 2010).

Složením mléčných proteinů jsou ovlivňovány i dva hlavní ukazatele syřitelnosti, tím je myšlen čas sýření (RCT) a pevnost sýřeniny (E_{30}). RCT je definováno jako doba, za kterou se sraženina vytvořila, neboli čas koagulace mléka po přidání syřidla (Bonfatti a kol., 2010).

Čas sýření neboli počet minut od přidání syřidla do začátku koagulace je velice důležitým faktorem syřitelnosti a je úzce spjat s pevností sýřeniny. E_{30} se vyhodnocuje půl hodiny po začátku sýření a udává se v mm (Bittante a kol., 2012). Heritabilita těchto dvou ukazatelů syřitelnosti je v různých studiích uváděna v poměrně odlišném rozsahu pro RCT 0,25 – 0,61 a pro E_{30} je to 0,40 – 0,55. Avšak korelace mezi těmito parametry je nevýznamná (Vallas a kol., 2010).

Při zkoumání polymorfismů mléčných bílkovin a genetické asociace mezi genotypem a hodnotou ukazatelů syřitelnosti bylo zjištěno, že genotypy β -kaseinu nemají průkazný efekt (Ikonen a kol., 2004).

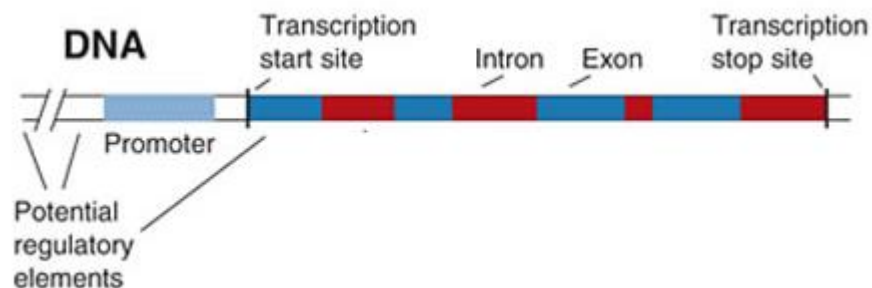
Syřitelnost je důležitým faktorem pro kvalitu a výnos sýrů, proto jak narůstá procento mléka používaného na výrobu mléčných produktů, stává se tato vlastnost středem zájmu studií. Bylo dokázáno, že krátký čas koagulace mléka se syřidlem a vysoká pevnost sýřeniny jsou příznivými aspekty pro výrobu sýrů (Cecchinato a kol., 2010). Genetické znalosti o parametrech a heritabilitě syřitelnosti mléka by mohly určit způsoby, kterými lze zlepšit koagulaci pomocí prostředků genetické selekce (Vallas a kol., 2010).

5. Eukaryotní genom a gen

Struktura genů a genomu je základním aspektem výzkumů dědičnosti a proměnlivosti. Genetika využívá k poznání předávání genetické informace mnoho metod, a to především fyzikální, biochemické či např. mikroskopické.

Eukaryotní genom je segmentován v buňkách do chromozomů. Jádro obsahující DNA je odděleno od cytoplazmy jadernou membránou a v cytoplazmě se nachází samostatná mitochondriální kružnicová DNA. Velká část genomu je tvořena tzv. repetitivními sekvencemi nukleotidů, menší část genomu pak obsahuje jedinečné sekvence. V genomu se nachází také např. pseudogeny, definovány jako nefunkční kopie genů a genomové rodiny neboli geny, které se vyvinuly z jednoho společného předka a mají podobnou sekvenci a funkci (Davidson, 2001).

Ačkoli eukaryota sdílejí mnoho základních aspektů replikace, transkripce a translace s prokaryoty, existuje řada rozdílů na úrovni genové struktury. Prokaryotické geny jsou často organizovány do operonů, které jsou transkribovány do polycistronických jednotek. Zatímco s několika výjimkami jsou eukaryotické geny transkribovány jako samostatná jednotka. Na rozdíl od prokaryotických genů mají eukaryotické geny často komplikované regulační oblasti a u mnohobuněčných organismů mají takové oblasti často modulární strukturu, která napomáhá regulaci exprese pro specifickou tkáň. Eukaryotické geny obsahují vedle exonů (kódujících oblastí) i velké množství intronů (nekódující oblasti), které se v prokaryotickém genomu nevyskytují. Důležitým rozdílem je také to, že eukaryotické transkripty obecně obsahují delší netranslatované vedoucí a koncové sekvence než prokaryotní (Lynch, 2006).



