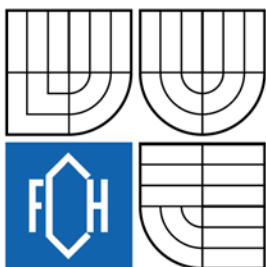


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF

ZMĚNY VE SLOŽENÍ MLÉKA PO DOTACI DOJNIC VYBRANÝM ADITIVEM

MILK COMPOSITION CHANGES AFTER FORTIFICATION COW FEED WITH SELECTED
ADDITIVE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

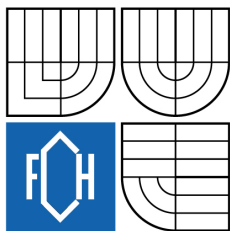
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. Michaela Tůmová

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

MGR. ING. LUDMILA KŘÍŽOVÁ, PH.D.

BRNO 2009



Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0262/2008	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Michaela Tůmová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce:	Mgr. Ing. Ludmila Křížová, Ph.D.	
Konzultanti diplomové práce:	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Změny ve složení mléka po dotaci dojnic vybraným aditivem

Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Literární přehled k dané problematice
- 2) Popis použité metody stanovení

Experimentální část:

- 1) Ověření zvolené metody stanovení na standardech
- 2) Analýzy vzorků mléka
- 3) Zpracování získaných výsledků a jejich zhodnocení formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 4.1.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Michaela Tůmová
Student(ka)

Mgr. Ing. Ludmila Křížová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá vlivem doplňku limitující aminokyseliny histidinu, podané ve formě duodenální infuze na množství a složení kravského mléka vysokoprodukčních dojnic.

V teoretické části této práce je popsáno složení kravského mléka a metabolismus živin u skotu. V této části jsou také popsány nároky vysokoprodukčních dojnic na esenciální aminokyseliny. Jsou zde uvedeny principy analytických metod, které byly použity pro rozbor mléka. Pro stanovení základních složek mléka byla použita infračervená absorpční spektrometrie a enzymaticko-konduktometrická metoda. Aminokyselinový profil kaseinu byl stanoven pomocí iontově výměnné kapalinové chromatografie.

V experimentální části práce je uvedena metodika pokusu na dojnících. Je zde podrobně rozepsán postup kyselé a oxidativně-kyselé hydrolyzy lyofilizovaného kaseinu a postup stanovení aminokyselin v těchto hydrolyzátech. Výsledky analýz byly statisticky vyhodnoceny, popsány a diskutovány s literárními zdroji.

Tato diplomová práce vznikla na základě spolupráce mezi Ústavem chemie potravin a biotechnologií Fakulty chemické, Vysokého učení technického v Brně a Výzkumným ústavem pro chov skotu, s.r.o., Oddělení výživy zvířat a kvality živočišných produktů v Pohorelicích.

ABSTRACT

This thesis is dealing with effect of supplement limiting aminoacid histidin, that was applied as duodenal infusion, on yield and composition of high production dairy cows milk.

The theoretical part describes overview about milk composition and metabolism of dairy cows. There are described nutrition requirements of dairy cows for essential aminoacids. In this part are also presented principles of analytical methods used for analysis of milk. For determination of basic components of milk were used infrared spectroscopy and enzymatic-conductometry. Aminoacid profile of casein was determined by ion exchange liquid chromatography.

In the experimental part is described method of experiment. There is described technique of acid and oxidative hydrolysis of lyophilized casein and technique of determination aminoacids in this hydrolyzated casein. Results of analysis were interpreted and discussed with literature.

This diploma thesis was made as a cooperation between the Institute of Food Science and Biotechnology, the Faculty of Chemistry, University of Technology, Brno and the Research Institute for Cattle Breeding, Department of Animal Physiology and Nutrition, Pohorelice.

KLÍČOVÁ SLOVA

kravské mléko, výživa dojnic, aminokyseliny, iontově-výměnná kapalinová chromatografie

KEYWORDS

bovine milk, nutrition of dairy cows, aminoacids, ion exchange liquid chromatography

Tůmová, M.: *Změny ve složení kravského mléka po dotaci dojníc vybraným aditivem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 54 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Ing. Ludmila Křížová, PhD..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Děkuji svojí rodině a svým blízkým za podporu při psaní této diplomové práce. Také děkuji Ing. Alešovi Veselému za praktické rady a vstřícný přístup při provádění analýz.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Složení kravského mléka.....	8
2.1.1 Voda	8
2.1.2 Sušina	8
2.1.3 Plyny.....	8
2.1.4 Dusíkaté látky.....	8
2.1.5 Kaseiny.....	9
2.1.6 Syrovátkové bílkoviny	11
2.1.7 Nebílkovinné dusíkaté látky.....	12
2.1.8 Mléčný tuk.....	13
2.1.9 Sacharidy	14
2.1.10 Minerální látky a soli.....	15
2.1.11 Vitamíny.....	15
2.1.12 Enzymy mléka.....	15
2.2. Problematika výživy dojnic.....	15
2.2.1 Bachorový ekosystém	16
2.2.2 Trávení sacharidů u skotu	17
2.2.3 Trávení lipidů u skotu	17
2.2.4 Trávení proteinů a dusíkový metabolismus u skotu.....	17
2.3 Nároky na proteinovou výživu vysokoprodukčních dojnic	20
2.3.1 Esenciální aminokyseliny u skotu	20
2.3.2 Vliv přídavku esenciálních aminokyselin na množství a kvalitu mléka	22
2.3.3 Chráněné formy aminokyselin	23
2.3.4 Odezvy na doplňky esenciálních aminokyselin u skotu.....	24
2.4 Analytické metody použité pro rozbor mléka	24
2.4.1 Infračervená absorpční spektroskopie	24
2.4.2 Enzymaticko-konduktometrická metoda.....	26
2.4.3 Iontoměničová chromatografie	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1 Uspořádání pokusu, krmení zvířat	30
3.2 Odběry, zpracování a analýzy vzorků	31
3.3 Stanovení aminokyselin v kaseinu	32
3.3.1 Používané přístroje.....	32
3.3.2 Používané pomůcky	32
3.3.3 Chemikálie	32
3.3.4 Vzorky.....	32
3.3.5. Použité pracovní postupy	33
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	36
4.1 Mléčná užitkovost a obsah jednotlivých složek mléka	36
4.2 Stanovení aminokyselinového profilu kaseinu	38
4.2.1 Analýza standardů aminokyselin	39
4.2.2 Analýza vzorků	42
4.2.3 Aminokyselinový profil kaseinu	45

5 ZÁVĚR.....	47
6 PŘÍLOHY.....	48

1 ÚVOD

Produkcí mléka vysokoprodukčních dojnic ovlivňují jak genetické faktory, tak faktory vnější, z nichž nejvýznamnější je výživa. Nedostatky ve výživě, spočívající v disproporcích mezi příjmem a výdejem jednotlivých živin, se projevují metabolickými poruchami a současně mají dopad na užitkovost dojnic a jakost mléka. [1]

Cílem této práce bylo zjistit, jak se projeví doplnění limitující aminokyseliny histidinu vysokoprodukčním dojnícím na množství a složení mléka.

Výživa přežvýkavců se od výživy monogastrických zvířat liší. To je dáno složitým, tak zvaným dvou fázovým systémem trávení, který předpokládá zajistit optimální skladbu krmné dávky pro správnou funkci bachorového ekosystému a zajištění živinové a energetické potřeby dojnice. [2]

Se zvyšující se mléčnou produkcí dojnic dochází stále více k rozporu mezi správnou výživou bachorových mikroorganismů a potřebami dojnice. Tento rozpor je dán tím, že v důsledku šlechtění krav na vysokou produkci se enormně změnila požadavky na zajištění energetických a živinových potřeb dojnic, zatímco složení bachorové mikroflóry se změnilo minimálně. [2] Následkem nedostatečné výživy klesá obsah bílkovin v mléce. Zejména klesá obsah kaseinu.

Mléčné bílkoviny jsou z výživového hlediska vysoce biologicky hodnotné. Kasein má v potravinářství nezastupitelné místo. Kaseiny se používají k výrobě sýrů nebo kaseinátů. Kaseináty se uplatňují jako potravinová aditiva. V potravinách jsou schopny vázat vodu, používají se také jako pěnotvorné a emulgační prostředky nebo k fortifikaci masných výrobků.

Krmiva pro vysokoprodukční dojnice, obsahující neplnohodnotné rostlinné proteiny, se obohacují esenciálními aminokyselinami. V současné době se již používá doplňování ruminálně chráněných forem methioninu při krmení krav kukuřičnou siláží. Při zkrmování chráněného methioninu lze zaznamenat zvýšenou produkci mléka a nárůst obsahu mléčné bílkoviny.

Pro vysokou užitkovost krav je potřeba identifikovat limitující esenciální aminokyseliny i u ostatních krmiv, což je zatím předmětem výzkumů. Podle současných studií je limitující aminokyselinou v silážích z trávy histidin.

Vyvážená krmiva jsou důležitá jak pro produkci mléka, tak i pro zdraví krav.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Složení kravského mléka

Syrové mléko je definováno v Kodexu alimentarius jako polydisperzní velmi složitý systém tvořený vodou a pevnými složkami (laktosa a minerálie v molekulární formě, mléčná bílkovina v koloidní disperzi a mléčný tuk v syrovém mléce ve formě emulze).[3]

Tabulka 2.1: Složení kravského mléka [3]

Složka mléka	Zastoupení %
Voda	max. 87,25
Sušina	12,75
laktosa	4,60 – 4,90
bílkoviny	2,80 – 3,60
mléčný tuk	3,20 – 6,00
minerálie	0,80 – 1,10
nebílkovinný dusík	0,015 – 0,029

2.1.1 Voda

Mléko obsahuje průměrně 87 až 88 % vody. Voda se vyskytuje ve formě volné, vázané na koloidy a chemicky vázané. Volná voda tvoří převážnou část vody v mléce. Je v ní rozpuštěna laktosa a minerální látky. [4]

Obsah vázané vody v mléce je 2 až 3,5 %. Je vázaná na koloidy a tvoří obaly na povrchu koloidních částic. Chemicky vázaná voda je velmi silně vázaná na laktosu. [1]

2.1.2 Sušina

Sušinu tvoří všechny složky, které zůstanou po vysušení při teplotě 103 až 105 °C do konstantní hmotnosti. Sušina tvoří 12 až 13 % hmotnosti mléka. Nejvíce jsou v sušině zastoupeny bílkoviny, tuk a laktosa, v menší míře minerální soli. [1]

2.1.3 Plyny

Čerstvě nadojené mléko obsahuje průměrně asi 8 obj. % plynů, z nichž je nejvíce zastoupen oxid uhličitý. Část plynů se do mléka dostává po styku se vzduchem (dusík, kyslík). Oxid uhličitý přechází do mléka pravděpodobně z krve. Ze všech plynů je v mléce nejméně žádoucí kyslík, jenž může být příčinou oxidačních procesů v mléce. [1]

2.1.4 Dusíkaté látky

Celkové bílkoviny (hrubé bílkoviny) mléka jsou tvořeny bílkovinami kaseinovými, syrovátkovými a frakcemi dusíkatých látek nebílkovinného původu (volné aminokyseliny, kyselina močová, amoniak, vitamíny skupiny B, kreatin, sulfokyanid, kyselina ortoová apod). [3] Z veškerého dusíku v mléce je v bílkovinách obsaženo v ideálním případě 93 až 95 %, zbývajících 5 až 7 % je obsaženo v nebílkovinných dusíkatých látkách. [4] V mléčné žláze je syntetizováno a dále vylučováno 6 hlavních mléčných bílkovin.

Jsou to kaseiny (alfa S1-kasein, alfa S2-kasein, beta-kasein, kappa-kasein) a syrovátkové bílkoviny (beta-laktoglobulin, alfa-laktalbumin). Prekurzorem mléčných bílkovin je kyselina propionová, která se vytváří během fermentace v bachoru. Ostatní bílkovinné frakce (bovinní sérový albumin a imunoglobuliny) přecházejí do mléka z krve. [3]

Všechny bílkoviny mléka jsou polymorfní, bylo u nich popsáno několik desítek genetických variant. Polymorfismus je způsobený delecí nebo substitucí jedné nebo více bází v nukleotidové sekvenci genu. [3,5]

Tabulka 2.2: Porovnání kaseinů a syrovátkových proteinů [5]

Kasein	Syrovátkové proteiny
obsahuje převážně hydrofobní oblasti	rovnováha mezi hydrofilními a hydrofobními zbytky
obsahuje málo cysteinu	obsahuje cystein a cystin
v sekundárním uspořádání převažuje náhodná spirálovitá struktura	globulární struktura převážně helikálního uspořádání
je teplotně stabilní	globulární struktura převážně helikálního uspořádání
nestabilní za kyselých podmínek	stabilní za mírně kyselých podmínek

2.1.5 Kaseiny

Kaseiny tvoří 72-78 % mléčných bílkovin. Kasein je syntetizován v ribozomech endoplazmatického retikula buněk mléčné žlázy. [3] Jedná se o komplex frakcí fosfoproteinů, u kterých je známá i aminokyselinová skladba a struktura. Kasein obsahuje značné množství prolinu, který způsobuje zlomy v řetězci proteinu a inhibuje vytvoření kompaktní struktury. Neobsahuje sulfidové můstky. Kaseiny mají velmi málo sekundární struktury a téměř žádnou terciární, takže je obtížné je denarovat. [4]

Základními frakcemi kaseinu jsou α_s , β -, κ - kasein, ostatní frakce kaseinu se považují za deriváty. [6] Všechny frakce mimo α -kasein jsou vysoce citlivé na přítomnost vápníku v mléce, κ - kasein chrání tyto frakce proti vysrážení. [7]

Klasifikace kaseinových frakcí

V současnosti jsou kaseinové frakce klasifikovány na základě jejich primární struktury. [3]

- Alfa_s-kaseiny (α -CN) jsou hlavní složkou kaseinové frakce. Mléčnou žlázou jsou syntetizovány α_{S1} -kaseiny a α_{S2} -kaseiny. Nejvíce zastoupenou frakcí je α_{S1} -kasein. Polypeptidový řetězec α_{S1} -kaseinu se skládá ze 199 aminokyselin. V přítomnosti vápenatých iontů tvoří nerozpustnou vápenatou sůl. Fragmenty α_{S1} -kaseinu se považují za λ -kasein. α_{S2} -kasein má podobnou strukturu jako α_{S1} -kasein, je však méně citlivý k přítomnosti vápenatých iontů než α_{S1} -kasein. [4,7]

