**Mastné kyseliny v kravském mléce: význam, syntéza, metabolismus a vztah k energetické bilanci dojnic**

**Štolcová, M.**

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.

**Úvod**

Mléko je důležité nejen z výživových hledisek, ale analýza mléčných složek může poskytovat zajímavé údaje využitelné v predikci či diagnostice některých patologických stavů u dojnic. Dobře známé a využívané je například hodnocení počtu somatických buněk pro diagnostiku mastitid. Tento příspěvek se zabývá mléčnými mastnými kyselinami, které mají potenciál se stát platnými ukazateli zdravotního stavu dojnic, zejména negativní energetické bilance a s ní spojovaných problémů. Pro správnou interpretaci je potřeba porozumět složení, syntéze a metabolismu mléčných mastných kyselin, které jsou u přežvýkavců v mnohém specifické. Cílem práce je charakterizovat mléčný tuk a popsat biochemii nejvýznamnějších mastných kyselin v mléce a uvést některé konkrétní poznatky související přímo s diagnostikou negativní energetické bilance.

**Význam, složení a metabolismus mastných kyselin v mléčném tuku**

Složení mastných kyselin v mléčném tuku ovlivňuje jednak technologickou kvalitu mléka a mléčných výrobků (bod tání a tvrdost másla, krystalizace a frakcionace mléčného tuku), a jednak nutriční kvalitu (potenciální vliv specifických mastných kyselin na zdraví člověka). Složení mastných kyselin ovlivňuje také organoleptické vlastnosti mléka (například běžné stopové množství volných mastných kyselin přispívá k typické chuti mléka a mléčného tuku, ale jejich vyšší koncentrace vyvolává nepříjemnou až nepřijatelnou žluklou chuť mléka). Složení mastných kyselin mléčného tuku je ve srovnání s jinými živočišnými tuky nepřežvýkavých zvířat a také s tuky rostlinnými mnohem pestřejší.

***Složení a význam membrány tukových kapének***

Tuk, jehož průměrný obsah v kravském mléce je zhruba 4 %, se nachází ve formě tukových kapének, jejichž velikost se pohybuje v rozsahu 0,1 až 15 µm a jsou obklopeny speciální membránou složenou z dvojvrstvy lipidů a proteinů (Spitsberg, 2005). Tato membrána bývá v literatuře označována jako **MFGM**, z angličtiny Milk Fat Globule Membrane, volně přeloženo jako „membrána tukových částic mléka“, a je na ni upírána pozornost díky pozitivním vlivům na zdraví konzumentů mléka a mléčných výrobků. Lipidová část MFGM se skládá zejména z triacylglycerolů (62 %) a fosfolipidů (26 – 31 %), mezi které patří sfingomyelin, fosfatidylcholin (lecitin), fosfatidyletanolamin (kefalin), fosfatidylinositol a fosfatidylserin. MFGM v menším množství obsahuje také glykosfingolipidy a ceramidy, které se účastní  mezibuněčné komunikace a jsou nepostradatelné pro nervovou soustavu. Membránové glykosfingolipidy a sfingomyelin obsahují zejména kyselinu palmitovou (C16:0), stearovou (C18:0), behenovou (C22:0), arachovou (C23:0) a lignocerovou (C24:0) (Mather, 2011). Proteiny tvoří 25 – 60 % celkové hmoty MFGM a bylo jich identifikováno velké množství (Mather, 2000). Mezi nejvýznamnější patří mucin 1, který chrání povrch buněk před fyzickým poškozením a mikrobiální invazí, má také velký význam pro imunitu sajících mláďat (Mather, 2011). Xantinoxidáza je enzym s mnohými funkcemi, podílí se, mimo jiné, na terminálním kroku v metabolismu purinů, hraje roli v sekreci mléčného tuku, účastní se produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku, které následně slouží jako informační poslové v mezibuněčné komunikaci a také jako ochrana buněk mléčné žlázy a střeva sajících mláďat před bakteriálními infekcemi (Martin et al., 2004). Další významný protein butyrophilin (BTN) funguje jako pravděpodobný supresor roztroušené sklerózy (Mana et al., 2004). Další proteiny hrají roli zejména v imunitním systému sajících mláďat a v sekreci tukových kapének. Některé složky MFGM přinášejí další zdravotní benefity pro lidskou populaci, například se hovoří o schopnosti snížit hladinu cholesterolu, inhibovat rakovinové buňky a *Helicobacter pylori* (Spitsberg, 2005), což je bakterie napadající žaludeční sliznici a způsobující žaludeční vředy.