Obrázek č. 3: Struktura genu,
Zdroj: <https://sites.google.com/site/biotechnologydna7/geneexpression>

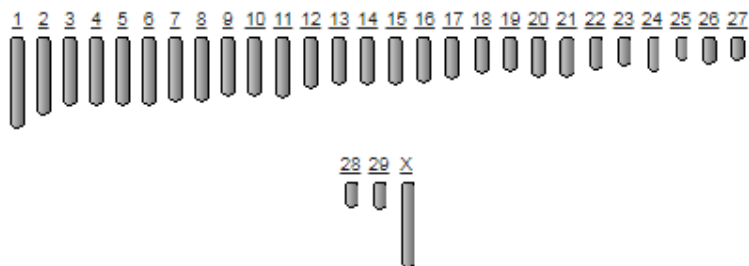
Na obrázku č. 3 je vidět, že první částí genu je promotor. Promotor se nachází na 5' konci a v jeho blízkosti je lokalizován TATA-box, část genu napomáhající správnému navázání RNA polymerázy II a zahájení transkripce. Následuje ATG iniciační kodon, který spouští proces translace a za ním se nacházejí introny a exony. Na konci genu je lokalizován terminační kodon UAA, UAG nebo UGA. Geny však obsahují i mnoho dalších regulačních oblastí, polyadenylační signály, regulátory genové exprese aj. (Davidson, 2001, Chen a kol., 2013).

Dědičnost se z pravidla dělí na gonozomální a autozomální. Pohlavní chromozomy tzv. gonozomy nemají pro obě pohlaví stejnou dědičnost. Naopak dědičnost genů uložených na nepohlavních chromozomech tzv. autozomech je pro obě pohlaví stejná. Dědičnost se mimo jiné také dělí dle forem genu neboli alel. Ty určují vztah alel na úrovni dominantní, recesivní, neúplně dominantní a kodominantní dědičnost (Kuciel a Urban, 2016).

Geny se dle jejich účinku rozdělují na monogenní a polygenní. Monogenní geny mají velký účinek a kódují většinou kvalitativní znaky. Geny malého účinku tzv. polygeny ovlivňují kvantitativní znaky, na tvorbě znaku se podílí více genů a zároveň je zde významný i vliv prostředí (Davidson, 2001).

5.1 Bovinní genom

Genom znamená souhrn veškeré genetické informace uložené v buňce či organismu. Znalost bovinního genomu je velmi důležitá nejen pro obrovský zájem s ohledem na zemědělský a potravinářský průmysl, ale také kvůli lepšímu vývoji zdravotního průmyslu (Elsik a kol., 2016). Produkce mléka a hovězího masa je jedním z největších zpracovatelských průmyslů. Mimo to bylo také zjištěno, že *Bos taurus* je důležitým modelovým organismem pro výzkum ve zdravotnictví. Nejen, že napomáhá ve šlechtitelských záměrech zlepšit odolnost krav proti chorobám, ale v humánní medicíně je důležitým faktorem při studiích lidské obezity, infekčních chorob či reprodukčních poruch (Zimin a kol., 2009).



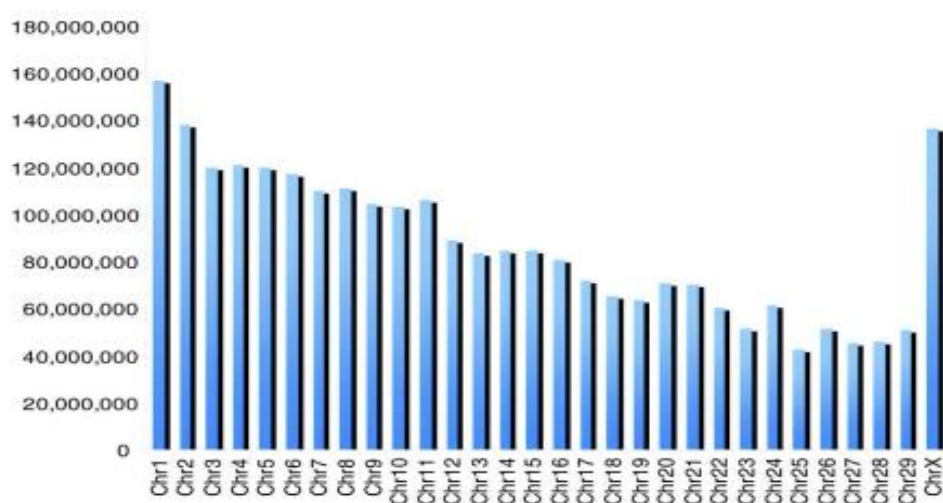
Obrázek č. 4: Chromozomy skotu,
Zdroj: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=bos%20taurus>

Genom skotu je organizovaný do 30 párů chromozomů, z nichž 29 jsou nepohlavní chromozomy a 1 pár jsou gonozomy. Celková velikost genomu byla v roce 2009 zjištěna u plemene Hereford na 2 649, 67 Mb, počet genů na 26 453 a okolo 10 050 pseudogenů (NCBI, 2016).

Protože kaseinové lokusy jsou u skotu lokalizovány blízko sebe na chromozomu 6, v rámci oblasti okolo 250 kb, alely různých bílkovin jsou ve vazebné nerovnováze. To naznačuje, že sdílejí oblasti DNA, které se mohou účastnit při kontrole syntézy proteinů (Hallén a kol., 2008; Bonfatti a kol., 2010).

Zajímavým zjištěním při poznání genomu domestikovaného skotu bylo to, že až 80% genů je společných i pro lidský genom. Velký podíl jednobodových mutací

(SNP) vysvětluje širokou fenotypovou rozmanitost skotu a lze je cíleně využívat pro selekci jedinců s požadovanými produkčními vlastnostmi (Huang a kol., 2012).