- Beta-kasein (β -CN) je po α_S -CN druhý nejvíce zastoupený protein v mléce. Molekula β -CN se skládá celkem z 209 aminokyselin. [7] V porovnání s α_S -CN obsahuje méně fosforu. [3] S vápenatými ionty vytváří sůl rozpustnou při teplotách 1 °C a nižších, při vyšších teplotách tvoří nerozpustnou sůl. Za produkty degradace β -kaseinů proteolytickými enzymy mléka jsou považovány γ -kaseiny. [7]
- Kappa-kasein (κ -CN) se vyskytuje v podobě trimerů a vyšších oligomerů vzájemně spojených disulfidovými vazbami. [7] Primární struktura je tvořena 169 aminokyselinami. Jako jediná kaseinová frakce se nesráží vápenatými ionty. Je také jedinou frakcí, která obsahuje sirné aminokyseliny cystein a methionin. [3] Na rozdíl od předchozích kaseinů jsou v molekulách κ -kaseinů přítomny sacharidy D-galaktopyranosa, N-acetyl-D-galaktosamin a N-acetylneuraminová kyselina. Hlavní složkou κ -kaseinů je rozvětvený tetrasacharid (tvoří až 56 %). Cukry jsou na protein vázány glykosidovou vazbou prostřednictvím N-acetyl- β -D-galaktosaminu. [7]

Tabulka 2.3: Podíl jednotlivých frakcí na celkovém kaseinu [1]

Kaseinová frakce	Podíl %
α_{S1}	38,5
α_{S2}	10,5
β	36,5
κ	12,5
γ	2,0

Kolísání v poměru jednotlivých frakcí kaseinů u dojnic je dáno genetickými rozdíly. Jednotlivé frakce se navzájem liší nejen hodnotami poměrné molekulové hmotnosti, ale i elementárním složením, obsahem aminokyselin a hodnotami izoelektrického bodu. [1]

Kasein je v mléce vázán na vápník. Převážná část kaseinových frakcí je vázána do velkých koloidních útvarů, označovaných jako kaseinová micela. [4]

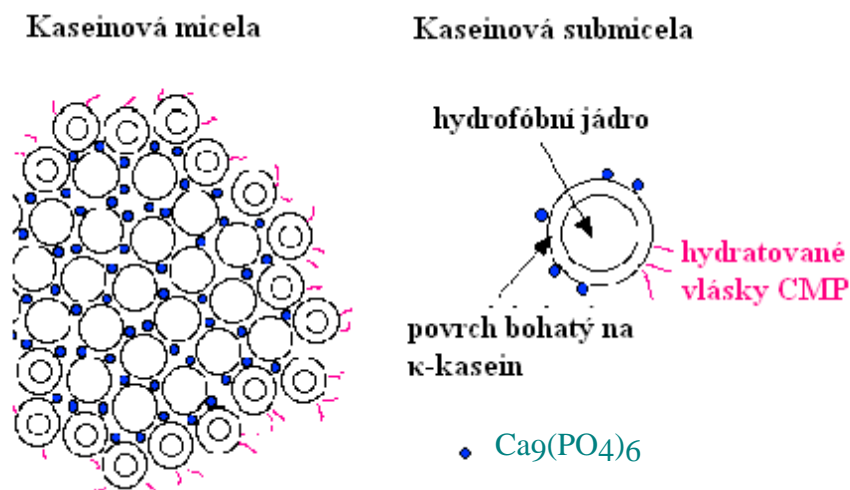
Kaseinové micely drží pohromadě díky vápenatým iontům a hydrofobním silám. Izoelektrický bod je 4,6. Při tomto pH je kasein nerozpustný, čehož se využívá při jeho izolaci. [6]

Jádro kaseinové micely je tvořeno převážně β -kaseiny, vápenatými a fosforečnými ionty. Hydrofobní části jsou směřovány dovnitř micely, na povrchu se nachází hydrofilní polární struktury. [3]

Povrchová vrstva micely je bohatá na γ -kaseinové makropeptidy. [3] Hydrofilní makropeptid tvoří vrstvu hydratovaných vlásků, které vyčnívají do vodní fáze, obklopující micelu. Tyto vlásky jsou odpovědné za prostorovou stabilizaci kaseinových micel. [1] Typická micela kravského mléka obsahuje asi 20 000 molekul kaseinů. Kromě kaseinů, kalcia a fosfátu obsahují micely ještě citrát, minoritní ionty, lipasy, plasmin. Průměr micel je 50 až 500 nm. Micely jsou tvořeny ze subjednotek (submicel) o velikosti 10 až 15 nm. [3]

Jednotlivé submicely se vzájemně spojují do micel prostřednictvím fosfoserinových skupin α_S a β -kaseinů (κ -kasein nemá v molekule vazebnou oblast) a vápenatých iontů. A to buď

přímo, nebo prostřednictvím volných fosfátů a citrátů. [7] V kaseinových submicelách kravského mléka je v průměru 49,6 % α -kaseinu, 37,3 % β -kaseinů a 13,1 % κ -kaseinu. [3]



CMP – κ -kaseinové makropeptidy

Obr. 2.1: Struktura kaseinové micely a submicely [8]

2.1.6 Syrovátkové bílkoviny

Jsou to proteiny, které zůstávají v roztoku po vysrážení kaseinů. V kravském mléce představují asi 17 až 20 % z čistých bílkovin. Základní syrovátkové proteiny jsou β -laktoglobulin, α -laktalbumin, sérový albumin, proteoso-peptony, a imunoglobuliny. [1]

Klasifikace syrovátkových bílkovin

- Betalaktoglobulin (β -LG) je nejvíce zastoupenou frakcí. Jeho polypeptidový řetězec je tvořen 162 aminokyselinami. [4] Vysoký obsah β -LG je v kolostru. [3] β -LG má schopnost vázat a přenášet vitamin A a schopnost vázat mastné kyseliny. Tato vlastnost souvisí s biologickou úlohou tohoto proteinu. Přenáší tyto substance novorozencům mláďatům. [9]
- Alfalaktalbumin (α -LA) je po β -LG druhou nejvíce zastoupenou syrovátkovou bílkovinou. Primární struktura je tvořena 123 aminokyselinami. α -LA má vysokou biologickou hodnotu, která je dána vysokým obsahem cystinu, tryptofanu a lysinu. [3] α -LA je také součástí enzymatického systému, který syntetizuje laktosu. [9]
- Imunoglobuliny v kravském mléce patří do čtyř skupin. Jsou to imunoglobuliny I_gG_1 , I_gG_2 , I_gM a I_gA . Převažují imunoglobuliny skupin I_gG a I_gM . [1] Tyto proteiny jsou

v mléce zastoupeny minoritně. Jsou to biologicky významné vysokomolekulární globulární glykoproteiny. [4] Jejich význam spočívá v obranném mechanismu proti infekcím mláďat, a proto jsou ve zvýšené koncentraci obsaženy v kolostru. [1]

Tabulka 2.4: Koncentrace imunoglobulinů v kravském mléce [1]

Typ imunoglobulinu	Kolostrum (mg.ml ⁻¹)	Zralé mléko (mg.ml ⁻¹)
IgG ₁	47,6	0,59
IgM	42,0	0,05
IgA	3,9	0,10
IgG ₂	2,9	0,20

- Sérový albumin je heterogenní bílkovina. Byla u ní prokázána imunologická totožnost s albuminem krevního séra. [1]
- Proteoso-peptony tvoří malý podíl bílkovin mléka. Jedná se o fosfoglykoproteiny, které jsou tepelně stálé do teploty 100 °C. [1]
- Ostatní bílkoviny – v mléce byla zjištěna přítomnost specifického proteinu makroglobulinu. Jeho zastoupení je minoritní. Tvoří příčné vazby mezi membránami tukových globulí a způsobuje jejich shlukování, které má za následek vznik vrstvy smetany na povrchu mléka. Záhřev na teplotu vyšší než 100 °C po dobu několika minut způsobuje jeho koagulaci a je prevencí vzniku vrstvy smetany na povrchu pasterovaného a jiným způsobem tepelně ošetřeného mléka. [4]

Tabulka 2.5: Zastoupení jednotlivých druhů syrovátkových proteinů v celkovém mléčném proteinu [1]

Druh proteinu	Podíl (%)	Původ
β-LG	7,0 – 14,0	mléčná žláza
α-LG	2,0 – 5,0	mléčná žláza
imunoglobuliny	2,0	krev
ostatní bílkoviny	1,0 – 1,5	mléčná žláza
sérový albumin	0,7-1,3	krev

2.1.7 Nebílkovinné dusíkaté látky

Po vysrážení všech bílkovin kyselinou trichloroctovou zůstává v roztoku ještě část dusíkatých látek, označovaných jako nebílkovinné dusíkaté látky. Jejich koncentrace v mléce je přibližně 250-300 mg N.l⁻¹, což představuje 5 - 6 % z celkového dusíku. Z hlediska jakosti mléka má největší význam močovina. Její obsah v mléce je variabilní a souvisí se stravitelností krmiva. [1] Z dalších nebílkovinných látek jsou v mléce přítomny volné aminokyseliny,

jednoduché peptidy, kyselina močová, kreatin, kreatinin, kyselina ortoová, nukleotidy, vitaminy skupiny B, amoniak. [4]

Tabulka 2.6: Obsah nebílkovinných dusíkatých látek v mléce [1]

Dusíkatá látka	Obsah (mg N.l⁻¹)
močovina	83,8
kyselina močová	22,8
kreatin	12,5
kreatinin	7,6
amoniak	6,7

2.1.8 Mléčný tuk

Základními složkami mléčného tuku jsou tri-, di-, a monoacylglyceroly, volné mastné kyseliny, fosfolipidy, steroly, estery sterolů. Z celkových lipidů mléka tvoří asi 98 % triacylglyceroly. V mléčném tuku byl identifikován velký počet mastných kyselin, převážná část z nich se však v mléce nachází v nízkých koncentracích nebo ve stopových množstvích. [4]

Z nasycených mastných kyselin tvoří největší podíl kyseliny s 14, 16 a 18 uhlíky, z nenasyčených kyselina olejová (C 18). Typickou vlastností mléčného tuku je vysoký podíl nízkomolekulárních mastných kyselin se 4, 6 a 8 uhlíky, které dávají mléčnému tuku typickou chuť a vůni. [1]

Převážná část mléčných lipidů se nachází v mléce ve formě tukových kuliček, které mají většinou průměr 2 až 3,5 μm. [4]

Tukové kuličky jsou obaleny membránou, která je bohatá na fosfolipidy. Membrána stabilizuje hydrofobní lipidy ve vodní fázi mléka. V membráně jsou umístěny fosfolipidy, cholesterol, některé enzymy a malé množství bílkoviny. [1] Na vnější straně fosfolipidové vrstvy jsou adsorbovány bílkoviny mléka (albumin, globulin, kasein). [4]

Z fosfolipidů se v mléce nachází lecitin, kefalín a sfingomyelin. V největším množství je zastoupen lecitin. [1] Všechny fosfolipidy jsou vysoce polární a povrchově aktivní. Přispívají ke stabilizaci tukové emulze v systému mléka. Při stloukání smetany přecházejí do podmáslí. [4]

Tabulka 2.7: Složení mléčného tuku [1]

Složka	Zastoupení %
triacylglyceroly	97 - 98
diacylglyceroly	0,3 - 0,6
monoacylglyceroly	0,02 – 0,04
volné mastné kyseliny	0,1 – 0,4
fosfolipidy	0,2 – 0,1

2.1.9 Sacharidy

V mléce se nacházejí: [1]

- monosacharidy – glukosa, galaktosa
- aminocukry – glukosamin, galaktosamin, kyselina neuraminová
- fosforečné estery sacharidů – glukoso-1-fosfát, glukoso-6-fosfát
- složené cukry – laktosa, laktulosa

Laktosa (*O-β-D-galaktopyranosyl-(1,4)-D-glukopyranosa*)

90 % všech sacharidů v mléce tvoří laktosa. [1] Laktosa je disacharid, je složená z molekuly D-glukosy a D-galaktosy. Má jednu volnou poloacetalovou skupinu a je proto redukcí cukrem. [10]

Laktosa existuje ve dvou isomerních formách, alfa a beta. Tyto formy se liší v konfiguraci hydroxylové skupiny na anomerním uhlíku molekuly glukosy. Ve vodném roztoku jsou formy alfa a beta v rovnováze. Při pokojové teplotě obsahuje vodný rovnovážný roztok laktosy přibližně 36 % α-laktosy 64 % β-laktosy. [11] Obě formy mají stejné chemické vlastnosti, fyzikálními vlastnostmi se liší. [12]

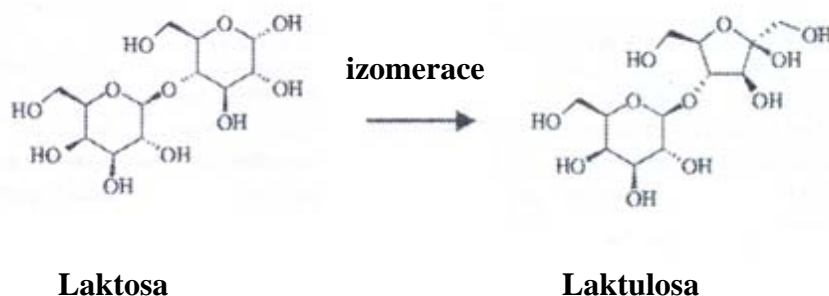
Laktosa se podílí na některých fyzikálních vlastnostech mléka jako je osmotický tlak, bod mraznutí a bod varu. Při teplotách nad 70 °C dochází ke slabému hnědnutí mléka v důsledku reakce laktosy s ε-aminoskupinami lysinu za tvorby melanoidů. [1]

Laktosa je jako redukcí disacharid citlivá na alkálie tzn., že snadno oxiduje. V důsledku silnějšího záhřevu (např. UHT mléko) epimerizuje na laktulosu. [3]

Laktulosa (*O-β-D-galaktopyranosyl-(1,4)-D-fruktofuranosa*)

Dalším významným disacharidem mléka je laktulosa. Laktulosa vzniká izomerací laktosy v alkalickém prostředí. Malá množství laktulosy se v mléce tvoří během tepelného záhřevu, a proto byla využívána jako indikátor tepelného ošetření mléka. [13]

Laktulosa je pro člověka nestravitelným sacharidem. [13] Je však metabolizována bifido- a acidofilními bakteriemi za vzniku kyseliny mléčné. V potravinářství se využívá jako prebiotikum tzn., že podporuje rozvoj bifidobakterií. Laktulosa má laxativní účinky, v medicíně se používá jako projímadlo. [14]



Obr. 2.2: Izomerace laktosy [13]

2.1.10 Minerální látky a soli

Minerální látky jsou do mléka přenášeny z krve. [3] Minerální látky jsou v mléce distribuovány ve fázi vodní a koloidní. Z makroelementů jsou přítomny draslík, sodík, vápník, hořčík, fosfor a chlor. Sodík, draslík, vápník a hořčík se nacházejí v mléce ve formě solí kyseliny fosforečné a citronové. Vápník a fosfor jsou přítomny ve vodní i v koloidní fázi. Jsou také vázány na kaseinový komplex. Chlor je přítomen ve formě solí, především KCl, NaCl a CaCl₂. [1]

Minerální látky a soli jsou důležitými součástmi puřovacího systému mléka. Spolu s laktosou podmiňují osmotický tlak mléka. Mají také vliv na bod mrznutí mléka a fyzikální stabilitu mléčných bílkovin, především kaseinátu. [1]

2.1.11 Vitamíny

V mléce se nacházejí vitamíny rozpustné v tucích i vitamíny rozpustné ve vodě.

- Vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E, K) jsou obsaženy v mléčném tuku. Jejich obsah je značně variabilní. [3]
- Vitamíny rozpustné ve vodě (B₁, B₂, kyselina askorbová, kyselina listová, vitamín B6 a další) jsou převážně syntetizovány bacherovou mikroflórou. Jejich obsah je poměrně stabilní. [3]

2.1.12 Enzymy mléka

Mléko obsahuje nativní enzymy pocházející z leukocytů a z buněk mléčné žlázy. Čerstvé kravské mléko od zdravých dojnic obsahuje enzymů málo, výrazné zvýšení v počtu i aktivitě enzymů je zjišťováno v mlezivu. [3] Enzymy se vyskytují v mléce ve vodní i tukové fázi a jako vázané na kasein. [1] Záhřevem mléka dochází k jejich denaturaci a inaktivaci. [3]

2.2. Problematika výživy dojnic

Nejvýznamnějším činitelem vnějšího prostředí, který ovlivňuje mléčnou produkci je výživa dojnic, a to nejen v množství, jakosti a skladbě, ale i ve zvolené technice krmení. Plnohodnotná, vyrovnaná výživa zaručuje při dané genetické výbavě zvířat maximální produkci mléka. [9]

Vliv výživy a krmení se projevuje jak na celkové produkci, tak i na obsahu jednotlivých složek mléka. Nedostatečná výživa způsobuje pokles obsahu bílkovin, z nichž klesá především obsah kaseinu. [15]

Přežvýkavci jsou závislí nejen na obsahu živin v krmné dávce, ale zejména také na průběhu fermentace těchto živin v předžaludcích. Symbióza mezi makroorganismem přežvýkavce a bacherovými mikroorganismy umožňuje získávání energie z rostlinných polysacharidů. [16]

Trávicí trakt skotu umožňuje využívat většinu látek obsažených v rostlinách. Hlavní fermentovatelné složky rostlinné hmoty jsou celulóza, škrob, hemicelulózy a pektin. Skot rostlinnou potravu nejprve fermentuje v předžaludcích a pak tráví ve slezu a tenkém střevě. Nestrávené zbytky znovu fermentuje ve slepém a tlustém střevě. [9]

Klíčové místo v procesu trávení zaujímá bacher, osídlený symbiotickou populací anaerobních mikroorganismů. Bacherové prostředí má parametry, které jsou ideální pro život mikroorganismů. Vyznačuje se anaerobiosou, stálou teplotou 39 °C, mírně kolísajícím

osmotickým tlakem a hodnotami pH zpravidla mezi 5,8 a 7,2. Stabilita pH je v bachoru udržována přísunem pufrujících látek slinami a odvodem kyselých fermentačních produktů bachorovou stěnou. [9]

2.2.1 Bachorový ekosystém

Bakterie

Bachorové bakterie jsou děleny do skupin podle substrátu, který využívají. [9]

Celulolytické bakterie mají pro trávení skotu největší význam. Tyto bakterie štěpí celulosu a hemicelulosu pomocí enzymu celulózy na glukosu, kterou pak metabolizují na těkavé mastné kyseliny. [17]

- Kyselina octová tvoří 55-75 % celkové produkce těkavých mastných kyselin. Kyselina octová je využívána mléčnou žlázou k syntéze mastných kyselin mléčného tuku. Kyselina octová je zdrojem energie pro tkáň. [2]
- Kyselina propionová je tříuhlíkatá těkavá mastná kyselina produkovaná ze škrobu, a pektinů. Hladina propionátu kolísá od 15 do 25 % z celkových těkavých mastných kyselin. [2] Játra využívají propionát k syntéze glukózy. Glukosa může vznikat v játrech i z aminokyselin. Dostatek propionátu proto šetří aminokyseliny. Glukosa je využívána v metabolismu a k syntéze laktosy mléka. [2]
- Kyselina mléčná je produkována v bachoru, ale je pohotově konvertována na propionát. [2]
- Kyselina máselná je čtyřuhlíkatá těkavá mastná kyselina. Butyrát je využíván jako energetický zdroj ve tkáních a pro syntézu mléčného tuku. [2]

V bachoru jsou produkovány i jiné těkavé mastné kyseliny, ale jejich množství jsou malá. [2] Těkavé mastné kyseliny jsou vstřebány ve stěně bachoru a tvoří 75 % energie pro skot. [17]

Amylolytické a dextrolytické bakterie hydrolyticky štěpí škrob. Svým enzymatickým vybavením zajišťují štěpení 1,4 glykosidické vazby škrobu, ale nejsou schopny štěpit monosacharidy. [17]

Sacharolytické bakterie štěpí tri a disacharidy, které vznikají při činnosti celulolytických, amylolytických a dextrolytických bakterií. Sacharolytické bakterie metabolizují tyto sacharidy až na kyselinu propionovou a octovou. [17]

Proteolytické bakterie mají schopnost hydrolyticky štěpit bílkoviny až na aminokyseliny. [17] Proteolytickou aktivitu má přibližně 40 % bachorových bakterií. [2]

Protozoa

Nálevníci se vyskytují v bachorovém obsahu v podstatně nižším počtu než bakterie. Význam nálevníků spočívá hlavně v tom, že svým pohybem v bachorové tekutině pomáhají mechanickému trávení obsahu bachoru a jejich těla slouží jako důležitý zdroj bílkovin. [17]

Nálevníci disponují účinnými proteolytickými enzymy, kterými štěpí jak bílkoviny krmiva, tak těla bakterií. Aminokyseliny, které nevyužijí pro svůj růst, uvolňují do prostředí. Prvoci se spolupodílejí na štěpení složitých cukrů, celulózy i škrobu. [17] Dovedou také cukry skladovat jako polysacharidy. [2]

Hlavní produkty sacharidového metabolismu protozoí jsou nižší mastné kyseliny, laktát, CO₂, vodík a malé množství methanu. Přeměňují rostlinný protein a bakterie na hodnotný protozoální protein. [2]

Mikroorganismy bachoru jsou důležité i schopností syntetizovat vitamíny skupiny B (B1, B2, B6, biotin, kyselinu listovou, pantotenovou, nikotinovou). [17]

Bachorové houby

Bachorové houby mají velmi vysokou celulólytickou a hemicelulólytickou aktivitu. [2]

2.2.2 Trávení sacharidů u skotu

Krmivo je zdrojem sacharidů, které se zde vyskytují v různých formách, a to jako monosacharidy, oligosacharidy nebo polysacharidy. [2]

Sacharidy jsou primárními energetickými zdroji pro bachorové bakterie. Sacharidy jsou fermentovány nejprve na jednoduché cukry a dále na kyselinu pyrohroznovou. Konečným produktem metabolismu sacharidů v bachoru jsou těkavé mastné kyseliny, které z 60-80 % zabezpečují energetické potřeby dojnice. [2]

Bachorová fermentace prakticky vylučuje možnost resorpce alimentárně přijatých sacharidů ve formě glukosy. Proto z hlediska potřeby krevní glukózy je u přežvýkavců glukóza zajišťována intenzivní glukogenezí v játrech z kyseliny propionové, glukogenních aminokyselin a dalších prekurzorů. [2] Viz obr. 2.3.

2.2.3 Trávení lipidů u skotu

Lipidy tvoří jen několikaprocentní obsah sušiny rostlinné hmoty. [9] Bachorové mikroorganismy hydrolyzují triacylglyceroly na volné mastné kyseliny a glycerol, který je bachorovými mikroorganismy využíván jako zdroj energie. Viz obr. 2.3.

Bachorové mikroorganismy částečně hydrogenují nenasycené mastné kyseliny z krmiva na nasycené. [2] Biohydrogenace je negativní jev, který snižuje nutriční hodnotu mléčného a depotního tuku skotu. [9]

2.2.4 Trávení proteinů a dusíkový metabolismus u skotu

Podstatnou složku rostlinné potravy tvoří také protein. [9] Přibližně 60-70 % proteinu krmiva je degradováno pomocí bachorových mikroorganismů na peptidy, aminokyseliny nebo amoniak. Amoniak je opětovně využíván bachorovými bakteriemi jako zdroj dusíku pro syntézu mikrobiálního proteinu. Nevyužitý amoniak je absorbován bachorovou sliznicí do krve. V játrech je amoniak přeměňován na močovinu a opětovně recyklován do bachoru pomocí slin nebo jako močovina vylučován močí nebo mlékem. [2] Mikrobiální bílkovina je trávena ve slezu a slouží přežvýkavci jako zdroj stavebních látek pro syntézu

vlastní bílkoviny. [9] Vedle mikrobiálního proteinu se ve střevě tráví i protein, který nebyl mikrobiálně degradován. Jeho trávení je stejné jako u mikrobiálního proteinu. [18]

V současné době mají z hlediska zásobení přežvýkavců dusíkatými látkami význam tyto frakce:

- Nebílkovinné dusíkaté látky – jedná se například o močovinu, amonné soli, volné aminokyseliny, nízkomolekulární peptidy, nitráty, puriny. [9]
- Degradovatelné dusíkaté látky – je to část dusíkatých látek krmiva, které jsou rozkládány mikroorganismy v batoru a z větší části konvertovány na mikrobiální dusíkaté látky. V krmné dávce by měli být zastoupeny tři druhy degradovatelných látek: [9]

1. Rychle degradovatelné (rozpustné) dusíkaté látky

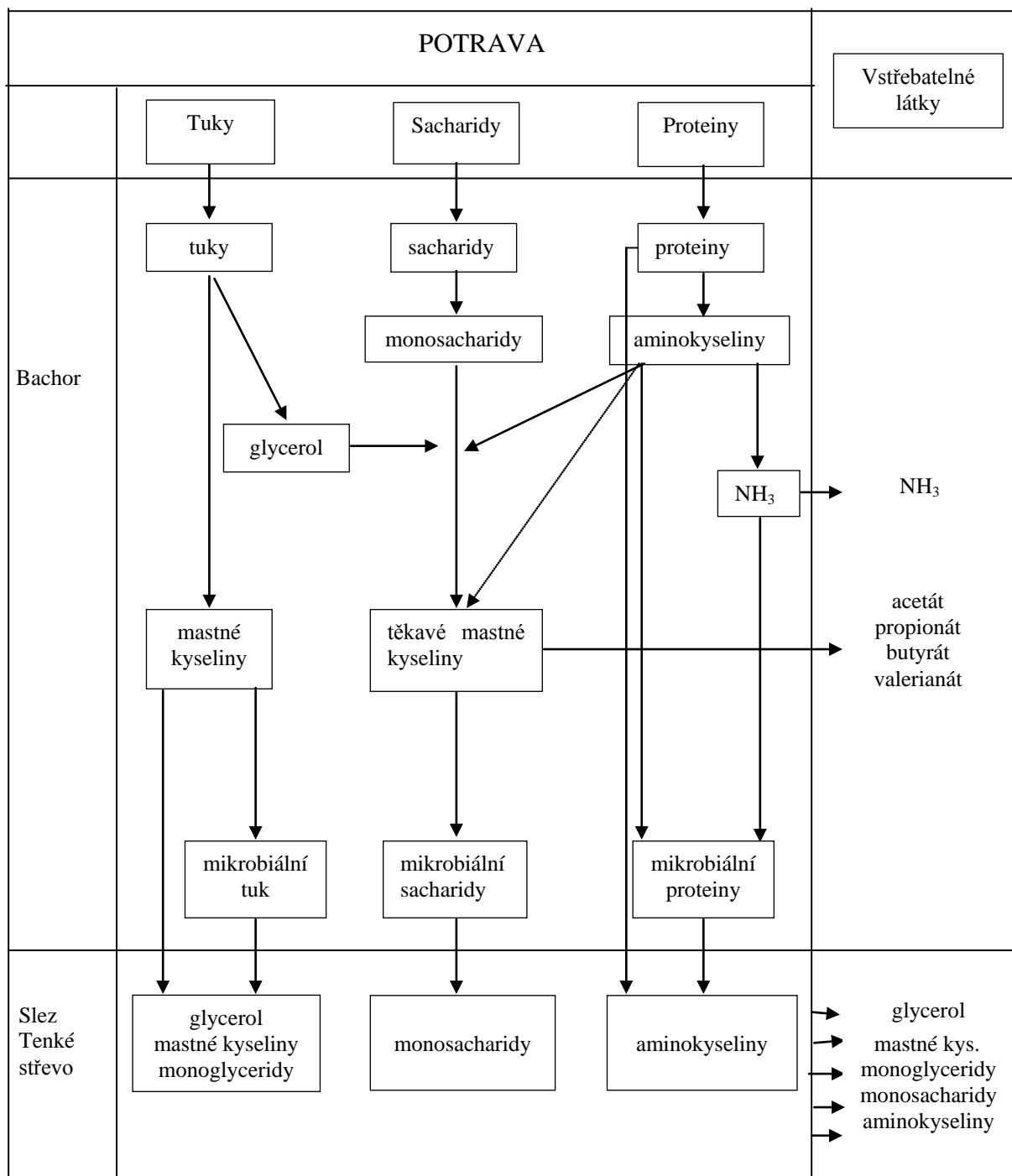
Jsou to nebílkovinné sloučeniny, například amoniak nebo močovina. Jejich dusík je mikroorganismům dostupný téměř ihned. Je-li množství dusíku pocházejícího z rozpustných degradovatelných látek větší než mohou bakterie využít, pak se jeho přebytek vstřebává batorovou stěnou do krve a je vylučován.