***Složení mléčného tuku a zastoupení jednotlivých mastných kyselin***

Mléčný tuk obsahuje více než 95 % triacylglycerolů (estery mastných kyselin a glycerolu) dále diacylglyceroly (cca 2 %), cholesterol (<0,5 %), fosfolipidy (okolo 1 %) a stopové množství volných mastných kyselin (cca 0,1 %). Mléčné triacylglyceroly jsou syntetizovány z více než 400 různých mastných kyselin, které jsou ve stopových množstvích a pouze asi 15 z nich je v koncentraci 1 % nebo vyšší (Jensen et al., 1995; Moate et al., 2007). Mastné kyseliny můžeme rozdělit podle délky uhlíkového řetězce na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (Short Chain Fatty Acids, **SCFA**) s počtem do 10 uhlíků, mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (Medium Chain Fatty Acids, **MCFA**) s 11 až 16 uhlíky a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (Long Chain Fatty Acids, **LCFA**) s více než 18 uhlíky. Dále můžeme mastné kyseliny rozdělit dle stupně nasycení (přítomnost a počet dvojných vazeb) na nasycené mastné kyseliny (neobsahují žádné dvojné vazby), mononenasycené mastné kyseliny (Mono-Unsaturated Fatty Acids, **MUFA**) s jednou dvojnou vazbou a polynenasycené mastné kyseliny (Poly-Unsaturated Fatty Acids, **PUFA**) se dvěma a více dvojnými vazbami. Nasycené mastné kyseliny představují 70 % všech mastných kyselin v kravském mléce. Kvantitativně nejdůležitější je kyselina palmitová (**C16:0**), která tvoří 30 % všech mastných kyselin v mléce. Následují kyselina stearová (**C18:0**) a myristová (**C14:0**), které tvoří 12, respektive 11 %. Deset procent nasycených mastných kyselin tvoří mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které jsou tvořeny ze 4 až 10 uhlíků. Podíl kyseliny máselné (**C4:0**) bývá okolo 4 % a kapronové (**C6:0**) cca 2,5 % ze všech mléčných mastných kyselin (MacGibbon et Taylor, 2006). Přibližně 25 % mastných kyselin v mléce tvoří MUFA, kdy nejvýznamnější podíl představuje kyselina olejová (**C18:1;*cis*-9**). PUFA jsou zastoupeny 2,3 % a hlavními zástupci jsou kyselina linolová (**C18:2; *cis*-9, 12**) a kyselina α-linolenová (**C18:3;*cis*-9, 12, 15**). Zhruba 2,7 % mléčných mastných kyselin tvoří trans-mastné kyseliny s jednou nebo více dvojnými vazbami v *trans* pozici. Hlavní trans-mastnou kyselinou je izomer kyseliny vakcenové (**C18:1;*trans*-11**). Mléčný tuk obsahuje také konjugovanou kyselinu linolovou (Conjugated Linoleic Acid, **CLA**) s několika různými izomery, kdy hlavním izomerem je kyselina rumenová (rumenic acid, **C18:2;*cis*-9, *trans*-11**), která tvoří 75 až 95 % celkové CLA (Lindmark Mansson, 2008). Variabilita poměru mastných kyselin v mléce je podmíněna několika faktory, mezi které patří plemeno, fáze laktace, bachorová fermentace, zdravotní stav, příjem energie a vlákniny v krmné dávce, doplňky tuku v krmivu a sezónní a regionální vlivy na krmivo.