Graf č. 1: Počty párů bází u chromozomů skotu,
Zdroj: Zimin a kol., 2009

SNP je výsledkem změn jednotlivých nukleotidů v aminokyselině, které vykazují strukturální abnormality a dochází k funkčním rozdílům ve variantách β -kaseinu. Tato změna aminokyselin má následně vliv i na vlastnosti mléka (Jaiswal a Sarsavan, 2013).

Vysoký počet SNP v bovinním genomu naznačuje možnost zlepšení složení a kvality mléka výběrem některých genotypů mléčných bílkovin. V nynějším tradičním chovu skotu je zahrnuta strategie pro zlepšení vlastností tzv. odhadem hodnoty plemených býků, která je založena na znalosti fenotypu velkého počtu dcer. Ačkoli údaje o složení tuku a bílkovin v mléce jsou dostupné prostřednictvím národních systémů, informace o jednotlivých dojnicích ohledně podrobného složení a dalších charakteristikách kvality mléka je obtížné (Hallén a kol., 2008).

5.2 Genetický polymorfismus

Polymorfismus znamená přítomnost dvou a více genetických variant vedoucích k výskytu několika forem znaku v jedné populaci či druhu. Pokud je frekvence diskontinuálních forem v rámci druhu příliš vysoká, aby mohla být vysvětlena mutací, změna je považována za polymorfni. Stejně tak je nazývána i samotná populace, která tuto rozdílnost vykazuje (Bull, 2013).

Obecně se polymorfismus od mutace liší již zmíněnou frekvencí v populaci, která pro polymorfismus musí být vyšší než 1%. Dalším aspektem je efekt, kdy polymorfismus sice může být spojován s nemocí, ale na rozdíl od mutace není pro jedince letální (Karki a kol., 2015).

Genetický polymorfismus se vyskytuje jak v intronech, tak i v exonech genomu. Většina polymorfismů je uložena v nekódující části a nemění expresi genů ani nevytváří různé fenotypové varianty. Takto se projevuje pouze, je-li přítomný v kódující části genomu (Bonfatti a kol., 2011). Je však dokázáno, že na výsledné struktuře mléčného proteinu se podílí kromě účinků polymorfismu v kódující části genu také polymorfismus v oblasti intronu tím, že ovlivňuje transkripci proteinu (Hallén a kol., 2008).

Genetický polymorfismus většinou přetrvává po mnoho generací, protože žádná z variant nemá z hlediska přirozeného výběru celkovou výhodu nebo nevýhodu. Některé polymorfismy nemají žádné viditelné projevy a vyžadují biochemické techniky k identifikaci rozdílů, které se vyskytují mezi chromozomy, bílkovinami nebo DNA různých forem. Při mapování polohy genů na chromozomu pak může být polymorfismus využit ve formě genetického markeru (Bonfatti a kol., 2011; Karki a kol., 2015).

Polymorfismus mléčných proteinů má vliv na složení mléčných bílkovin, koagulační vlastnosti mléka a na změny v relativní koncentraci frakcí mléčných proteinů. To dokazuje efekt genetického polymorfismu na technologické vlastnosti mléka a následně i celkovou výtěžnost sýrů. Z tohoto důvodu probíhají výzkumy různých polymorfismů mléčných bílkovin založené na selektivním chovu (Bonfatti a kol., 2011).

5.3 Kandidátní gen

Jako kandidátní je označen jakýkoli gen, který obsahuje alely ovlivňující kvantitativní vlastnosti a jeho efekt na určitou produkční vlastnost je ekonomicky významný. Dříve byly jako kandidátní lokusy pojmenovávány pouze takové části genomu, u nichž bylo podezření, že souvisejí s konkrétním onemocněním, poruchou zdraví nebo stavem jedince (Hale a kol., 2005).

Nyní platí, že kandidátní gen je lokalizován v určité oblasti chromozomu, která je spojována s vlivem při projevu onemocnění nebo přispívá ke komplexnímu fenotypu jedince s účinkem na významné kvantitativní znaky. K určení kandidátního genu dochází, pokud jsou tyto geny součástí oblasti chromozomu, kde se vyskytuje známá mutace, která vede k obzvláště těžkému či časnému nástupu nemoci. Kandidátní gen může být identifikován i pomocí znalostí částí genomu, které ovlivňují výsledný fenotyp (Rebbeck a kol., 2004; Rédei, 2008).

Kandidátní geny lze identifikovat na základě polohy nebo funkce. Pozitivní kandidátní gen se nachází v chromozomální oblasti, u které je podezření na spojitost s danou vlastností. Funkční kandidátní gen je takový, který kóduje produkt spojený s produktivní vlastností (Hale a kol., 2005).

Studie kandidátních genů se tedy běžně používají k posouzení, zda je u jedinců s ekonomicky významným kvantitativním znakem přítomen testovací genetický marker (obvykle SNP) s vyšší frekvencí, než u fenotypově odlišných jedinců (Rédei, 2008). Kandidátní geny jsou vybrány buď na základě jejich funkčního významu nebo jejich umístění v rámci chromozomálních oblastí, jež jsou zapojeny do vazebných studií. Nejprve se provede sekvenace genomu a po nalezení polymorfismu nebo mutace následuje tzv. asociační analýza, pomocí které se vyhodnotí možnost a případně i míra vlivu genu na určitý znak (Zhu a Zhao, 2007).