2. Středně degradovatelné dusíkaté látky

3. Pomalu degradovatelné dusíkaté látky

Zkrmování několika zdrojů různě degradovatelných dusíkatých látek rozšiřuje dobu pro degradaci, takže dostupnost dusíku je v souladu s rozvojem batorových bakterií. [9]

- Nedegradovatelné dusíkaté látky – je to část z celkových dusíkatých látek krmiva, která nebyla degradována mikrobiální činností v batoru a která přechází do slezu a tenkého střeva, kde je podrobena enzymatickému trávení. [9]



Obr. 2.3: Trávení hlavních živin v bachoru skotu a vstřebatelné sloučeniny [19]

2.3 Nároky na proteinovou výživu vysokoprodukčních dojnic

U vysokoprodukčních dojnic převyšuje celková potřeba dusíku množství bakteriálního proteinu vyprodukovaného v batoru i nízkou hladinu nedegradovatelných dusíkatých látek přítomnou v běžných krmivech. [9]

Protein v tenkém střevě přežvýkavce se skládá z mikrobiálního proteinu, dále z proteinu, který nebyl v batoru degradován a z endogenního proteinu. [20] Endogenní protein představují mukoproteiny, oddělené epiteliální buňky a enzymy. [21] Na vzájemném podílu těchto tří zdrojů závisí i výsledný profil aminokyselin, které jsou k dispozici v tenkém střevě. Například pokud budou v krmivu převládat proteiny degradovatelné ruminálními mikroorganismy, pak bude aminokyselinový profil v tenkém střevě podobný profilu proteinů batorové mikroflóry. [20]

Předpokládá se, že požadavky na esenciální aminokyseliny pro býložravce jsou tytéž jako pro monogastriká zvířata. Esenciální aminokyseliny jsou do mléčné žlázy dojnice dopravovány krevním oběhem, neesenciální aminokyseliny mohou být syntetizovány de novo v mléčné žláze. [22]

Pro zabezpečení potřebné dotace esenciálních aminokyselin u vysokoprodukčních dojnic již pouze mikrobiální protein jako zdroj nestačí. V období vysoké užitkovosti mohou být mimořádné požadavky na aminokyseliny kryty pouze buď mobilizací z tkáňových rezerv, což je nežádoucí nebo proteinem, který unikne batorové fermentaci. Proto je nutné ochránit proteiny krmiva před batorovou fermentací a zvýšit tak množství nedegradovatelného proteinu, který přichází do tenkého střeva. [2]

Protože aminokyseliny nacházející se v tenkém střevě pochází hlavně z mikrobiálního a nedegradovaného proteinu krmiva, je doplněk aminokyselin závislý na aminokyselinovém složení a množství tohoto mikrobiálního a nedegradovaného proteinu. Proto je první limitující aminokyselina odhadována pro různá krmiva. [23]

Pro tvorbu bílkovin má také význam energetická složka krmiva. Nedostatečné zásobování energetickou složkou krmiva vede ke snížení množství mléka a snížení obsahu proteinu v mléce. [1] Kromě aminokyselin může být dalším limitujícím faktorem pro syntézu mléka množství glukosy. [24]

K poskytnutí dostatečného přísunu glukosy do mléčné žlázy mohou být kromě glukosy pocházející z jater využity i jiné zdroje, např. aminokyseliny. Nastává situace, kdy je metabolismus aminokyselin v játrech kompetitivní s metabolismem aminokyselin v mléčné žláze. [15] Glukogenní aminokyseliny jsou katabolizovány na glukosu místo toho, aby byly využity pro syntézu proteinů. [23]

2.3.1 Esenciální aminokyseliny u skotu

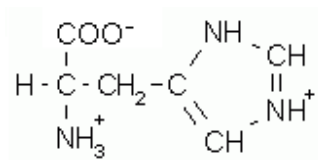
K esenciálním aminokyselinám patří threonin, methionin, lysin, valin, leucin, isoleucin, histidin, fenylalanin, tryptofan. [21]

Mikrobiální protein je dobrým zdrojem lysinu a methioninu, ale je deficitní na histidin. [25] Kukuřice je na histidin bohatá, ale je deficitní v obsahu lysinu. Proto je často doplňována moukou ze sojových bobů. V sojové mouce je ale deficitní aminokyselinou methionin. Při zkrmování krmiv založených na kukuřici může být tedy k dispozici dostatečné množství histidinu, ale obsah methioninu a lysinu může být deficitní. [23]

První limitující aminokyselinou v siláži trávy je histidin, jelikož histidin je pravděpodobně první limitující aminokyselinou mikrobiálního proteinu. [23] Základ krmných dávek v ČR je kukuřičná siláž, limitující jsou pak methionin a lysin.

Histidin

Histidin je bazická aminokyselina. Je to derivát imidazolu, součást aktivního centra mnohých enzymů.

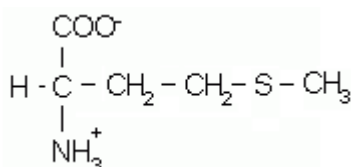


Kation histidinu

Methionin

Methionin je glukogenní hydrofobní aminokyselina, obsahující ve své molekule síru. Hydrofobní charakter způsobuje koncová methylová skupina, která je kovalentně navázaná na atom síry. [26]

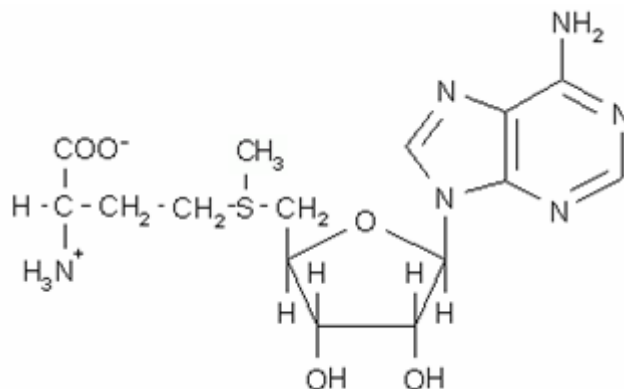
Působením oxidačních činidel podléhá methionin oxidaci za vzniku methionin sulfoxidu. Methionin se uplatňuje jako iniciační aminokyselina při syntéze eukaryontních proteinů, u prokaryot je iniciační aminokyselinou N-formylmethionin. [26]



Methionin

Základní metabolickou úlohou methioninu je jeho konverze na S-adenosylmethionin. [26] S-adenosylmethionin vzniká přenosem adenosylu z ATP na atom síry methioninu. Tím se aktivuje methylová skupina. Po jejím předání akceptoru se hydrolyticky odštěpuje adenosylový zbytek a vzniklý homocystein může být převeden zpět na methionin. [27]

S-adenosylmethionin slouží jako donor methylových skupin v methylačních reakcích. Uplatňuje se v biosyntéze karnitinu, kreatinu, fosfatidylcholinu a při modifikacích makromolekul (DNA, RNA, proteinů). [26]

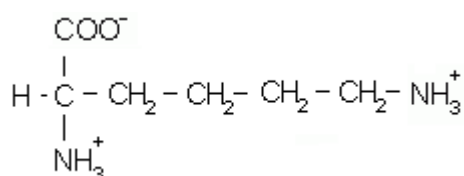


S - adenosylmethionin

Lysin

Lysin je ketogenní aminokyselina. V postranním řetězci obsahuje primární aminoskupinu, která mu dává bazický charakter. V enzymech může být na tuto aminoskupinu vázána prostetická skupina. Relativně dlouhá spojka mezi aminoskupinou a peptidovým řetězcem umožňuje výkyvný pohyb této skupiny, čehož enzymy využívají pro přenos reagujících skupin od jednoho reaktivního místa k druhému. [28]

Rostlinné bílkoviny obsahují poměrně málo lysinu, proto jsou z hlediska výživy lidí i hospodářských zvířat považovány za neplnohodnotné. [28]



Kation lysinu

2.3.2 Vliv přídavku esenciálních aminokyselin na množství a kvalitu mléka

Bylo zjištěno, že vhodný doplněk limitujících aminokyselin může zvýšit využití dusíku z krmiva tak, že se zvýší množství aminokyselin pro syntézu mléčného proteinu. Musí být ovšem splněn předpoklad, že jsou známy limitující aminokyseliny a je dostatečný přísun ostatních výživových složek. [15]

Obsah bílkovin v mléce je podmíněn geneticky a plemenem. [1] Aminokyselinové složení kaseinu je nezávislé na doplňování aminokyselin. [15]. Podle současných studií je první limitující aminokyselinou v siláži z trávy a v krmných silážích z obilí histidin. [15]

Volné aminokyseliny z krmiva rychle podléhají bachorové degradaci, a proto se využívají chemické a fyzikální postupy, které této degradaci zabraňují. Tyto aminokyseliny se pak mohou absorbovat v tenkém střevě. [29] Doplnění specifické aminokyseliny může zlepšit produkci mléka a mléčného proteinu, za předpokladu, že je tato aminokyselina prvním limitujícím nutriem. Chráněné aminokyseliny nahrazují ve výživě dojníc protein nedegradovatelný v bachoru. Například jeden gram chráněného formy lysinu poskytne v tenkém střevě takové množství lysinu jako 126 gramů rostlinného krmiva. [30]

2.3.3 Chráněné formy aminokyselin

Chráněnou formou se rozumí taková fyzikální podoba preparátu, která znemožňuje destrukci účinné látky fermentačním procesem probíhajícím v bachoru. Nejčastěji se jedná o uzavření účinné látky do kapslí určité velikosti, jejíž povrchová vrstva reaguje svojí soudržností na změny pH. Účinná látka se uvolní z ochranného obalu až ve slezu, respektive v tenkém střevě. Cílem je dopravit co největší množství účinné látky až na místo absorpce, tedy do tenkého střeva. [2]

Preparáty chráněných aditiv musí splňovat požadavek na stabilitu účinné látky a také musí zajišťovat jejich dostatečnou biologickou využitelnost. [2] Bylo připraveno a testováno několik modifikací chráněných aminokyselin: [29]

- Chemické deriváty – z nejvíce testovaných derivátů jsou to hydroxyanalogy methioninu. [29]
- Cheláty aminokyselin – používá se například chelát methioninu a zinku nebo lysinu a zinku. Nevýhodou v používání sloučenin obsahujících zinek je následný vysoký obsah zinku v krmivu. [29]
- Enkapsulace pomocí tuku – například komerční preparát Megalac Plus obsahuje 13 g hydroxyanalogu methioninu a 450 g vápenatých solí mastných kyselin s dlouhým řetězcem. [29]
- Polymery citlivé na pH – polymery senzitivní na změnu pH se používají na enkapsulaci methioninu a lysinu. Polymer je stabilní při bachorovém pH. Pokud je ale vystaven nižšímu pH ve slezu, ztrácí svou stabilitu. Uvolněné aminokyseliny se pak mohou absorbovat v tenkém střevě. Například komerčně vyráběný produkt Smartamin M obsahoval 70 % methioninu, produkt ML obsahoval 15 % methioninu a 50 % lysinu. [29]

V současné době jsou již komerčně dostupné chráněné formy methioninu (Smartamin, Megalac Plus, MetaSmart). Nejvíce se používají fyzikální způsoby ochrany methioninu, tj. enkapsulace pomocí tuků a pH senzitivní polymery nebo chemicky modifikované formy methioninu. [31]

Z fyzikálně chráněných preparátů byly nejlepší výsledky dosaženy při enkapsulaci methioninu pomocí pH senzitivního polymeru. [32]

2.3.4 Odezvy na doplňky esenciálních aminokyselin u skotu

Odezva na histidin

Doplňování histidinu bylo studováno ve Finsku, kde vědci prokázali příznivý vliv na množství nadojeného mléka. Zaznamenán byl i vyšší výtěžek kaseinu. Dále byl zaznamenán pokles obsahu tuku a laktosu v mléce. Doplnění histidinu vysokoprodukčním dojnicím je v současné době ve fázi výzkumu.

Odezva na methionin a lysin

Vliv doplňku methioninu současně s lysinem byl studován ve Francii. V experimentu podali dojnicím, které byly krmeny siláží s převážným podílem kukuřice, methionin současně s lysinem. Zaznamenali nárůst obsahu a denního výtěžku mléčného proteinu. Zvýšila se také proporce kaseinů v celkovém množství proteinů v mléce. Denní množství nadojeného nebylo doplňkem ovlivněno. Obsah laktosu a syrovátkových proteinů zůstalo také neovlivněno. [33]

Ve Finské studii byl sledován vliv doplnění samotného methioninu a vliv doplnění samotného lysinu dojnicím, které byly krmeny travní siláží.

Doplňek methioninu měl příznivý vliv na obsah mléčného tuku. Doplnění samotného lysinu neovlivnilo množství nadojeného mléka ani jeho složení. [34]

2.4 Analytické metody použité pro rozbor mléka

Pro rozbor mléka byly použity následující metody:

- Infračervená absorpční spektroskopie
- Enzymaticko-konduktometrická metoda
- Iontoměničová chromatografie

2.4.1 Infračervená absorpční spektroskopie

Infračervená spektroskopie je analytická technika určená především pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a také pro stanovení anorganických látek. Principem metody je absorpce infračerveného záření při jeho průchodu vzorkem, během níž dochází ke změnám rotačně-vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. [35]

Infračerveným zářením je elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 0,78-1000 mm, což odpovídá rozsahu vlnočtů 12800-10 cm⁻¹. Celá oblast bývá rozdělena na blízkou (13000-4000 cm⁻¹), střední (4000-200 cm⁻¹) a vzdálenou (200-10 cm⁻¹) infračervenou oblast. Nejpoužívanější je střední oblast. [35]

Analytickým výstupem je infračervené spektrum. [35] Infračervené spektrum je závislost transmittance na vlnočtu záření. Můžeme se setkat také se závislostí absorbance na vlnočtu nebo vlnové délce. [36]

Mezi vlnovou délkou a vlnočtem platí vztah: $\nu = \frac{1}{\lambda}$

Kde λ je vlnová délka. [36]

Pro jednotlivé látky se infračervená spektra soustřeďují do atlasů spekter, které se používají při jejich identifikaci. [36]

Infračervené záření má větší vlnovou délku a nižší energii než záření ultrafialové a viditelné. [36] Energie fotonů infračerveného záření nestačí pro excitaci elektronů v molekulových orbitalech, ale je dostatečná ke změně vibračního stavu nebo rotačního stavu molekuly. [37]

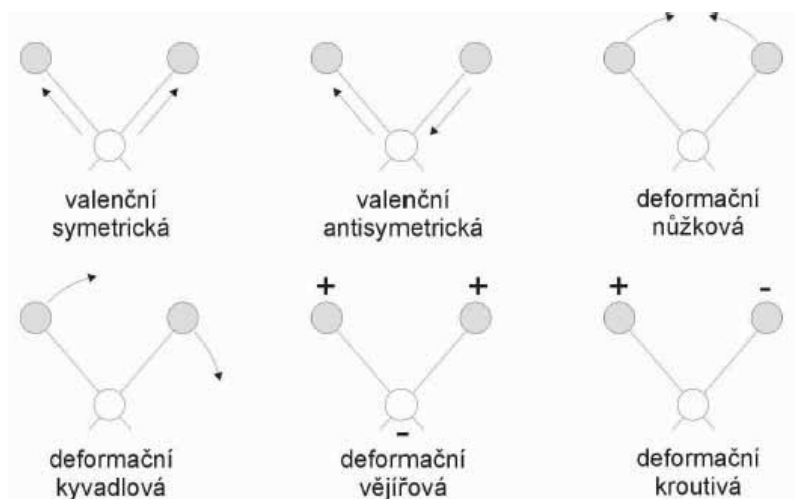
Vibrace a rotace molekul

Molekula rotuje kolem svého těžiště. Energie rotace závisí na hmotnosti vázaných atomů a na délce vazby. [36]

Vazba mezi atomy působí jako pružina, na které vázané atomy vibrují. Energie vibrací závisí na hmotnosti vázaných atomů a na pevnosti vazby. [36] Absorbovat se může jen záření, jehož energie odpovídá příslušným vibračním a rotačním přechodům. Tyto energie jsou u různých atomů různé. Ke změně vibračně-rotačního stavu molekuly absorpcí infračerveného záření může dojít jen tehdy, když tím dojde ke změně dipólmomentu molekuly. Dipólmoment je součin velikosti náboje jednoho z pólů dipólu a vzdálenosti obou pólů. [36]

Vibrace můžeme popisovat jako změny délek nebo změny úhlů vazeb. Mění-li se při vibraci především délka vazby, hovoříme o vibraci valenční. Při změně úhlů se jedná o vibraci deformační. Frekvence valenčních vibrací jsou vždy vyšší než frekvence odpovídající deformačním vibracím dané funkční skupiny, což souvisí se skutečností, že na natáhnutí vazby je třeba více energie než na její ohnutí. [37]