***Syntéza mastných kyselin***

Mléčné mastné kyseliny pocházejí ze čtyř zdrojů (Stoop et al., 2009): **(1)** z *de novo* syntézy v mléčné žláze pochází asi 50 % mastných kyselin, **(2)** z krmiva pochází 40 – 45 %, **(3)** méně než 10 % mastných kyselin je uvolňováno lipolýzou (rozpadem) tukové tkáně, **(4)** zbytek je tvořen v bachoru biohydrogenací (nasycení dvojných vazeb), bakteriální degradací a syntézou. Navzdory faktu, že přežvýkavci absorbují ze střev zejména nasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, které mají vysoký bod tání, projevuje se u nich několik zvláštností metabolismu, kterými je zajišťováno snížení bodu tání lipidů, a to zejména v mléce. Mezi tyto zvláštnosti, které jsou podrobněji rozebrány níže, patří desaturace (vytvoření dvojné vazby) LCFA ve střevní a tukové tkáni a v tkáni mléčné žlázy pomocí enzymu **delta-9-desaturázy,** která vytváří dvojnou vazbu na delta9 pozici mastné kyseliny (počítáno od karboxylové skupiny). V mléčné žláze je to pak *de novo* syntéza SCFA, MCFA, absence elongace (prodlužování) uhlíkového řetězce a nerovnoměrná esterifikace různých mastných kyselin (Chilliard et al., 2000).

*De novo* syntéza mléčných mastných kyselin probíhá v cytosolu buněk mléčné žlázy z acetylkoenzymu A (**acetyl-CoA**), jehož prekurzorem je u přežvýkavců acetát, který vzniká bachorovou fermentací krmiva. V prvním a hlavním regulačním kroku samotné syntézy mastných kyselin je acetyl-CoA karboxylován pomocí enzymu **acetyl-CoA-karboxyláza** a vzniká malonyl-CoA. Malonyl-CoA je dále využíván jako stavební blok pro mastné kyseliny pomocí multienzymového komplexu zvaného komplex syntázy mastných kyselin. Dochází k postupnému přidávání dvou atomů uhlíků (C2) k rostoucímu řetězci mastné kyseliny. Tento proces končí u C16 (palmitoyl), který je poté uvolněn thioesterázou (deacylázou) a většinou dále esterifikován na acylglyceroly. V mléčné žláze jsou pro acylové zbytky C8, C10 a C12 zvláštní thioesterázy, které jsou u přežvýkavců přímo součástí komplexu syntázy mastných kyselin. Kromě acetátu může sloužit jako prekurzor pro syntézu mastných kyselin v mléčné žláze butyryl-CoA vzniklý z butyrátu, který stejně jako acetát vzniká bachorovou fermentací krmiva (Kaneko et al., 2008). Většina *de novo* syntetizovaných mastných kyselin je nasycená, jelikož delta-9-desaturáza má velmi nízkou aktivitu u mastných kyselin s méně než 18 uhlíky, ačkoli malý podíl C14:0 a C16:0 je desaturován na kyselinu myristolejovou (C14:1) a palmitolejovou (C16:1). *De novo* syntézou vznikají mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků a s délkou maximálně 16 uhlíků (C16), protože, oproti ostatním tkáním, v laktující mléčné žláze nedochází ke konverzi C16:0 na C18:0 pouhou elongací uhlíkového řetězce (Chilliard et al., 2000). Mléčný tuk obsahuje také mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků, jako je C15:0 a C17:0, které jsou syntetizovány bakteriální flórou. Část kyseliny palmitové (C16:0) a LCFA pochází z krmiva nebo lipolýzy tkáňových triacylglycerolů (Lindmark Mansson, 2008). Kvantifikace přechodu každé mastné kyseliny z krmiva do mléčného tuku je komplikovaná kvůli *de novo* syntéze části C16:0, desaturaci v mléčné žláze, kdy až 40 % C18:0 je pomocí delta-9-desaturázy konvertováno na C18:1 (Enjalbert et al., 1998) a biohydrogenaci v bachoru kdy pomocí bachorových mikroorganismů dochází k nasycení dvojných vazeb (C18:1, C18:2 a C18:3 🡪 biohydrogenace na C18:0).