V dnešní době již existují databáze kandidátních genů pro jednotlivé druhy zvířat a kvantitativní vlastnosti.

5.4 Lokusy kvantitativních znaků

Lokus kvantitativních znaků (QTL = Quantitative Trait Locus) je úsek genomu, který má vliv na kvantitativní znak (Foss a kol., 2007). Můžeme tak nazývat jakoukoli oblast DNA, ať už jeden gen nebo i specifickou část chromozomu. Analýza lokusů kvantitativních znaků je statistická metoda, která propojuje dva typy informačních dat. Prvním typem jsou fenotypová data (většinou měřené vlastnosti) a druhým jsou genotypová data. Ve výzkumu je poté hlavní snahou vysvětlit genetický základ variability daných kvantitativních znaků. Cílem výzkumu QTL je identifikovat interakci a přesnou polohu těchto regionů v genomu (Miles a Wayne, 2008).

Geny QTL oblastí jsou ovlivněny často vlivy prostředí a heritabilita se pohybuje v rozmezí od 5 do 50 %. Při výzkumu lokusu kvantitativních znaků se používají genetické markery (Foss a kol., 2007).

5.5 Genetické markery

Pod pojmem genetický marker se rozumí fenotypový znak, gen nebo specifický krátký úsek genomu. Podmínkou ovšem je, aby byl tento úsek DNA jasně a snadno lokalizovatelný, jelikož díky genetickému markeru lze následně identifikovat pozici neznámého genu (Raya a kol., 2002).

Tyto sekvence DNA se známým umístěním na chromozomu dávají základy pro asociační a vazebné studie (Raya a kol., 2002). Používají se pro sledování dědičnosti nedalekého znaku, který dosud nebyl identifikován, ale jehož přibližná poloha je známa nebo pro odhad příbuznosti mezi jedinci. Používá se několik typů markerů, včetně jednonukleových polymorfismů (SNP), minisatelitů a mikrosatelitů či polymorfismů délky restričních fragmentů (RFLP) (Foss a kol., 2007).

DNA markery se dají dělit dle charakteru polymorfismu na RFLP, polymorfismus v délce sekvence (SSLP), kam patří minisatelity a mikrosatelity a posledním typem

genetického markeru dle charakteru polymorfismu je SNP neboli jednobodový polymorfismus (Raya a kol., 2002).

Další rozdělení markerů je dělení dle využití v mapování genomu. Zde jsou také 3 typy markerů. První jsou markery kódující exprimované geny, druhým typem jsou vysoce variabilní sekvence DNA a poslední typ jsou SNP. Mezi markery kódující exprimované geny patří kandidátní geny pro QTL a jejich významné použití je v komparativním (srovnávacím) mapování. U druhého typu se využívají především mini a mikrosatelity v populačním výzkumu, při studiích paternity a při vazbovém mapování genů. Poslední typ SNP je využitelný také v populačních studiích (Knoll a Vykoukalová, 2002).

5.6 Asociační studie

V genetice je velmi důležitou metodou tzv. asociační analýza, která zkoumá soubor genetických variant určitého počtu jedinců a jejich možné spojení s některými vlastnostmi. Obvykle jsou tyto metody zaměřeny na asociaci mezi SNP a znaky, které jsou ekonomicky významné. Stejně tak mohou být aplikovány na jakoukoli jinou vlastnost (Rédei, 2008; Bush a Moore, 2012).

Nejprve jsou pro tuto studii vybráni jedinci s různým fenotypem pro určitý rys, různým projevem znaku či vlastnosti. Pro výzkum je lepší zkoumat větší populaci s poměrně velkou genetickou variabilitou v tomto znaku (Manolio, 2010). Následuje analýza DNA vzorků a jejich porovnávání. Pokud se jedna alela, genotyp či haplotyp vyskytuje u jedinců s určitým fenotypem častěji, automaticky se předpokládá, že tato genetická varianta má spojitost se zkoumaným znakem (Bush a Moore, 2012).

Následující pasáž **Materiál a laboratorní analýzy** o rozsahu 5 stran je vypuštěna z důvodu budoucí publikace těchto dat v odborné literatuře a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

Následující pasáž **Výsledky a diskuze** o rozsahu 8 stran je vypuštěna z důvodu budoucí publikace těchto dat v odborné literatuře a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

Následující pasáž **Závěr** o rozsahu 1 strany je vypuštěna z důvodu budoucí publikace těchto dat v odborné literatuře a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

9. Seznam zkratek

Asn – asparagin

BCM7 – betacasomorphin 7

BCN – betacasein; betakasein

DNA – deoxyribonucleid acid; deoxyribonukleová kyselina

E₃₀ – pevnost sýřeniny

EtBr – ethidium bromid

EYE – vizuální metoda stanovení syřitelnosti

Glu - glutamin

Gly – glycin

Ile – izoleucin

Leu – leucin

NaOH – hydroxid sodný

NK – nukleová kyselina

PCR – polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce

Phe - fenylalanin

Pro – prolin

QTL – quantitative traits locus; lokusy kvantitativních znaků

RCT – rennet coagulation time; čas sýření

RFLP – restriction fragment length polymorphism; polymorfismus délky restrikčních fragmentů