Energetické hladiny rotačních stavů jsou si podstatně blíže než energetické hladiny vibračních stavů. Nastávají-li změny vibračních stavů, jsou doprovázeny i změnami rotačních stavů. [36]



Obr. 2.4: Znárodnění některých vibračních pohybů molekuly [37]

2.4.2 Enzymaticko-konduktometrická metoda

V konduktometrii měříme vodivost roztoků elektrolytů. Vodivost (konduktance) G vyjadřuje schopnost elektrolytu vést elektrický proud. Je definována jako převrácená hodnota elektrického odporu R . Jednotkou konduktance je siemens S . [36]

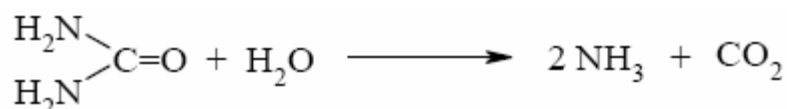
$$G = \frac{1}{R} \text{ [S = } \Omega^{-1}\text{]}$$

Kde G je konduktance, R je elektrický odpor. [36]

Tato metoda byla použita pro stanovení močoviny v mléce pomocí přístroje Ureakvant. Princip analýzy je odvozený od funkce enzymového vodivostního biosenzoru, kterým je přístroj Ureakvant vybaven. [38]

Biosenzor se skládá z temperovacího bloku, dvou průtokových elektrod a komory s enzymovým reaktorem. Analýza probíhá tak, že pomocí náběrové pipety a peristaltické pumpy je vzorek mléka dopraven přes temperovací blok a enzymový reaktor. Po ustálení všech chemických a elektrických podmínek se nasávání vzorku do přístroje zastaví. V této fázi se v reaktoru začnou hromadit produkty enzymové hydrolýzy, kterou katalyzuje enzym ureasa, která je navázána na vnitřní vrstvě reaktoru. Produkty reakce močoviny způsobují vzrůst elektrické vodivosti. Rychlost vzrůstu je přímo úměrná ke koncentraci močoviny ve vzorku mléka. [38]

Enzym ureasa katalyzuje rozklad močoviny za vzniku amoniaku a oxidu uhličitého. Ureasa vykazuje absolutní substrátovou specifiku, tzn, že hydrolyzuje pouze močovinu. [39]



2.4.3 Iontoměničová chromatografie

Základní princip chromatografického procesu

Chromatografie je separační technika, která využívá dělení látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je pohyblivá – mobilní a druhá nepohyblivá – stacionární. Interakce látky a chromatografických fází jsou určujícím faktorem pro rychlost migrace této látky v chromatografickém systému. Rozdíly v rychlostech migrace pak umožňují rozdělení látek. [40]

Přes kolonu naplněnou stacionární fází postupuje určitou rychlostí mobilní fáze. Na začátek kolony je umístěn vzorek. Mobilní fáze unáší vzorek ke konci kolony. Při postupu vzorku kolonou jsou jeho složky buď v mobilní fázi – pak se pohybují stejnou rychlostí jako mobilní fáze nebo na sorbentu – v tomto případě se nepohybují. Při průchodu kolonou každá molekula vzorku přejde mnohokrát z proudu mobilní fáze na povrch sorbentu a zpět. Doba, po kterou průměrná molekula dané složky setrvá na povrchu sorbentu, závisí na velikosti

interakce mezi složkou a sorbentem. Také určuje pořadí, v jakém složka vychází z kolony. Čím větší interakce, tím později složka vychází z kolony a tím má větší retenční čas. [40]

Na složku vycházející z kolony reaguje detektor. Výsledkem je pak záznam chromatografické separace – chromatogram. [40]

Iontově výměnná chromatografie

Pevnou fází je u tohoto typu chromatografie iontoměnič. Látky ve směsi se separují podle stupně ionizace skupin a afinity těchto ionizovaných skupin k ionexu. Separace látek tedy závisí na reverzibilní adsorpci látek na iontoměnič (ionex). [41]

Jednotlivé látky se váží na ionex tehdy, jestliže mají opačný náboj, než je náboj ionexu. Záporně nabitě anionty se váží na anex, kladně nabitě kationty na katex. Ionty se váží na ionex převážně elektrostatickými silami. Van der Waalovy síly a polární interakce, které se při vazbě iontu na ionex také uplatňují, bývají mnohem slabší, charakter procesu nezmění. [41]

Pevnost vazby sloučeniny může být regulována různými podmínkami. Na prvním místě stojí pH, které je rozhodující pro náboj látky, dále iontová síla roztoku a kapacita ionexu. [41]

Vliv pH

Náboj molekuly je dán nábojem jejích disociovatelných skupin. Disociace a velikost náboje jsou závislé na pH. Sloučeniny, které nesou kladně i záporně nabitě skupiny se při určitém pH zvaném izoelektrický bod dostávají do izoelektrického stavu, ve kterém je jejich volný náboj nulový. Při pH vyšším než je izoelektrický bod nesou záporný náboj, při pH nižším nesou kladný náboj. [41] Aby došlo k vazbě na ionex, mělo by se pracovní pH lišit od izoelektrického bodu alespoň o jednotku. Volba mezi katexem a anexem je limitována pH stabilitou separovaných sloučenin. [41]

Vliv iontové síly

Jestliže množství iontů v roztoku vzrůstá, každý jednotlivý ion bude vázán na ionexu méně pevně následkem většího soutěžení o vazbu na ionex mezi různými ionty. Určujícím činitelem pevnosti vazby je iontová síla roztoku. [41]

Vliv kapacity ionexu

Ionexy mají omezenou schopnost vázat ionty z roztoku. Tato schopnost závisí na počtu vazebných skupin ionexu a na jejich přístupnosti pro ionty z roztoku. Jestliže koncentrace nabitých skupin v roztoku převyšuje kapacitu ionexu, přebytek iontů se na ionex nenaváže. Kapacita ionexu je pro různé sloučeniny odlišná. Objemné molekuly nemohou dosáhnout všech nabitých skupin uvnitř ionexu. Pro tyto molekuly má ionex sníženou kapacitu. [41]

Navázané látky lze z vazby na ionex uvolnit změnou složení eluentu tak, aby pevnost vazby byla oslabena. Toto lze dosáhnout buď změnou pH ve směru izoelektrického bodu nebo zvýšením iontové síly. [41]

Iontoměniče

Ionex se skládá z nerozpustné matrice, na níž jsou kovalentně navázány skupiny nesoucí náboj. Tyto skupiny jsou ve spojení s ionty, které nesou opačný náboj, tzv. protiionty. Protiionty mohou být reverzibilně zaměňovány za jiné, stejně nabitě ionty, aniž by došlo ke změně matrice. [41]

Pozitivně nabité skupiny mají záporně nabitě protiionty schopné výměny a nazývají se anezy. Negativně nabité skupiny mají jako protiionty kationty a nazývají se katexy. [41]

Kovalentně navázané skupiny určují základní charakter ionexu. Druh skupiny udává typ a sílu ionexu. Celkové množství a dosažitelnost skupin určují kapacitu ionexu. Silou ionexu rozumíme rozsah pH, při němž zůstává nezměněna schopnost disociace vázaných skupin. Silné ionexy jsou úplně disociovány v širokém rozmezí pH, ionizovatelnost slabých ionexů je naopak na pH silně závislá. Slabé ionexy obvykle ztrácejí náboj při pH nižším než šest a vyšším než devět. [41]

Analyzátor aminokyselin – instrumentace

Analyzátor aminokyselin je kompaktní kapalinový chromatograf pro analýzu aminokyselin a biogenních aminů na ionexové koloně s postkolonovou derivatizací ninhydrinem. Přístroj je rozdělen na tyto části: [42]

- Napájecí zdroj a pojistky
- Pumpy
- Hydraulický systém
- Dávkovací systém
- Kolony
- Detektor s reaktorem

Pumpy

Pumpy jsou bezpulzní s rovnoměrným výkonem a jejich použití zajišťuje shodu retenčních časů jednotlivých píků. Pumpy dovolují čerpání maximálním průtokem 10 ml za minutu. Pumpa 2 má pro dokonalou funkci čerpání ninhydrinu zdvih pístů poloviční, a proto se při stejném průtoku pohybuje dvakrát rychleji. [42]

Hydraulický systém

Hydraulický systém je tvořen láhvemi pro šest pufrů, láhví pro destilovanou vodu a chlazenou láhví pro ninhydrin. Láhev pro ninhydrin je umístěna v kovové jímce, která je chlazená termoelektrickými chladicími moduly. Od láhví jsou všechny kapaliny vedeny pomocí hadiček k elektromagnetickým ventilům, které jsou umístěny v levé dolní části analyzátoru. [42]

Dávkovací systém

Dávkovací systém se skládá z:

- vyjímatelného dávkovacího kotouče pro mikrozkuřavky
- raménka s jehlou
- smyčkového dávkovacího ventilu
- optických čidel průchodu kapalin hadičkou
- peristaltického čerpadla

Dávkovací kotouč s mikrozkuřavkami je uložen v chlazeném kovovém prstenci. Při přípravě peristaltické čerpadlo propláchne dávkovací ventil, hadičku a jehlu destilovanou vodou. Obráceným chodem vše vysuší vzduchem. Kotouč dopraví zvolenou mikrozkuřavku

k raménku. Raménko se vyklopí a spuštěním jehly propíchně víčko mikrozkumavky. Plnění dávkovací smyčky je kontrolováno optickými senzory, které rozpoznají, je-li v hadičce kapalina nebo vzduch. [42]

Detektor a reaktor

Reaktor se skládá ze skříňky s topným tělesem a vyjímatelné patrony se zalitou kapilárou. Patrona je v topném tělese zajištěna víčkem s bajonetovým uzávěrem.

Kyveta detektoru je upnuta mezi těleso detektoru a chladič halogenové žárovky. Světlo prošlé kyvetou je po odrazu od konkávní holografické mřížky snímáno fotoprvky, umístěnými na pozicích 440 a 570 nm. [42]

Ninhydrin je silné oxidační činidlo, které reaguje s alfa aminoskupinami, uvolňuje amoniak, oxid uhličitý, aldehyd a redukovanou formu ninhydrinu hydrindantin. Uvolněný amoniak pak reaguje hydrindantinem a další molekulou ninhydrinu a dává Rutherfordovu červeň. Rutherfordova červeň má absorpční maximum při 570 nm. Tato absorbance je lineární funkcí množství přítomných alfa aminoskupin. Reakce ninhydrinu se sekundárními aminokyselinami má absorpční maximum při 440 nm.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Uspořádání pokusu, krmení zvířat

Do pokusu byly zařazeny tři holštýnské dojnice (H100) s duodenálními kanylami o průměrné hmotnosti 529 kg s průměrnou užitkovostí 27,2 kg mléka za den ($\pm 0,5$ kg).

Dojnice byly rozděleny do dvou skupin – K a His. Celý pokus v délce 28 dní byl rozdělen do čtyř period, každá perioda trvala sedm dní. Z toho bylo tři dny přípravné období a čtyři dny odběrové (experimentální) období.

Pokus byl uspořádán ve formě tzv. crossover designu, tzn. že v první periodě byl u dojnice číslo jedna a číslo dvě uplatněn faktor K a u dojnice číslo tři faktor His. V následující periodě byl faktor zaměněn. Rotace byla provedena takovým způsobem, že se daný faktor u každé dojnice dvakrát opakoval, viz schéma uspořádání pokusu tabulka 3.1.

Tabulka 3.1: Rozvržení pokusu

Perioda	Dojnice 1	Dojnice 2	Dojnice 3
1	Kontrola	Kontrola	His
2	His	His	Kontrola
3	His	His	Kontrola
4	Kontrola	Kontrola	His

kontrola - infuze Glu-Na, Met, Lys, Leu

His - infuze His, Met, Lys, Leu

Dojnice byly vazně ustájeny v individuálních stáncích se zajištěním individuálního příjmu krmiva. Dojnice byly krmeny dvakrát denně (v 7:00 a 17:00 hod.) krmnou dávkou složenou z kukuřičné siláže, vojtěškového sena a doplňkové krmné směsi, viz tabulka 3.2. Uvedená krmná dávka byla deficitní na lysin (deficit 4,3 %), methionin (24,5 %), leucin (3,5 %) a histidin (18,9 %). Chybějící aminokyseliny byly dojnicím podávány ve formě duodenálních infuzí, a to tak, že u skupiny His byly dojnicím infudovány všechny aminokyseliny a u skupiny K byly infudovány všechny aminokyseliny s výjimkou histidinu, který byl nahrazen odpovídajícím množstvím glutamátu sodného.

Duodenální infuze byly připraveny tak, že vypočtené množství aminokyselin bylo denně naváženo a rozpouštěno ve čtyř až pěti litrech pitné vody zvlášť pro každou dojnici. Čtyřcestná infúzní pumpa byla nařízena na průtok zajišťující předepsané denní množství aminokyselin. Infúzní hadičky byly fixovány na duodenální kanylu a zavěšeny na pružném závěsu upevněném nad zvířaty.

Tabulka 3.2: Průměrné složení krmné dávky v sušině

Složka krmné dávky	Obsah (g.kg⁻¹)
Kukuřičná siláž	480
Vojtěškové seno	82
Krmná směs ¹	438
Složka krmné směsi	
Ječmen	428
Oves	182
Len	51
sojový extr. šrot	50
hrách krmný	249
NaCl	6
DCP	13,3
CaCO ₃	13,3
NaHCO ₃	1,1
MgP	3,3
minerální vitaminový premix	1,0

3.2 Odběry, zpracování a analýzy vzorků

Mléčná užitkovost byla evidována denně. V odběrové části každé periody byly odebírány vzorky mléka na stanovení obsahu základních složek mléka (tuku, proteinu, kaseinu, laktosy, močoviny) a obsahu aminokyselin v kaseinu.

Pro stanovení základních složek mléka byly odebrány vzorky z ranního a večerního dojení, které byly konzervovány 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diolem (Bronopolem), ochlazený na 6 °C a analyzovány infračerveným absorpčním analyzátozem (Bentley Instruments 2000, Bentley Instruments Inc., USA). Stanovení základních složek mléka provedla laboratoř LRM v Brně – Tuřanech.

Pro stanovení obsahu kaseinu a aminokyselin v kaseinu byl odebrán směsný vzorek mléka z ranního i večerního dojení, který byl při -20 °C uchován do analýz.