***Složení a sekrece mastných kyselin při dodávání doplňků tuku do krmné dávky***

Predikce účinku podávání doplňků tuků je velmi obtížná vzhledem k povaze jednotlivých tuků (složení mastných kyselin), úpravě (olejnatá semena, chráněné vs. nechráněné tuky) a množství spolu s interakcemi s ostatními složkami krmiva, jelikož složení krmné dávky má významný vliv na biohydrogenaci v bachoru. Důvodem manipulace se složením mastných kyselin byly zejména snahy o zlepšení nutriční kvality mléka pro spotřebitele, které se týkaly především snížení podílu nasycených mastných kyselin a navýšení podílu polynenasycených mastných kyselin podáváním různých forem doplňků tuku (chráněné a nechráněné oleje, olejnatá semena, duodenální infúze mastných kyselin).

Pokusy o snížení podílu saturovaných mastných kyselin ukázaly, že podíl kyseliny máselné (C4:0) nebyl nikdy signifikantně snížen, spíše měl naopak tendenci se navyšovat (Enjalbert et al., 1998; Palmquist et al., 1993), pravděpodobně z důvodu zachování tekutosti mléčného tuku, jelikož kyselina máselná má nízký bod tání. Podíl mastných kyselin s délkou řetězce C6 až C8 se snížil pouze tehdy, když nechráněný olej ovlivňoval bachorové funkce. Poměry C4:0, C6:0 a C8:0 se při podávání chráněných tuků či duodenálních infúzí neměnil (Christensen et al., 1994; Drackley et al., 1992). Pokles poměru C16:0 k C18:0 může být přínosný pro lidské zdraví. Podíl C16:0 byl při podávání doplňků tuku vždy snížen, samozřejmě vyjma podávání doplňků s vysokým obsahem palmového tuku, navíc zkrmování C16:0 snížilo *de novo* syntézu (Loften et al., 2014). Dalším cílem pro lidské zdraví a mlékařskou technologii (zlepšení tekutosti tuků) bylo snížení poměru C18:0 k C18:1;*cis*-9, přičemž prostředkem k dosažení tohoto cíle je krmení oleamidu nebo účinně chráněných olejů nebo semen bohatých na kyselinu olejovou (řepka, sója). Zároveň krmné doplňky bohaté na kyselinu stearovou nezvyšují její množství v mléčném tuku, protože velká část C18:0 je desaturována na kyselinu olejovou. Poměr C18:0 k C18:1;*cis*-9 se naopak výrazně zvyšuje krmením nechráněných semen bavlníku, pravděpodobně v důsledku inhibice delta-9-desaturázy kyselinou cyklopropenovou z bavlníkových semen (Chilliard et al., 2000).