RNA – ribonucleid acid; ribonukleová kyselina

SH – Soxhlet-Henkel

SNP – single nucleotide polymorphism; jednonukleotidový polymorfismus

SSLP – simple sequence length polymorphism; polymorfismus v délce sekvence

Tyr – tyrosin

Val – valin

10. Seznam použité literatury

- Amigo, L., Recio, I., Ramos, M. (2000). Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk - a review. *International Dairy Journal* 10: 135-149.
- Antoniou, A., Herlem, G., André, C., Guillaume, Y. a Gharbi, T. (2011). Simple method for detection of extremely diluted anti beta-casein antibodies from glass bead based receptors. *Talanta*, 84: 632–637.
- Belitz, I. H. D., & Grosch, I. W. (2004). Milk and dairy products. In *Food chemistry* (pp. 505-550). Springer Berlin Heidelberg.
- Bittante, G., Penasa, M. a Cecchinato, A. (2012). Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *Joufnal od Dairy Science*, 95 :6843–6870.
- Bonfatti, V., Martino, G. D., Cecchinato, A., Degano, L. a Carnier, P. (2010). Effects of β - κ -casein (*CSN2-CSN3*) haplotypes, β -lactoglobulin (*BLG*) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. *Joufnal of Dairy Science*, 93 :3809–3817.
- Bonfatti, V., Cecchinato, A., Gallo, L., Blasco, A. a Carnier, P. (2011). Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental cattle. *Joufnal of Dairy Science*. 94:5183-5193.
- Boudry, G., David, E. S., Douard, V., Monteiro, I. M., Huerou-Luron, I. L. a Ferraris, R. P. (2010). Role of Intestinal Transporters in Neonatal Nutrition: Carbohydrates, Proteins, Lipids, Minerals, and Vitamins. *JPGN* 2010;51: 380–401.
- Bovenhuis, H., Visker, M. H. P. W. a Lundén, A. (2013). Selection for milk fat and milk protein composition. *Advances in Animal Biosciences*, 4:3, pp 612–617.
- Brüssow, H. (2013). Nutrition, population growth and disease: a short history of lactose. *Environmental Microbiology*, 15(8), 2154–2161.
- Bull, L. (2013). Genetics, Mutations, and Polymorphisms. *Landes Bioscience*. dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6475/>.
- Bush, W. S. a Moore J. H. (2012). Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLOS Computational Biology*, (8) 12: e1002822.
- Caroli, A. M., Chessa, S. a Erhardt, G. J. (2009). Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Joufnal of Dairy Science*, 92 :5335–5352.
- Caroli, A. M., Savino, S., Bulgari, O. a Monti, E. (2016). Detecting β -Casein Variation in Bovine Milk. *Molecules*, 21, 141.

Cassandro, M., Dalvit, Ch., Zanetti, E., Marchi, M. D. a Zotto, R. D. (2007). Genetic aspects of milk coagulation properties in dairy cattle. *Italy of Animal Science*, ISSN 1330-714.

Cattaneo, S., Stuknyté, M., Pellegrino, L. a Noni, I. D. (2014). Targeted peptides for the quantitative evaluation of casein plasminolysis in drinking milk. *Food Chemistry*, 155: 179–185.

Cecchinato, A., Chessa, S., Ribeca, C., Cipolat-Gotet, C., Bobbo, T., Casellas, J. a Bittante, G. (2015). Genetic variation and effects of candidate-gene polymorphisms on coagulation properties, curd firmness modeling and acidity in milk from Brown Swiss cows. *Animal*, 9:7, pp 1104–1112.

Cecchinato, A., Penasa, M., Marchi, M. D., Gallo, L., Bittante, G. a Carnier, P. (2010). Genetic parameters of coagulation properties, milk yield, quality, and acidity estimated using coagulating and noncoagulating milk information in Brown Swiss and Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 94:4205-4213.

Comin, A., Cassandro, M., Ojala, M. a Bittante, G. (2008). Effect of β - and κ - casein genotypes on milk coagulation properties, milk production and content, and milk quality traits in Italian Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91(10):4022-4027.

Davidson, E. H. (2001). Genomic Regulatory Systems: in Development and Evolution. *Elsevier Science (USA)*, ISBN 0-12-205351-6.

Deth, R., Clarke, A., Ni, J. a Trivedi, M. (2016). Clinical evaluation of glutathione concentrations after consumption of milk containing different subtypes of β -casein: results from a randomized, cross-over clinical trial. *Nutrition Journal*, 15:82.

Elsik, Ch. G., Unni, D. R., Diesh, C. M, Tayal, A., Emery, H. N. N. a Hagen, D. E. (2016). Bovine Genome Database: new tools for gleaning function from the *Bos taurus* genome. *Nucleic Acids Research*, 44: 834-839.

Elwood, P. C., Pickering, J. E., Givens, D. I., Gallacher, J. E. (2010). The Consumption of Milk and Dairy Foods and the Incidence of Vascular Disease and Diabetes: An Overview of the Evidence. *Lipids*, 45:925–939, DOI 10.1007/s11745-010-3412-5.