3.3 Stanovení aminokyselin v kaseinu

3.3.1 Používané přístroje

- analytické váhy, Mettler AE 2000
- rotační vakuová odparka
- topná deska
- sušárna
- tlaková láhev s dusíkem, Linde Gas a.s., Česká republika
- analyzátor aminokyselin AAA 400, Ingos, Česká republika
- softwarové vybavení:
 - chromatografický software ChromuLan, verze 0.82, Ingos Česká republika
 - statistický software Statgraf

3.3.2 Používané pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- hydrolyzační lahvičky
- zpětné chladiče
- odpařovací baňky
- Erlenmayerovy baňky

3.3.3 Chemikálie

- kyselina chlorovodíková, 35 %, Penta s.r.o., Česká republika
- peroxid vodíku, 30 % p.a., Penta s.r.o., Česká republika
- kyselina mravenčí, 85 %, Lach-Ner spol. s.r.o., Česká republika
- kyselina citronová, monohydrát, p.a., ZMDB chemik s.r.o., Česká republika
- citronan sodný, dihydrát, p.a., ZMDB chemik s.r.o., Česká republika
- chlorid sodný, p.a., ZMDB chemik s.r.o., Česká republika
- hydroxid sodný, p.a., ZMDB chemik s.r.o., Česká republika
- kyselina boritá, ZMDB chemik s.r.o., Česká republika
- thiodiglykol, ZMDB chemik s.r.o., Česká republika
- azid sodný, p.a., ZMDB chemik s.r.o., Česká republika
- 2-metoxyethanol, ZMDB chemik s.r.o., Česká republika
- octan sodný
- ledová kyselina octová
- hydrindantin dihydrát

3.3.4 Vzorky

- standard pro kyselé hydrolyzáty, ZMDB chemik s.r.o., Česká republika
- standard pro oxidativně-kyselé hydrolyzáty, ZMDB chemik s.r.o., Česká republika
- vzorky lyofilizovaného kaseinu dodal Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Oddělení výživy zvířat a kvality živočišných produktů v Pohořelicích.

3.3.5 Použité pracovní postupy

Příprava ředícího pufru

Ředící pufr byl připraven rozpuštěním 14,0 g kyseliny citronové a 11,5 g chloridu sodného v destilované vodě. K vzniklému roztoku bylo přidáno 5 ml thiodiglykolu a 0,1 g azidu sodného. Objem byl doplněn na 1000 ml destilovanou vodou.

Příprava regeneračního roztoku 0,2 M NaOH

Roztok byl připraven rozpuštěním 8,0 g NaOH v 1000 ml destilované vody.

Příprava elučních roztoků

Všechny eluční roztoky byly připraveny rozpuštěním jednotlivých složek za stálého míchání v destilované vodě. Po rozpuštění složek byl objem doplněn destilovanou vodou na 1000 ml.

Tabulka 3.3: Množství chemikálií pro přípravu sodno-citrátových elučních roztoků

Pufr	pH	Kyselina citronová (g)	Citronan sodný (g)	Chlorid sodný (g)	Thiodiglycol (ml)	Azid sodný (g)
1	2,6	11,54	3,45	9,65	2,5	0,1
2	2,9	10,34	5,12	8,65	2,5	0,1
3	4,25	7,53	9,06	18	2,5	0,1
Pufr	pH	Kyselina boritá (g)	Citronan sodný (g)	Chlorid sodný (g)	Hydroxid sodný (ml)	Azid sodný (g)
4	---	2,05	19,6	52,6	1,5 ml	0,1

Vlastnosti sodno-citrátových elučních roztoků

Pufr 1, 0,2 M Na, pH 2,7

Při použití tohoto pufru je pořadí aminokyselin kyselina cysteová, kyselina asparagová, methionin sulfon, threonin, serin.

Pufr 2, 0,2 M Na, pH 2,9

Tento pufr slouží k dokončení eluce kyselých aminokyselin. Eluuje se jím kyselina glutamová, prolin, glycin, alanin, cystin, valin.

Pufr 3, 0,4 M Na, pH 4,25

Tímto pufrům jsou eluovány aminokyseliny methionin, izoleucin, leucin. Čím je pufr kyselejší, tím je pomalejší eluce a naopak. Totéž platí o teplotě. Čím je vyšší teplota kolony, tím rychlejší je eluce a naopak.

Pufr 4, 1,12 M Na, pH 7,9

Na počátku během tří prvních analýz stlačí ionexový sloupec v koloně maximálně o 1 cm a zvýší tak tlak v koloně přibližně o 0,2 až 0,5 MPa. V průběhu dalších analýz už ale žádné změny nenastávají. Eluční vlastnosti se určují pouze množstvím přidaného NaOH.

Příprava ninhydrinového činidla

Do reagenční láhve bylo naváženo 20,0 g ninhydrinu a bylo přidáno 600 ml 2-methoxyethanolu. Roztok byl prosycován dusíkem do rozpuštění ninhydrinu. Poté bylo přidáno 250 ml 4 M acetátového pufru a roztok byl prosycován dusíkem po dobu pěti minut. Ve 150 ml 2-methoxyethanolu byl rozpuštěn 1 g hydrindantinu. Tento roztok byl přidán k roztoku v reagenční láhvi. Výsledný roztok byl dvě minuty prosycován dusíkem.

Příprava standardních roztoků

Komerčně dodaný standardní roztok pro kyselou hydrolyzu obsahoval všechny stanovené aminokyseliny v koncentraci $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Komerčně dodaný standardní roztok pro oxidativně-kyselou hydrolyzu obsahoval kyselinu cysteovou a methionin sulfon v koncentraci $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro analýzu v analyzátoru aminokyselin byly standardy desetkrát zředěny ředicím pufrem.

Příprava oxidační směsi

Jeden díl 30% H_2O_2 byl smísen s devíti díly 85% kyseliny mravenčí a nechal se 30 minut stát při laboratorní teplotě. Takto připravená směs byla ihned použita k oxidaci lyofilizovaného kaseinu.

Příprava roztoků vzorků

Kyselý hydrolyzátor

Do reagenční lahvičky bylo naváženo asi 0,2 g lyofilizovaného kaseinu a přidáno 25 ml 6 M HCl. Následovalo probublávání dusíkem po dobu tří minut. Poté byly lahvičky utěsněny gumovou zátkou a umístěny na 23 hodin do sušárny vyhřívané na teplotu 110°C . Po vyjmutí lahviček ze sušárny a jejich ochlazení byl obsah přefiltrován a převeden destilovanou vodou do 200 ml odměrné baňky. Z tohoto množství bylo odebráno 25 ml a odpařeno při 50°C na rotační vakuové odparce do sirupovité konzistence. Odparek byl promyt destilovanou vodou a znovu odpařen. Odpaření a promytí destilovanou vodou bylo provedeno dvakrát. Vzniklý odparek byl převeden ředicím pufrem do 25 ml odměrné baňky. Do analýzy byl tento roztok uchován v chladničce při 4°C . Bez dalšího ředění byl použit na stanovení aminokyselin.

Oxidativně-kyselý hydrolyzátor

Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo asi 0,4 g lyofilizovaného kaseinu a přidáno 5 ml oxidační směsi. Vzniklá suspenze byla opatrně zamíchána a vložena na 16 hodin do chladničky o teplotě 4°C . Poté byl ke vzorku přidán 1 ml koncentrované HCl. Po 15 minutách bylo přidáno 80 ml 6 M HCl. Vzorek byl pak umístěn na topnou desku pod zpětný chladič na 23 hodin. Topná deska byla nastavena na teplotu 220°C . Po 23 hodinách byl obsah Erlenmayerovy baňky ochlazen, přefiltrován a převeden destilovanou vodou do 100 ml odměrné baňky. 40 ml bylo odebráno na odpaření. Odpařování probíhalo při 40°C na rotační vakuové odparce do sirupovité konzistence. Odparek byl promyt destilovanou vodou a znovu odpařen. Promytí a odpaření se třikrát opakovalo. Poté byl převeden ředicím pufrem do 25 ml odměrné baňky. Bez dalšího ředění byl použit pro stanovení aminokyselin.

Zdroje chyb

Neúplné výtěžky některých aminokyselin jsou dány použitou metodou hydrolyzy HCl a nejsou prakticky odstranitelné. Cystin při hydrolyze racemizuje a poskytuje na

chromatogramu plochý, asymetrický, obtížně integrovatelný pík. Přesnějších výsledků při stanovení sirných aminokyselin, i s ohledem na možnou oxidaci při hydrolýze HCl, lze dosáhnout oxidací vzorku před hydrolýzou. Nespecifickým redox reakcím sirných aminokyselin během hydrolýzy HCl lze zabránit převedením cystinu a methioninu pomocí kyseliny mravenčí na stabilní oxidované deriváty – kyselinu cysteovou a methionin sulfon. [42]

Pracovní postup při analýze

Připravené hydrolyzáty byly pipetovány do plastových uzavíratelných mikrozkušavek a vkládány do dávkovacího kotouče analyzátoru.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Mléčná užitkovost a obsah jednotlivých složek mléka

V tabulce 4.1 je uvedena průměrná denní užitkovost dojnic a obsah jednotlivých základních složek v mléce v závislosti na pokusném zásahu. Průměrná denní dojivost u skupiny K byla $26,77 \text{ kg} \cdot \text{den}^{-1}$ a byla průkazně nižší než u skupiny His ($27,87 \text{ kg} \cdot \text{den}^{-1}$, $P < 0,05$). Průměrná denní užitkovost vyjádřená ve 4% FCM však nebyla pokusným zásahem ovlivněna ($P > 0,05$).

Nárůst dojivosti, který byl během experimentu zaznamenán je v souladu s výsledky publikovanými např. [23], kde uvádí nárůst nadojeného mléka po infuzi 6,5 g histidinu z 22,9 litrů na 23,6 litrů. V publikaci [25] zaznamenali po infuzi dvou gramů histidinu s 250 g glukosy na den nárůst množství nadojeného mléka z 27,0 litrů na 28,1 litrů.

Koncentrace tuku v mléce u kontrolní skupiny K byla $46,43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, u skupiny His $45,05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, ($P > 0,05$). Obsah proteinu i kaseinu byl v obou sledovaných skupinách téměř totožný ($P > 0,05$). Obsah laktosy a močoviny ve skupině K se téměř nelišil od skupiny His ($P > 0,05$).

Publikace [23] však uvádí prokazatelný pokles obsahu tuku z $43,4 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$ na $41,1 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$ a pokles obsahu laktosy z $47,7 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$ na $46,9 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$ v mléce na základě infuze 6,5 g histidinu. Důvod poklesu obsahu tuku v mléce je zde zdůvodněn zředěním tuku ve větším množství mléka. Nižší obsah laktosy v mléce po infuzi histidinu je podle v této publikaci odůvodněn nedostatečným přísunem glukosy. Publikace [23] také uvádí, že infuze histidinu neměly vliv na obsah močoviny v mléce, což se shoduje s našimi výsledky.

Podle studie [25] zůstala po infuzích histidinu v kombinaci s glukosou koncentrace proteinu, laktosy a močoviny v mléce nezměněna, což je v souladu s výsledky našeho experimentu. V publikaci [25] dále zjistili pokles obsahu mléčného tuku, což je ve shodě s výsledky v publikaci [23].

Dále jsou v tabulce 4.1 uvedeny hodnoty průměrné denní produkce jednotlivých složek mléka. Denní produkce tuku byla ve skupině K $1233,71 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$ a nelišila se od množství tuku vyprodukovaného ve skupině His ($1249,56 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$, $P > 0,05$). Produkce proteinu u skupiny K byla průkazně nižší ve srovnání s hodnotami zjištěnými ve skupině His ($959,57$ vs. $1014,82 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$, $P < 0,05$). Podobně tomu bylo i v případě denní produkce kaseinu, která byla ve skupině K nižší ($767,64 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$) než ve skupině His ($804,54 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$, $P < 0,05$). Průměrná denní produkce laktosy u skupiny K ($1329,56 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$) byla průkazně nižší ve srovnání s pokusnou skupinou His ($1376,90 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $P < 0,05$).

V publikaci [23] zaznamenali nárůst denní produkce proteinu z $695 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$ na $731 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$. Denní produkce laktosy a tuku zůstaly pokusným zásahem neovlivněny.

Publikace [25] uvádí, že infuze histidinu a glukosy způsobily nárůst denní produkce proteinu z $861 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$ na $877 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$ a laktosy z $1345 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$ na $1402 \text{ g} \cdot \text{den}^{-1}$. Denní produkce tuku nebyla ovlivněna.

Zvýšení denní produkce jednotlivých složek mléka během infuzí histidinu v našem experimentu je způsobeno vyšším množstvím nadojeného mléka.

Tabulka 4. 1: Vliv duodenální infuze histidinu na množství mléka a koncentraci základních složek

Ukazatel	Jednotky	K ¹	His ²	SEM ³	P ⁴
Dojivost	kg.den ⁻¹	26,77 ^a	27,87 ^b	0,246	0,00
4% FCM ⁵	kg.den ⁻¹	29,21	29,89	0,338	0,18
Koncentrace jednotlivých složek mléka					
Tuk	g.kg ⁻¹	46,43	45,05	1,018	0,37
Protein	g.kg ⁻¹	36,02	36,49	0,287	0,27
Kasein	g.kg ⁻¹	28,80	28,93	0,235	0,72
Laktosa	g.kg ⁻¹	49,61	49,38	0,133	0,24
Močovina	mg.100ml ⁻¹	21,73	21,29	0,411	0,47
Denní produkce jednotlivých složek mléka					
Tuk	g.den ⁻¹	1233,71	1249,56	23,110	0,65
Protein	g.den ⁻¹	959,57 ^b	1014,82 ^a	9,430	0,00
Kasein	g.den ⁻¹	767,64 ^b	804,54 ^a	7,759	0,00
Laktosa	g.den ⁻¹	1329,56 ^b	1376,90 ^a	13,16	0,02

¹ K – kontrolní skupina – dojnícím byla do duodena infudována směs Met (15,9 g.den⁻¹), Lys (25,7 g.den⁻¹), Leu (24,3 g.den⁻¹) a Glu-Na (37,4 g.den⁻¹)

² His – pokusná skupina - dojnícím byla do duodena infudována směs Met (15,9 g.den⁻¹), Lys (25,7 g.den⁻¹), Leu (24,3 g.den⁻¹) a His (13,6 g.den⁻¹)

³ SEM – střední chyba průměru skupin K a His

⁴ P – hladina pravděpodobnosti

⁵ FCM – fat-corrected milk – mléčná užitkovost korigovaná na 4% obsah tuku

^{a,b} hodnoty ve stejném řádku označené tímto symbolem se průkazně liší (P<0,05)

4.2 Stanovení aminokyselinového profilu kaseinu

Pro analýzu aminokyselin pomocí aminokyselinového analyzátoru byly použity programy, jejichž režim je uveden v tabulkách 4.2. a 4.3.

V tabulce 4.2 je uveden režim pro kyselé hydrolyzáty. Analýza jednoho vzorku trvala 104 minut, po určitých časových intervalech se v průběhu analýzy měnila teplota kolony a tlumivé roztoky dávované na kolonu.