Esenciální polynenasycené mastné kyseliny, kyselina linolová (C18:2) a linolenová (C18:3), se v tkáních přežvýkavců nesyntetizují, proto je jejich koncentrace v mléce závislá na výživě. Tyto mastné kyseliny slouží jako prekurzory pro syntézu ostatních PUFA (Rodriguez-Cruz et al., 2006). Podíl PUFA, které projdou z bachoru dál do trávicího traktu, může být zvýšen pomocí krmiv bohatých na PUFA a faktory, které je chrání před mikrobiální biohydrogenací. Podíl kyseliny linolové v mléce lze zvýšit asi o 3 % přidáváním světlicového oleje a směsi bavlníkového a světlicového oleje. Nicméně zakomponování kyseliny linolové do mléka je nižší než do masa, což je zřejmě dáno specifickým využitím této kyseliny svalovými fosfolipidy (Demeyer et Doreau, 1999). Obdobně se může při rozumném podávání chráněného lněného oleje zvýšit obsah kyseliny linolenové až na 6 %. Hlavním zdrojem C18:3 je především zelená píce, proto u krav na pastvě může být koncentrace kyseliny linolenové až čtyřikrát vyšší než u krav krmených konzervovanými krmivy. Záleží ovšem také na druhu porostu a ročním období. Nejvyšší podíl C18:3 v píci je na jaře a ke konci podzimu, proto se může stát, že i u pasoucích se krav nebude nárůst kyseliny linolenové v mléce žádný (Lawless et al., 1998). Mezi nezelenými krmivy je lněné semeno jediné, které obsahuje významné množství kyseliny linolenové. Podáváním lněného semene se zvýšil podíl C18:3 až o 1,5 % z celkových mastných kyselin v mléce. Podávání čistého nechráněného lněného oleje ovšem koncentraci C18:3 nezvyšuje (Kelly et al., 1998), což je dáno pravděpodobně tím, že celé lněné semeno je lépe chráněno před biohydrogenací v bachoru než samotný olej. Nicméně lněné semeno má negativní účinek na trávení vlákniny (Brodiscou et al., 1994), takže potenciální pozitivní účinky na zvýšení C18:3 jsou za cenu snížení energetické hodnoty krmiva, proto se lněné semeno příliš nevyužívá. Svou roli hraje i jeho cena. Byly také provedeny pokusy o zvýšení pro lidskou výživu esenciálních mastných kyselin eikosapentanové (C20:5), dokosapentaenové (C22:5) a dokosahexaenové (C22:6) v mléce, čehož lze dosáhnout přídavkem rybího oleje, který má ovšem velmi negativní vliv na chuť mléka (Lacasse et al., 1998). Další důležitá mastná kyselina ve výživě člověka je konjugovaná kyselina linolová (CLA, izomery C18:2). Buňky mléčné žlázy a tukové tkáně jsou schopné syntetizovat izomery CLA z kyseliny vakcenové a dalších izomerů C18:1. Pro zvyšování CLA a jejích prekurzorů v mléce jsou účinné zejména rostlinné oleje s vysokým obsahem kyseliny linolové (slunečnicový, řepkový, sójový) a pastevní porost v rané fázi růstu (Chilliard et al., 2000).

**Vztah k energetické bilanci dojnic**

***Lipomobilizace a její vliv na obsah mastných kyselin v mléce***

Primární funkce tukové tkáně je uchování energetické zásoby ve formě triacylglycerolů, které jsou využívány v období nedostatku energie. Ten nastává nejčastěji po porodu a v rané laktaci, kdy jsou energetické požadavky vyšší než příjem energie a tak dochází k negativní energetické bilanci (**NEB**). Při NEB krávy musí mobilizovat vlastní tukové zásoby (lipomobilizace), ze kterých se posléze uvolňují neesterifikované (volné) mastné kyseliny (**NEFA**), resp. LCFA do krevního oběhu (Grummer et al., 2008). NEFA mohou být využity mléčnou žlázou pro syntézu mléčného tuku nebo periferními tkáněmi jako zdroj energie nebo jsou transportovány do jater, kde jsou dále metabolizovány. V játrech mohou být oxidovány na ATP (zdroj energie), ale při nedostatku energie (typická situace při NEB) jsou NEFA oxidovány neúplně za vzniku ketolátek, které jsou využívány jako alternativní zdroj energie. Při jejich vysoké koncentraci však dochází k patologickému stavu zvanému ketóza. Při překročení oxidační kapacity jater jsou NEFA reesterifikovány na triacylglyceroly, které jsou ve formě lipoproteinů o velmi nízké hustotě (**VLDL**) transportovány do mimojaterních tkání. Při vysokých koncentracích NEFA však dojde k překročení i exportní kapacity jater, vzniklé triacylglyceroly se nemohou dále včleňovat do VLDL, začnou v játrech kumulovat a dochází k jaterní steatóze (Drackley et al., 2001; Gross et al., 2013; Sun et al., 2016).