Elzoghby, A. O., El-Fotoh, W. S. A. a Elgindy, N. A. (2011). Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 153:206–216.

Esmaili, M., Ghaffari, S. M., Moosavi-Movahedi, Z., Atri, M. S., Sharifzadeh, A., Farhadi, M., Yousefi, R., Chobert, J. M., Haertlé, T. a Moosavi-Movahedi, A. A. (2011). Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 2166e2172.

Faizullin, D. A., Konnova, T. A., Haertlé, T. a Zuev, Y. F. (2017). Secondary structure and colloidal stability of beta-casein in microheterogeneous water-ethanol solutions. *Food Hydrocolloids*, 63: 349e355.

Farrell, H. M., Jimenez-Fores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hangm K. F. a Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk-Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87:1641–1674.

Foss, E. J., Radulovic, D., Shaffer, S. A., Ruderfer, D. M., Bedalov, A., Goodlett, D. R. a Kruglyak, L. (2007). Genetic basis of proteome variation in yeast. *Nature Genetics*, 39:1369-1375.

Fox, P. F. a McSweeney, P. L. H. (2003). Advanced dairy chemistry- Proteins. *Springer Science + Business Media*, ISBN 978-0-306-47271-8.

Gajdůšek, S. (2003). Laktologie. Brno: MZLU, ISBN 80-7157-657-3.

Gellrich, K., Meyer, H. H. D. a Wiedemann, S. (2014). Composition of major proteins in cow milk differing in mean protein concentration during the first 155 days of lactation and the influence of season as well as shortterm restricted feeding in early and mid-lactation. *Journal of Animal Science*, 59, 2014 (3): 97–106.

Gill, H. S., Doull, F., Rutherford, K. J. a Cross, M. L. (2000). Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 84, Suppl. 1, S111±S117.

Gregersen, V. R., Gustavsson, F., Glantz, M., Christensen, O. F., Stalhammar, H., Andrén, A., Lindmark-Mansson, H., Poulsen, N. A., Larsen, L. B., Paulsson, M., Bendixen, C. (2015). Bovine chromosomal regions affecting rheological traits in rennet-induced skim milk gels. *Journal of Dairy Science*, 98:1261-1272.

Hale, W. G., Saunders, V. A. a Margham, J. P. (2005). Collins dictionary of biology. *London: Collins*, 518 p, ISBN: 07207344 9780007207343.

Hallén, E., Wedholm, A., Andrén, A., & Lundén, A. (2008). Effect of β -casein, κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. *Journal of Animal Breeding and genetics*, 125(2), 119-129.

Hayes, B. J., Chamberlain, B. A. J. a Goddard, M. E. (2009). Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *J. Dairy Sci.* 92:433–443.

Heck, J. M. L., Schennink, A., Valenberg, H. J. F., Bovenhuis, H., Visker, M. H. P. W., Arendonk, J. A. M. a Hooijdonk, A. C. M. (2009). Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 92:1192-1202.

Ho, S., Woodford, K., Kukuljan, S. a Pal, S. (2014). Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study. *Journal of Clinical Nutrition*, 68: 994–1000.

Holt, C., Carver, J. A., Ecroyd, H., Thorn, D. C. (2013). Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*, 96 (10), 6127-6146.

Huang, W., Penagaricano, F., Ahmad, K. R., Lucey, J. A., Weigel, K. A. a Khalib, H. (2012). Association between milk protein gene variants and protein composition traits in dairy cattle. *Journal of dairy Science*, 95: 440-449.

Chandan, R. C. (2007). Milk Composition, Physical and Processing Characteristics, in Handbook of Food Products Manufacturing (ed Y. H. Hui), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470113554.ch64 3.

Chen, R. A. J., Down, T. A., Stempor, P., Chen, Q. B., Egelhofer, T. A., Hillier, L. W., Jeffers, T. E. a Ahringer, J. (2013). The landscape of RNA polymerase II transcription initiation in *C. elegans* reveals promoter and enhancer architectures. *Genome Research*, 23: 1339-1347.

Chessa, S., Bulgari, O., Rossoni, A., Ceriotti, G. a Caroli, A. M. (2013). Bovine β -casein: Detection of two single nucleotide polymorphisms by bidirectional allele specific polymerase chain reaction (BAS-PCR) and monitoring of their variation. *Journal of Animal Sciences*, Vol.3, No.1, 36-41.

Chessa, S., Bulgari, O., Rizzi, R., Calamari, L., Bani, P., Biffani, S. a Caroli, A. M. (2014). Selection for milk coagulation properties predicted by Fourier transform infrared spectroscopy in the Italian Holstein-Friesian breed. *Journal of Dairy Sciences*, 97 :4512–4521.

Ikonen, T., Morri, S., Tyrisevä, A. M., Ruottinen, O., a Ojala, M. (2004). Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content, and pH of milk. *Journal of Dairy Science*, 87(2): 458-467.

Iwaniak, A. a Minkiewicz, P. (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Sci. Pol.*, 6(3): 5-15.