Tabulka 4.2: Program pro stanovení kyselých hydrolyzátů

Čas (min)	Teplota kolony (°C)	Tlumivý roztok
0	57	1
4	57	2
30	57	3
44	60	4
52	60	4
68	74	4
75	74	6
85	74	1
94	60	1
95	57	1
101	57	1
104	57	1

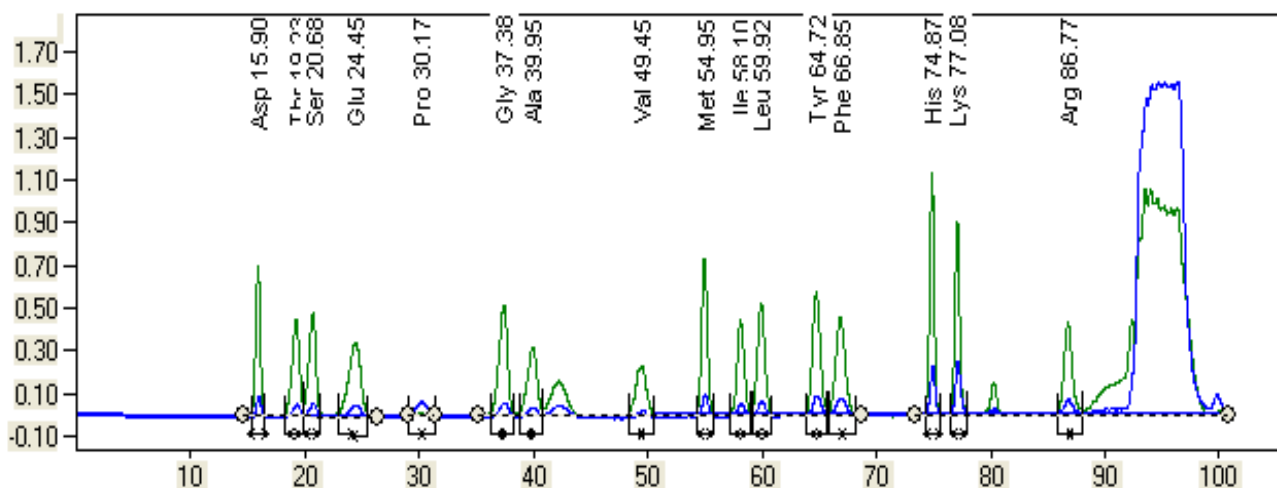
V tabulce 4.3 je uveden program pro oxidativně-kyselé hydrolyzáty. Analýza trvala 39 minut, teplota na koloně byla po celou dobu analýzy konstantní. V průběhu analýzy byly použity tlumivé roztoky 2 a 6.

Tabulka 4.3: Program pro stanovení oxidativně-kyselých hydrolyzáků

Čas (min)	Teplota kolony (°C)	Tlumivý roztok
0	56	2
1	56	2
8	56	6
16	56	2
34	56	2
39	56	2

4.2.1 Analýza standardů aminokyselin

Analýzou standardu aminokyselin pro kyselé hydrolyzáty pomocí programu, který je uveden v tabulce 4.2, byl získán následující chromatogram (obr. 4.1). Pro detekci prolinu byla použita vlnová délka 440 nm, pro ostatní aminokyseliny 570 nm.



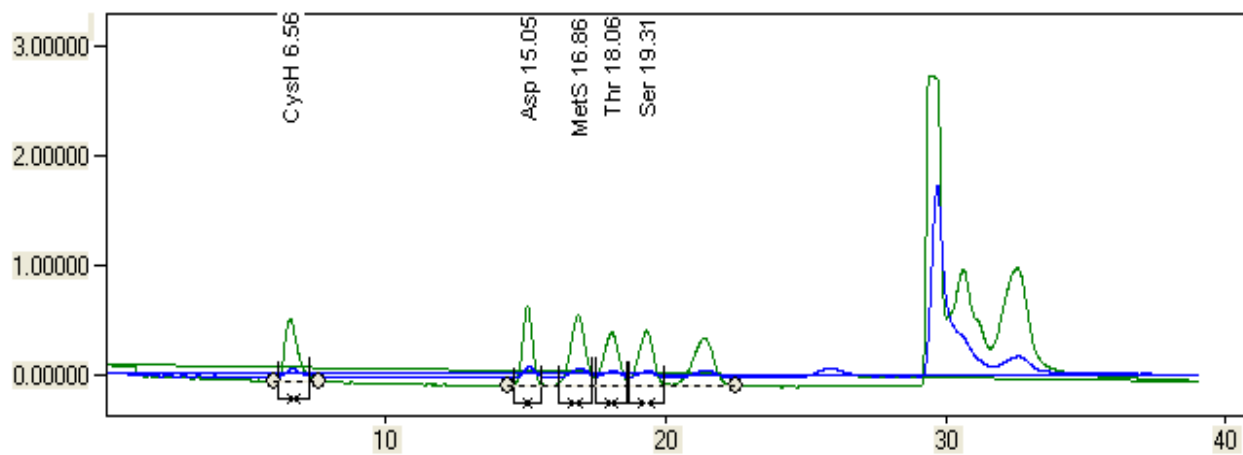
Obr. 4.1: Chromatogram standardu – kyselá hydrolyzáta kaseinu: - detekce při 570 nm, - detekce při 440 nm

V tabulce 4.4 jsou k píkům jednotlivých aminokyselin přiřazeny retenční časy a jejich odpovídající plochy.

Tabulka 4.4: Standard pro kyselou hydrolýzu kaseinu

Název píku	Retenční čas (min)	Plocha píku	Koncentrace AMK ve standardu (nmol.ml⁻¹)
Asp	15,50	19,8734	250,00
Thr	19,23	20,4702	250,00
Ser	20,68	20,7441	250,00
Glu	24,45	25,1685	250,00
Pro	30,17	4,1699	250,00
Gly	37,38	27,4844	250,00
Ala	39,95	19,1568	250,00
Val	49,45	15,2335	250,00
Met	54,95	26,3617	250,00
Ile	58,10	19,5387	250,00
Leu	59,92	24,2797	250,00
Tyr	64,72	28,2354	250,00
Phe	66,85	26,5492	250,00
His	74,87	31,4913	250,00
Lys	77,08	27,1716	250,00
Arg	86,77	21,9088	250,00

Analýzou standardu aminokyselin pro oxidativně-kyselé hydrolyzáty byl získán následující chromatogram (obr. 4.2). Detekce probíhala při vlnové délce 570 nm.



Obr. 4. 2: Chromatogram standardu pro oxidativně-kyselou hydrolýzu: - detekce při 570 nm

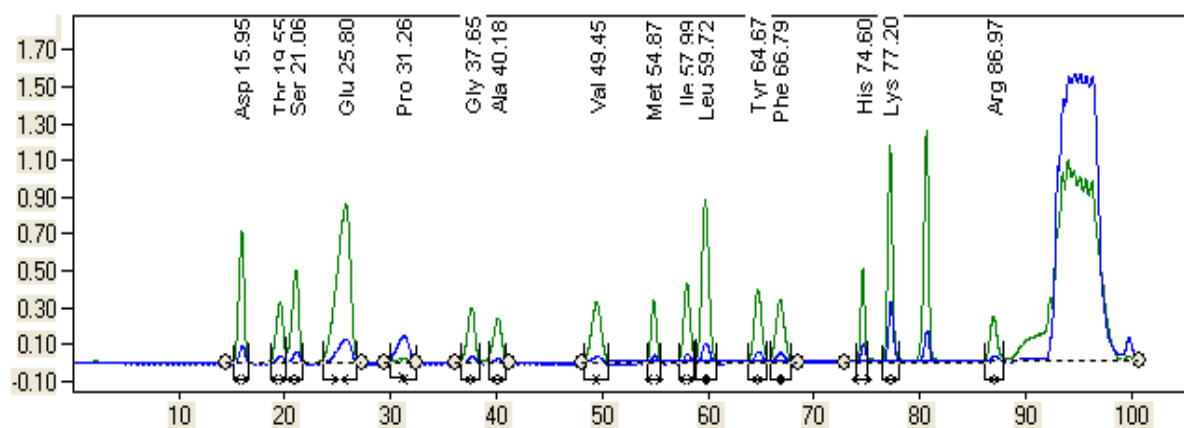
V tabulce 4.5 jsou k píkům aminokyselin přiřazeny retenční časy a jejich plochy.

Tabulka 4.5: Standard pro oxidativně-kyselou hydrolýzu kaseinu

Název píku	Retenční čas (min)	Plocha píku	Koncentrace AMK ve standardu (nmol.ml ⁻¹)
CysH	6,56	17,7866	250,00
MetS	16,86	23,1800	250,00

4.2.2 Analýza vzorků

Analýzou kyselého hydrolyzátu vzorku kaseinu byl získán níže uvedený chromatogram (obr. 4.3). Detekce prolinu probíhala při 440 nm, pro ostatní aminokyseliny byla použita vlnová délka 570 nm.



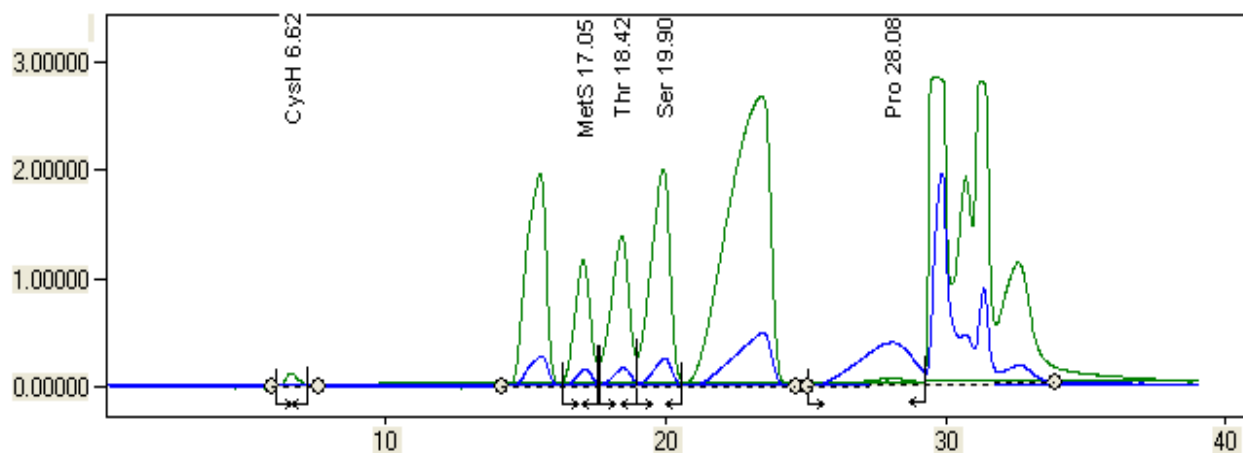
Obr. 4.3: Chromatogram vzorku – kyselá hydrolyza kaseinu: - detekce při 570 nm,
- detekce při 440 nm

V tabulce 4.6 je k jednotlivým píkům aminokyselin přiřazen retenční čas a jejich plocha. V posledním sloupci je uvedeno množství v mg.g kaseinu⁻¹.

Tabulka 4.6: Analýza kyselého hydrolyzátu vzorku kaseinu

Název píku	Retenční čas (min)	Plocha píku	Množství (mg.g⁻¹)
Asp	15,95	24,9882	44,8060
Thr	19,55	15,2798	23,6754
Ser	21,06	22,7292	30,8831
Glu	25,80	77,3905	124,7943
Pro	31,26	10,6739	91,2406
Gly	37,65	14,8292	10,5765
Ala	40,18	13,0741	16,1800
Val	49,45	21,2426	40,9994
Met	54,87	11,9162	16,8291
Ile	57,99	18,0388	30,2981
Leu	59,72	41,4393	56,0143
Tyr	64,67	19,6861	31,7160
Phe	66,79	19,4249	30,3497
His	74,60	13,4963	16,5738
Lys	77,20	36,3168	48,8482
Arg	86,97	12,3134	24,6569

Analýzou oxidativně-kyselého hydrolyzátu vzorku kaseinu byl získán níže uvedený chromatogram (obr. 4.4).



Obr. 4.4: Chromatogram vzorku – oxidativně-kyselá hydrolyzáta: - detekce při 570 nm

V tabulce 4.7 je k jednotlivým píkům aminokyselin přiřazen retenční čas a jejich plocha. V posledním sloupci je uvedeno množství v mg.g kaseinu⁻¹.

Tabulka 4.7: Analýza oxidativně-kyselého hydrolyzátu vzorku kaseinu

Název píku	Retenční čas (min)	Plocha píku	Množství (mg.g ⁻¹)
CysH	6,62	4,3092	1,7579
MetS	17,05	44,8670	17,4358

4.2.3 Aminokyselinový profil kaseinu

V tabulce 4.8 jsou uvedena průměrná množství jednotlivých aminokyselin v mg.g kaseinu⁻¹ získaného z mléka při pokusném zásahu. Množství jednotlivých aminokyselin se mezi skupinami K a His nelišilo ($P > 0,05$).

V tabulce 4.8 je také uvedena suma esenciálních aminokyselin (Σ EAK), suma neesenciálních aminokyselin (Σ NEAK) a celková suma aminokyselin (Σ AK). Ve skupině K byla Σ EAK 258,11 mg.g⁻¹ kaseinu, ve skupině His 262,96 mg.g⁻¹ kaseinu. Σ NEAK ve skupině K 298,56 mg.g⁻¹ kaseinu a His 304,57 mg.g⁻¹ kaseinu. Σ AK ve skupině K byla 557,07 mg.g⁻¹ kaseinu, ve skupině His 567,53 mg.g⁻¹ kaseinu.

Aminokyselinové složení kaseinu je nezávislé na doplňování aminokyselin. Množství aminokyselin, které jsou potřebné na kilogram mléka je konstantní. [15] Primární struktura bílkovin, která je dána pořadím aminokyselin, je zakódována v genech. [43] Genetická informace je uchována v DNA, odkud je přepisována do RNA. V procesu zvaném translace (překlad) se pořadí nukleotidových zbytků v nukleové kyselině převádí na pořadí aminokyselinových zbytků v polypeptidovém řetězci. [10]

Pokusný zásah neovlivnil aminokyselinový profil kaseinu a shoduje se s výše uvedenou teorií.