V tukové tkáni dominují zejména C16:0, C18:0 a C18:1, přičemž vysoká koncentrace C18:1 je dána nárůstem aktivity delta-9-desaturázy v tukové tkáni (Smith et al., 2006). Aktivita tohoto enzymu je pravděpodobně adaptivní mechanismus sloužící k utilizaci dominantních nasycených mastných kyselin absorbovaných ze střeva (Loften et al., 2014). Při lipomobilizaci tedy roste jejich koncentrace v krevním oběhu. Takto uvolněné LCFA, zejména kyselina olejová, jsou do velké míry přenášeny z krve do mléčné žlázy a jsou inkorporovány do mléčného tuku (Tyburzcy et al., 2008). Bylo prokázáno, že LCFA pocházející z krve a zabudované do mléčného tuku inhibují *de novo* syntézu SCFA a MCFA (C6:0 až C16:0), jelikož snižují aktivitu acetyl-CoA-karboxylázy, která je primárním regulačním krokem syntézy mastných kyselin, jak je zmíněno výše (Palmquist et al., 1993; Stoop et al., 2009; Gross et al., 2011). Syntéza kyseliny máselné (C4:0) však není inhibována vůbec, jelikož tato se tvoří dvěma cestami nezávislými na acetyl-CoA-karboxyláze (Palmquist et al., 1993). Při NEB se tedy do mléka nejvíce dostávají C16:0, C18:0 a C18:1. Nicméně s C16:0 je situace komplikovanější, protože kyselina palmitová se tvoří také *de novo*, ale při NEB je syntéza inhibována, jak je vysvětleno výše, a zároveň při nadbytku energie v suchostojném období (> 150 %) se snižuje oxidace palmitátu, proto se C16:0 při překrmování v období stání na sucho poté kumuluje v játrech (Litherland et al., 2011). Oproti tomu C18:0 při NEB není kumulována ve tkáních, ale je metabolizovaná v játrech či svalech na energii nebo je sekretována do mléka (Sato et Inoue, 2006).

Velký vliv na zabudování konkrétních mastných kyselin do mléčného tuku má také struktura nově utvářených triacylglycerolů v mléce, které zodpovídají, mimo jiné, za viskozitu mléka. Krávy totiž selektivně včleňují mastné kyseliny tak, aby udržely optimální tekutost mléka. Pokud při NEB roste koncentrace mastných kyselin o vysokých teplotách tání (C16:0, C18:0), pak dochází ke stimulaci obsazování pozic glycerolu mastnými kyselinami o nízkých teplotách tání (C4:0, jejíž *de novo* syntéza není inhibována, a C18:1) a tvoří se triacylglyceroly s teplotou tání ideální pro udržení tekutosti mléka (Gross et al., 2011; Loften et al., 2014).

***Diagnostika NEB pomocí mastných kyselin v mléce***

Z předchozího vyplývá, že vysoký obsah C18:0 a C18:1 a zároveň snížená koncentrace *de novo* syntetizovaných mastných kyselin by mohly napomáhat v diagnostice NEB. Několik studií se zabývalo vztahy mezi koncentrací NEFA v krvi a obsahem mastných kyselin v mléce, přičemž koncentrace NEFA ≥ 0,6 mmol/l v časné laktaci je považovaná jako hraniční pro diagnostiku NEB a poukazuje na vyšší riziko metabolických poruch (Adewuyi et al., 2005; Ospina et al., 2010). Ve studii Jorjong et al. (2014) testovali vztah mezi sérovými NEFA a C18:1;*cis*-9 v mléce. Zjistili, že 64 % krav s rizikovou koncentrací NEFA v séru mělo zároveň obsah kyseliny olejové v mléce 24 g/100 g tuku nebo vyšší, nicméně samotná korelace mezi NEFA a kyselinou olejovou byla r = 0,38, takže potenciál k přímé predikci je spíše slabý. Naopak těsnou korelaci mezi sérovými NEFA a C18:1;*cis*-9 v mléce našli Gross et al. (2011) a Mäntysaari et al. (2019), v první studii byla korelace r = 0,77, a ve druhé r = 0,73 při použití mléka z večerního dojení a r = 0,64 při použití mléka z ranního dojení. Podobné vztahy byly zjištěny i mezi NEFA a LCFA v mléce (Mäntysaari et al., 2019), kde byla korelace r = 0,70 při použití mléka z večerního dojení.