Jaiswal, K. P. a Sarsavan, A. (2013). In silico analysis of Single Nucleotide Polymorphism's (SNP's) in Karan Fries cattle of A1, A2 beta casein gene. *International Journal of Environment & Animal Conservation*, 02:-01.

Jaiswal, K. P. a Sarsavan A. (2014). Review on bovine beta-casein (A1, A2) gene polymorphism and their potentially hazardous on human health. *International Journal of Environment & Animal Conservation*, 03:-01.

Jann, O., Ceriotti, G., Caroli, A. a Erhardt, G. (2002). A new variant in exon VII of bovine b-casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds. *Journal Animal Breed. Genet*, 119: 65-68.

Jianqin, S., Leiming, X., Lu, X., Yelland, G. W., Ni, J. a Clarke, A. J. (2016). Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein

proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. *Nutrition Journal*, 15:35.

Kaminski, S., Cieślińska, A. a Kostyra, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal Appl Genet*, 48(3), pp. 189–198.

Karki, R., Pandya D., Elston, R. C. a Ferlini, C. (2015). Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics*. 8:37.

Knoll, A. a Vykoukalová, Z. (2002). Molekulární genetika zvířat: metody detekce polymorfizmů DNA genů. *Brno, Mendelova univerzita*, ISBN 80-715-7616-6.

Kořínek, M. (2000). Velká kniha pro chovatele savců. Olomouc: Rubico. *Knížka pro každého (Rubico)*, ISBN 80-85839-52-0.

Kostyra, E., Sienkiewicz-Szlapka, E., Jarmolowska, B., Krawczuk, S. a Kostyra, H. (2004). Opioid peptides derived from milk proteins. *Journal Food Nutr. Sci.*, 13/54, 25–35.

Kuciel, J. a Urban, T. (2016). Principy genetiky. 1. vydání. *Mendelova univerzita v Brně*, ISBN 978-80-7509-385-1.

Kučerová, J., Matějček, A., Jandurová, O. M., Sorensen, P., Němcová, E., Štípková, M., Kott, T., Bouška, J. a Frelich, J. (2006). Milk protein genes *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LGB* and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Journal of Animal Science*, 51, (6): 241–247.

Laible, G., Smolenski, G., Wheeler, T. a Brophy, B. (2016). Increased gene dosage for β - and κ -casein in transgenic cattle improves milk composition through complex effects. *Scientific RepoRts*, 6:37607, DOI: 10.1038/srep37607.

Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15: 73–83.

Lynch, M. (2006). The Origins of Eukaryotic Gene Structure, *Molecular Biology and Evolution*, 23: 450–468.

Manolio, T. A. (2010). Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *New England Journal of Medicine*. 363:166-176.

Marchi, M. D., Bittante, G., Zotto, R. D., Dalvit, C. a Cassandro, M. (2008). effect of Holstein Friesian and brown Swiss breeds on Quality of milk and cheese. *Journal of Dairy Science*, 91:4092-4102.

McLachlan, S. (2006). Breeding and milking cows for milk free of β -casein A1. *Continuation-inpart of application*. 09:906,614.

Miles, C. M. a Wayne, M. (2008). Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education*, 1(1):208.

Miller, N., Delbecchi, L., Petitchere, D., Wagner, G. F., Talbot, B. G. a Lacasse, P. (2006). Effect of Stage of Lactation and Parity on Mammary Gland Cell Renewal. *Journal of Dairy Science*, 89:4669–4677.

Miluchová, M., Trakovická, A. a Gábor, M. (2009). Analysis of polymorphism of alpha S1 casein of slovak pinzgau cattle by PCR-RFLP. *Zootehnie și Biotehnologii*, vol. 42 (2).

Molee, A., Boonek L. a Rungsakinin N. (2011). The effect of beta and kappa casein genes on milk yield and milk composition in different percentages of Holstein in crossbred dairy cattle. *Animal Science Journal*, 82:512-516 (4).

Moran, C. A., Morlacchini, M., Keegan, J. D. a Fusconi, G. (2017). The effect of dietary supplementation with *Aurantiochytrium limacinum* on lactating dairy cows in terms of animal health, productivity and milk composition. *Journal of Anim Physiol Anim Nutr.*;1–15.

NCBI (2016): Resources Genome – *Bos taurus* (cattle) U.S National Library of Medicine [online]: National Center for Biotechnology Information – Genome. Dostupný na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=bos%20taurus> >.

Nilsen, H., Olsen, H. G., Hayes, B., Sehested, E., Svendsen, M., Nome, T., Meuwissen, T. a Lien, S. (2009). Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle. *Genetics Selection Evolution*, 41:24.

O'Mahony, J. A., Smith, K. E. a Lucey, J. A. (2014). Purification of Beta Casein from milk. *Journal of Sci. Appl.No.:* 11/272,331.

Pärna, E., Kaart, T., Kiiman, H., Bulitka, T. a Viinalass, H. (2012). Milk Protein Genotype Associations with Milk Coagulation and Quality Traits. *Agricultural and Biological Sciences*, 10.5772/29123.

Poulsen, N. A., Buitenhuis, A. J. a Larsen, L. B. (2014). Phenotypic and genetic associations of milk traits with milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 98:1-9.

Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Sameen, A., Mukhtar, O. a Khan, M. I. (2016). Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. *Journal of Animal Sciences*, Vol. 29, No. 7 : 1022-1028.

Raya, L. G., Olsen, H. G., Lingaas, F., Klungland, H., Vage, D. I., Olsaker, I., Talle, S. B., Aasland, M. a Lien, S. (2002). The use of genetic markers to measure genomic response to selection in livestock. *Genetics Society of America*, 162:1381-1388.

Rebeck, T. R., Spitz, M. a Wu, X. (2004). Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nature Reviews Genetics*, 5:589-597.

Rédei, G. P. (2008). Encyklopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informaics. *Woodbine Ct. Columbia*, ISBN: 978-1-4020-6754-9.

Rice, B. H., Quann, E. E. a Miller G. D. (2013). Meeting and exceeding dairy recommendations: effects of dairy consumption on nutrient intakes and risk of chronic disease. *Nutrition Reviews®* Vol. 71(4):209–223.

Rijnkels, M. (2002). Multispecies Comparison of the Casein Gene Loci and Evolution of Casein Gene Family. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7: 3, 1083-3021/02/0700.

Roginski, H., Fuquay, J. a Fox, P. (2003). Encyclopedia of dairy sciences. *Academic Press, London*, eBook ISBN:9780080917931.

Samková, E. (2012). Mléko: produkce kvalita: Milk: production and quality : vědecká monografie. *České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta*. ISBN 978-80-7394-383-7.

Sharma, N., Sharma, V., Nautiyal, S. Ch., Singh, P. R., Kushwaha, R. S., Sailwal, S., Ghosh, S., Naushad, A. a Singh, R. K. (2012). A1, A2 BETA CASEIN VARIANTS IN COWS – ITS IMPACT ON MODERN HUMAN HEALTH. *Molecular Research Laboratory*, 4: 2249-2496.

Siebel, J. R., Molitor, M. S. a Lucey, J. A. (2015). Properties of casein concentrates containing various levels of beta-casein. *International Journal of Dairy Technology*, 10.1111/1471-0307.12170.

Singh, G. M., Micha, R., Khatibzadeh, S., Shi, P., Lim, S., Andrews, K. G., Engell, R. E., Ezzati, M., Mozaffarian, D. (2015). Global, Regional, and National Consumption of Sugar-Sweetened Beverages, Fruit Juices, and Milk: A Systematic Assessment of Beverage Intake in 187 Countries. *PLoS ONE* 10(8): e0124845. doi:10.1371/journal.pone.0124845.

Sodhi, M., Mukesh, M., Kataria, R. S., Mishra, B. P. a Joshii, B. K. (2012). Milk proteins and human health: A1/A2 milk hypothesis. *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16:5.

Sun, Q., Ma, J., Campos, H. a Hu, F. B. (2007). Plasma and erythrocyte biomarkers of dairy fat intake and risk of ischemic heart disease. *Am J Clin Nutr*;86:929–37.

Tančin, V. (2013). Fyziológia reflexu ejekcie mlieka kráv. *Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*. ISBN 978-80-552-1030-8.

Teschemacher, H. (2003). Opioid Receptor Ligands Derived from Food Proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 9:1331-1344.

Thompson, A., Boland, M. a Singh, H. (2009). Milk Proteins: From Expression to Food. *American Journal of Human Biology*, 21:852–860.

Truswell, A. (2005). The A2 milk case: a critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59, 623–631.

Tyriseva, A. M. (2008). Options for selecting dairy cattle for milk coagulation ability. *Helsinki Viikinkaari*, ISBN 978-952-10-3692-7.

Ul Haq, M. R., Kapila, R., Sharma, R., Saliganti, V., Kapila, S. (2014). Comparative evaluation of cow beta-casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. *Eur J Nutr*.;53:1039–49.

Vallas, M., Bovenhuls, H., Kaart, T., Parna, K., Kiiman, H. a Parna, E. (2010). Genetic parameters for milk coagulation properties in estonian Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 93:3789-3796.

Vincent, S. T., Momoh, O. M. a Yakubu, A. (2014). Bioinformatics analysis of beta-casein gene in some selected mammalian species. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.*, 4(10): 564-570.

Visker, M. H. P. W., Dibbits, B. W., Kinders, S. M., Valenberg, H. J. F., Arendok, J. A. M. a Bovenhuis, H. (2010). Association of bovine b-casein protein variant I with milk production and milk protein composition. *Animal Genetics*, 42: 212–218.

Zhang, X., Fu, X., Zhang, H., Liu, Ch., Jiao, W. a Chang, Z. (2005). Chaperone-like activity of β -casein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 1232–1240.

Zhu, M. a Zhao, S. (2007). Candidate gene identification approach: progres and challenges. *International Journal of Biological Sciences*, 3(7):420-427.

Zimin, A. V., Delcher, A. L., Florea, L., Kelley, D. R., Schatz, M. C., Puiu, D., Hanrahan, F., Pertea, G., Tassell, C. P., Sonstegard, T. S., Marcais, G., Roberts, M., Subramanian, P., Yorke, J. A. a Salzberg, S. L. (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology*, 10(4):R42.