Tabulka 4.8: Aminokyselinový profil kaseinu

Ukazatel	Jednotky	K ¹	His ²	SEM ³	P ⁴
Lys	mg.g ⁻¹ kaseinu	43,13	43,70	0,74	0,60
MetS	mg.g ⁻¹ kaseinu	12,24	12,74	0,36	0,35
Leu	mg.g ⁻¹ kaseinu	50,07	50,87	0,91	0,56
His	mg.g ⁻¹ kaseinu	15,61	15,70	0,28	0,84
Ile	mg.g ⁻¹ kaseinu	27,67	28,08	0,48	0,57
Phe	mg.g ⁻¹ kaseinu	27,49	27,94	0,45	0,51
Thr	mg.g ⁻¹ kaseinu	22,25	22,65	0,49	0,58
Val	mg.g ⁻¹ kaseinu	37,00	38,42	0,83	0,25
Ala	mg.g ⁻¹ kaseinu	14,77	15,10	0,29	0,44
Asp	mg.g ⁻¹ kaseinu	41,32	41,49	0,79	0,89
CysH	mg.g ⁻¹ kaseinu	0,47	0,46	0,31	0,77
Glu	mg.g ⁻¹ kaseinu	107,24	109,54	2,29	0,50
Gly	mg.g ⁻¹ kaseinu	9,93	10,31	0,23	0,26
Pro	mg.g ⁻¹ kaseinu	69,12	70,67	1,93	0,59
Ser	mg.g ⁻¹ kaseinu	28,64	29,02	0,53	0,63
Tyr	mg.g ⁻¹ kaseinu	27,47	27,97	0,48	0,49
Arg	mg.g ⁻¹ kaseinu	22,65	22,86	0,37	0,70
ΣEAK	mg.g ⁻¹ kaseinu	258,11	262,96	4,64	---
ΣNEAK	mg.g ⁻¹ kaseinu	298,96	304,57	6,02	---
ΣAK	mg.g ⁻¹ kaseinu	557,07	567,53	10,56	---

¹ K – kontrolní skupina – dojnicím byla do duodena infudována směs Met (15,9 g.den⁻¹), Lys (25,7 g.den⁻¹), Leu (24,3 g.den⁻¹) a Glu-Na (37,4 g.den⁻¹)

¹ His – pokusná skupina – dojnicím byla do duodena infudována směs Met (15,9 g.den⁻¹), Lys (25,7 g.den⁻¹), Leu (24,3 g.den⁻¹) a His (13,6 g.den⁻¹)

³ SEM – střední chyba průměru skupin K a His

⁴ P – hladina pravděpodobnosti

5 ZÁVĚR

V literární části práce je shrnuta teorie o kravském mléce a jeho složkách. Jsou zde uvedeny základy metabolismu sacharidů, lipidů a proteinů u přežvýkavců. Dále se literární část zaměřuje na esenciální aminokyseliny ve výživě skotu. Závěr literární rešerše je věnován popisu analytických metod, které byly použity pro rozbor mléka.

Cílem diplomové práce bylo zjistit změny v množství a složení mléka v závislosti na duodenální infuzi histidinu u vysokoprodukčních dojnic.

Experiment byl proveden na třech Holštýnských dojnicích. Dojnice byly rozděleny do dvou skupin – kontrolní (K) a experimentální (His). Dojnice v kontrolní skupině K byly krmeny krmnou směsí složenou z kukuřičné siláže, vojtěškového sena a doplňkové krmné směsi. Tato krmná dávka byla deficitní na methionin, histidin, lysin a leucin. Deficitní aminokyseliny byly dojnicím dodávány pomocí duodenálních infuzí tak, že kontrolní skupina K dostávala všechny aminokyseliny s výjimkou histidinu a experimentální skupina His dostávala infuzí všechny aminokyseliny včetně histidinu. Denně byla evidována mléčná užitkovost a v odběrové části byly odebírány vzorky mléka na stanovení obsahu základních složek mléka, obsahu kaseinových frakcí a aminokyselin.

Byl proveden základní rozbor mléka, tzn. stanovení mléčného tuku, proteinů, kaseinu laktosy pomocí infračervené spektrometrie. Močovina byla stanovena enzymaticko-konduktometrickou metodou. Aminokyselinový profil kaseinu byl stanoven na automatickém analyzátoru aminokyselin Ingos AAA 400.

Pro analýzy aminokyselin byly vzorky lyofilizovaného kaseinu podrobeny kyselé a oxidativně-kyselé hydrolyze. Z každého vzorku lyofilizovaného kaseinu byly zhotoveny dva kyselé a dva oxidativně-kyselé hydrolyzáty. Ty byly pak použity k analýze.

Pro analýzu aminokyselin byla použita kolona o rozměru 0,37 x 45 cm naplněná ionexem Ostion Lg ANB. K eluci byly použity sodnocitrátové eluční roztoky o pH 2,7; 2,9; 4,25 a 7,9. Detekce byla fotometrická při 570 a 440 nm. Identifikace aminokyselin v chromatogramu byla provedena na základě srovnání se standardy. Výsledky byly následně zpracovány pomocí statistického programu Statgraf.

V prezentovaném experimentu byl zjištěn nárůst denní produkce mléka, proteinu, kaseinu a laktosy. Na koncentraci proteinu, laktosy, tuku a močoviny v mléce neměl pokusný zásah vliv.

V prezentovaném experimentu jsme zjistili, že se po doplnění histidinu do krmné dávky vysokoprodukčním dojnicím zvýšila denní produkce mléka z 26,77 kg.den⁻¹ na 27,87 kg.den⁻¹ mléka.

Také jsme zjistili, že koncentrace základních složek mléka tzn. tuku, proteinu, kaseinu, laktosy a močoviny, se po doplnění histidinu nezměnily. Dále jsme zjistili, že doplněk histidinu neovlivnil denní produkci mléčného tuku. Doplněný histidin ale příznivě ovlivnil denní produkci kaseinu a laktosy. Denní produkce kaseinu se zvýšila z 767,64 g.den⁻¹ na 804,54 g.den⁻¹. Denní produkce laktosy se zvýšila z 1329,56 g.den⁻¹ na 1376,90 g.den⁻¹.

V experimentu jsme také ověřili, že doplnění histidinu nemá vliv na profil a množství aminokyselin v kaseinu.

6 PŘÍLOHY

Aminokyselina	Zkratka	Molekulová hmotnost	Strukturní vzorec
Kyselina asparagová	Asp	133,10	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Threonin	Thr	119,12	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \text{CH}_3 \\ \quad \diagup \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH} \\ \quad \diagdown \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{OH} \end{array}$
Serin	Ser	105,09	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Kyselina glutamová	Glu	147,13	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Prolin	Pro	115,13	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 \\ \quad \diagdown \quad \diagup \\ \text{H}_2\text{N}^+ \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{CH}_2 \end{array}$
Glycin	Gly	75,07	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Alanin	Ala	89,10	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

Aminokyselina	Zkratka	Molekulová hmotnost	Strukturní vzorec
Valin	Val	117,15	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array} $
Methionin	Met	149,21	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
Isoleucin	Ile	131,18	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{CH}_3 \end{array} $
Leucin	Leu	131,18	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array} $
Tyrosin	Tyr	181,19	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
Fenylalanin	Phe	165,19	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
Histidin	His	155,16	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \quad \quad \text{NH} - \text{CH} \\ \quad \quad \quad // \quad \quad \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} \quad \quad \quad \text{NH}^+ \\ \quad \quad \quad \backslash \quad \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{CH} \end{array} $

Aminokyselina	Zkratka	Molekulová hmotnost	Strukturní vzorec
Lysin	Lys	146,19	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
Arginin	Arg	174,20	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH}_2^+ \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
Kyselina cysteová	---	169,16	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{OH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \text{O} \end{array} $

- [1]. Lukášová, J.: *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2001. 180 s. ISBN 80-7305-415-9
- [2]. Dvořák, R.: *Výživa skotu z hledisek produkční a preventivní medicíny*. Brno: Klinika chorob přežvýkavců FVL VFU: Česká buiatrická společnost, 2005. 117 s. ISBN 80-7305-550-3.
- [3]. Zadražil, K.: *Mlékařství*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2002. 127 s. ISBN 80-86642-15-1.
- [4]. Gajdůšek, S.: *Laktologie*. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. 78 s. ISBN 80-7157-657-3.
- [5]. Šrubařová, P., Dvořák, J. <s.petra@volny.cz, dvorakJ@mendelu.cz> *Analýza genomického markeru CSN2 v mléce skotu*. Brno: Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita. [cit. 16.7.2009]. Dostupné na: <<http://old.af.mendelu.cz/mendelnet07agro/articles/bioziv/srubarova.pdf>>.
- [6]. Urbánková, E.: Izolace bílkovin z přírodních zdrojů (izolace kaseinu z mléka). Oficiální výukové stránky Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy. [cit. 16.7.2009]. Dostupné na: <<http://alma.karlov.mff.cuni.cz/biofyzika/english/vyuka/IzolaceKaseinu.pdf>>.
- [7]. Velíšek, J.: *Chemie potravin 1*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 331 s. ISBN 80-86659-00-3
- [8]. Douglas Goff, H.: Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, ON, N1G 2W1, Canada. Dairy chemistry and physics. [cit. 16.7.2009]. Dostupné na: <<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html#protein1>>.
- [9]. Urban, F.: *Chov dojeného skotu (reprodukce, odchov, management, technologie, výživa)*. Praha: Apros, 1997. 289 s. ISBN 80-901100-7-X.
- [10]. Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2. opravené vydání. Praha: Academia, 1999. 180, 135, 191 s. ISBN 80-200-0600-1
- [11]. Schaafsma, G.: Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal* 18, 2008, p. 458 – 465.
- [12]. Oficiální výukové stránky Vysoké školy chemicko – technologické v Praze. [cit. 21.7.2009]. Dostupné na: <http://www.vscht.cz/tmt/studium/chemie_mleka/P403_scr.pdf>.
- [13]. Gänzle, M.G., Haase, G., Jelen, P.: Lactose: Crystalization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal* 18, 2008, p. 685-694.

- [14]. Boháčenko, I., Pinkrová, J. <Ivan.Bohacenko@vupp.cz, Jitka.Pinkrova@vupp.cz> Izomerace laktosy na laktulosu v kyselém prostředí. Výzkumný ústav potravinářský, Praha. [cit. 25.10.2009]. Dostupné na: <<http://www.vupp.cz/czvupp/publik/05poster/05pinkrova1.pdf>>.
- [15]. Korhonen, M., Vanhatalo, A., Varvikko, T., Huhtanen, P.: Responses to graded postruminal doses of histidine in dairy cows fed grass silage diets. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83, pp. 2596-2608
- [16]. Skřivánek, M.: Procesy trávení v předžaludcích-morfologické a fyziologické aspekty. *Agroweb*, 2001, ISSN 1214-7621. [cit. 28.7.2009]. Dostupné na: <http://www.uroda.cz/Procesy-traveni-v-predzaludcich---morfologicke-a-fyziologicke-aspekty_s45x9434.html>.
- [17]. Bouška, J.: *Chov dojeného skotu*. 1. vyd. Praha: Profi Press, 2006. 186 s. ISBN 80-86726-16-9.
- [18]. Mudřík, Z., Koukal, P., Doležal, P.: *Základy moderní výživy skotu*. 1. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, 2006. 276 s. ISBN 80-213-1559-8.
- [19]. Heinz, J., Čermák, B., Kroupová, V.: *Základy výživy a krmení hospodářských zvířat*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2006. 76 s. ISBN 80-7040-873-1.
- [20]. Löest, A.C.: Post ruminal protein (amino acid) utilization in dairy and beef cattle. 21st Annual Southwest Nutrition & Management Conference, February 23-24, 2006.
- [21]. Lapiere, H., Raggio, G., Ouellet, D.R., Berthiaume, R., Doepel, L., Pacheco, D.: Beyond the rumen: Understanding the biology behind amino acid balanced dairy diets. 21st Annual Southwest Nutrition & Management Conference, February 23-24, 2006.
- [22]. Bequette, B. J., Backwell, F. R. C., Kyle, C. E., Calder, A. G., Buchan, V., Crompton, L. A., France, J., Marcae, J. C.: Vascular Sources of Phenylalanine, Tyrosine, Lysine, and Methionine for Casein Synthesis in Lactating Goats. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82, pp. 362–377.
- [23]. Vanhatalo, A., Hunhtanen, V., Toivonen, V., Varvikko, T.: Responses of dairy cows fed grass silage diets to abomasal infusions of histidine alone or in combinations with methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82, pp. 2674-2685.
- [24]. Righout, S., Lemonsquet, S., Eys van, J.E., Blum, J.W., Rulquin, H.: Duodenal Glucose Increases Glucose Fluxes and Lactose Synthesis in Grass Silage-Fed Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85, pp. 595-606.

- [25]. Korhonen, M., Vanhatalo, A., Huhtanen, P.: Effect of protein source on amino acid supply, milk production, and metabolism of plasma nutrients in dairy cows fed grass silage. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85, pp. 3336-3351.
- [26]. Brosnan, J. T., Brosnan, M. E., Bertolo, R. F. P., Brunton, J.A.: Methionine: A metabolically unique amino acid. *Science direct*, 2007.
- [27]. Oficiální výukové stránky Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. [cit. 4.9.2009]. Dostupné na:
<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=s-adenosylmethionin>.
- [28]. Oficiální výukové stránky Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. [cit. 4.9.2009]. Dostupné na:
<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=lysin>.
- [29]. Rode, L., Koenig K.: Rumen protected amino acid 1. background. *Lethbridge Research Centre*, University of Delvare.
- [30]. Rode, L. M., Kung, L. Jr.: Rumen-protected amino acids improve milk production and milk protein yield. *Agriculture and Agrifood Research Centre*, Canada.
- [31]. Graulet, B., Richard, C., Robert, J. C.: Methionine Availability in Plasma of Dairy Cows Supplemented with Methionine Hydroxy Analog Isopropyl Ester. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88, pp. 3640–3649.
- [32]. Rulquin, H., Graulet, B., Delaby, L., Robert, J. C.: Effect of Different Forms of Methionine on Lactational Performance of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89, pp. 4387–4394.
- [33]. Pisulewski, M. P., Rulquin, H., Peyraud, L. J., Verite, R.: Lactational and systemic responses of dairy cows to postprandial infusions of increasing amounts of methionine. *Journal of Dairy Science*, 1996, 79, pp. 1781-1791.
- [34]. Varvikko, T., Vanhatalo, A., Jalava, T., Huhtanen, P.: Lactation and metabolic responses to graded abomasal doses of methionine and lysine in cows fed grass silage diets. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82, pp. 2659-2679.
- [35]. Trchová, M.: Jak vibrují atomy v molekulách. Ústav makromolekulární chemie akademie věd ČR. trchova@imc.cas.cz. [cit. 25.10.2009]. Dostupné na:
<<http://www.otvarena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/15.pdf>>.
- [36]. Klouda. P.: *Moderní analytické metody*. 2. opr. a dopl. vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [37]. Oficiální výukové stránky Univerzity Karlovy v Praze. [cit. 25.10. 2009]. Dostupné na:
<<http://userweb.pedf.cuni.cz/kch/downloads/materialy/INA/ICSpektroskopie.pdf>>.

- [38]. Hering, P., Hanuš, O., Pytloun, J., Jedelská, R., Kopecký, J.: Porovnání výsledků různých metod analýzy močoviny v nativním a obohaceném mléce. Českomoravská společnost chovatelů a.s., Praha, Agrovýzkum Rapotín s.r.o. [cit. 22.11. 20909].
Dostupné na: <<http://www.cmsch.cz/docs/4ureanch.doc>>
- [39]. Zehnálek, J., Petřlová, J., Zelená, J., Hradecký, J., Vacek, J., Kizek, R.: Ureázová aktivita v semenech vybraných druhů rostlin. *VIII. Pracovní setkání chemiků a molekulárních biologů: sborník příspěvků. Brno, 3.-4.2.2004.*
- [40]. Churáček, J.: *Analytická separace látek*. 1. vydání. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990, 384 s. ISBN 80-03-00569-8.
- [41]. Králová, B.: *Bioanalytické metody*. 3. přeprac. Vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. 254 s. ISBN 80-7080-449-1.
- [42]. Automatický analyzátor AAA 400, návod k obsluze. INGOS s.r.o. Praha: INGOS 2006.
- [43]. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.: *Harperova biochemie*. Dvacáté třetí vyd. Jinočany: Nakladatelství H+H, 2001, 872 s. ISBN 80-7319-003-6.