**Závěr**

Mastné kyseliny mléčného tuku mají význam nejen pro konzumenty mléka a mléčných výrobků, ale lze je využít také pro diagnostiku NEB u dojnic a problémů s ní souvisejících. Jako nejúčelnější pro tyto účely se jeví sledovat C18:0, C18:1 a C16:0. Mléko je navíc, na rozdíl od krevních vzorků, snadno získatelný materiál pro biochemickou analýzu. Velkou výhodou je, že všechny mastné kyseliny v mléce lze určit pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), což je metoda běžně používaná pro analýzu mléka při kontrole užitkovosti. Běžné měsíční intervaly vzorkování mléka však nemusí nutně pokrývat všechna zvířata s NEB a přidruženými problémy. Metabolický stav se může měnit rychle, proto k zajištění včasného odhalení zdravotních poruch na úrovni jednotlivých zvířat by bylo nutné vzorky odebírat častěji, zejména na počátku laktace.

**Literatura**

Adewuyi, A. A., Roelofs, J. B., Gruys, E., Toussaint, M. J. M.,Van Eerdenburg, F. J. C. M. 2006. Relationship of plasma nonesterified fatty acids and walking activity in postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 89, 2977–2979.

Broudiscou, L., Pochet, S., Poncet, C. 1994. Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate-free and refaunated sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 49, 189–202.

Demeyer, D., Doreau, M. 1999. Targets and means for altering meat and milk lipids. *Proceedings of the Nutrition Society*. 58, 593–607.

Drackley, J. K., Klusmeyer, T. H., Trusk, A. M., Clark, J. H. 1992. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 75, 1517–1526.

Drackley, J. K., Overton, T. R., Douglas, G. N. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acids metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*. 84 (E Suppl.). E100–E112.

Enjalbert, F., Nicot, M., Bayourthe, C., Moncoulon, R. 1998. Duodenal infusions of palmitic, stearic or oleic acids differently affect mammary gland metabolism of fatty acids in lactating dairy cows. *The Journal of Nutrition*. 128, 1525–1532.

Enjalbert, F., Nicot, M., Bayourthe, C., Moncoulon, R. 2000. Effects of duodenal infusions of palmitic, stearic, or oleic acids on milk composition and physical properties of butter. *Journal of Dairy Science*. 83, 1428–1433.

Gross J., Van Dorland, H. A., Brukmaier, R. M., Schwarz, F. J. 2011. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *Journal of Dairy Research.* 78, 479–488.

Gross, J. J., Schwarz, F. J., Eder, K., van Dorland, H. A., Bruckmaier, R. M. 2013. Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *Journal of Dairy Science*. 96, 5008–5017.

Grummer, R. R. 2008. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *The Veterinary Journal*. 176, 10–20.

Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R. M., Doreau, M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polysaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de zootechnie*. 47, 181–205.

Christensen, R. A., Drackley, J. K., LaCount, D. W., Clark, J. H. 1994. Infusion of four long-chain fatty acid mixtures into the abomasum of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 77, 1052–1069.

Jensen, R. G., Ferris, A. M., Lammi-Keefe, C. J. 1991. The composition of milk fat. *Journal of Dairy Science*. 74, 3228–3243.

Jorjong, S., Van Knegsel, A. T. M., Verwaeren, J., Val Lahoz, M., Bruckmaier, R. M., De Baets, B., Kemp, B., Fievez, V. 2014. Milk fatty acids as possible biomarkers to early diagnose elevated concentrations of blood plasma nonesterified fatty acids in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 97. 7054 – 7064.

Kaneko, J. J., Harvey J. W., Bruss, M. 2008. Clinical biochemistry of domestic animals. 6th ed. Academic Press/Elsevier, Boston, US-MA.

Kelly, M. L., Berry, J. R., Dwyer, D. A., Griinari, J. M., Chouinard, P. Y., Van Amburgh, M. E., Bauman, D. E. 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*. 128, 881–885.

Lacasse, P., Kennelly, J. J., Ahnadi, C. E. 1998. Feeding protected and unprotected fish oil to dairy cows: II Effect on milk fat composition. *Journal of Animal Science*. 76 (Suppl. 1), 231.

Lawless, F., Murphy, J. J., Harrington, D., Devery, R., Stanton, C. 1998. Elevation of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary suppplementation. *Journal of Dairy Science*. 81, 3259–3267.

Lindmark Mansson, H. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. Food and nutrition research. 52, 1821.

Litherland, N. B., Dann, H. M., Drackley, J. K. 2011. Prepartum nutrient intake alters palmitate metabolism by liver slices from peripartal dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 94, 1928–1940.

Loften, J. R., Linn, J. G., Drackley, J. K., Jenkins, T. C., Soderholm, C. G., Kertz, A. F. 2014. Invited review: Palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 97, 4661–4674.

MacGibbon, A. K. H., Taylor, M. W. 2006. Composition and structure of bovine milk lipids. Pages 1–42 in Advanced Dairy Chemistry. Vol. 2: Lipids. 3rd ed. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, ed. Springer, New York, NY.

Mana, P., Goodyear, M., Bernard, C., Tomioka, R., Freire-Garabal, M., Linares, D. 2004. Tolerance induction by molecular mimicry: Prevention and suppression of experimental autoimmuneencephalomyelitis with the milk protein butyrophilin. *International Immunology*. 16, 489–499.

Mäntysaari, P., Mäntysaari, E. A., Kokkonen, T., Mehtiö, T., Kajava, S., Grelet, C., Lidauer, M. H. 2019. Body and milk traits as indicators of dairy cow energy status in early lactation. *Journal of Dairy Science*. 102, 7904–7916.

Martin, H. M., Hancock, J. T., Salisbury, V., Harrison, R. 2004. Role of xanthineoxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infection and Immunity*. 72, 4933–4939.

Mather, I. H. 2000. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *Journal of dairy science*. *83*, 203–247.

Mather, I. H. 2011. Milk Lipids – Milk Fat Globule Membrane, in Fuquay, J.W. (ed.) Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press, pp. 680–690.

Moate P. J., Chalupa, W., Boston. R. C., Lean, I. L. 2007. Milk fatty acids. I. Variation in the concentration of individual fatty acids in bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 90. 4730–4739.

Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T, Overton, T. R. 2010. Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science*. 93, 1596–1603

Palmquist, D. L., Beaulieu, A. D., Barbano, D. M. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science*. 76, 1753–1771.

Rico, J. E., Allen, M. S., Lock, A. L. 2014. Compared with stearic acid, palmitic acid increased the yield of milk fat and improved feed efficiency across production level of cows. *Journal of Dairy Science*. 97, 1057–1066.

Rodriguez-Cruz, M., Tovar, A. R., Palacios-González, B., del Prado, M., Torres, N. 2006. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of Δ5 and Δ6 desaturases, SREBP-1, PPARα, and PGC-1. *Journal of lipid research*. 47, 553-560.

Sato, H., Inoue, A. 2006. Decrease in stearic acid proportions in adipose tissues and liver lipids in fatty liver of dairy cows. *Animal Science Journal*. 77, 347–351.

Smith, S. B., Lunt, D. K., Chung, K. Y., Choi, C. B., Tume, R. K., Zembayashi, M. 2006. Adiposity, fatty acid composition, and delta-9 desaturase activity during growth in beef cattle. *Animal Science Journal*. 77, 478–486.

Spitsberg, V. L. 2005. Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of dairy science*. 88, 2289– 2294.

Stoop, W. M., Bovenhuis, H., Heck, J. M. L., Van Arendonk, J. A. M. 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*. 92, 1469–1478.

Sun, F., Cao, Y., Cai, C., Li, S., Yu, C., Yao, J. 2016. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PLoS ONE*. 11, e0160659.

Tyburczy, C., Lock, A. L., Dwyer, D. A., Destaillats, F., Mouloungui, Z., Candy, L., Bauman, D. E. 2008. Uptake and utilization of trans octadecenoic acids in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 91, 3850–3861.

Wu, Z., Ohajuruka, O. A., Palmquist, D. L. 1991. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 74, 3025–3034.