

- NOUWS J.F.M., VAN EGMOND H., SMULDERS I., LOEFFEN G., SCHOUTEN J., STEGEMAN H. (1999): Antimicrobial assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels. *International Dairy Journal*, 9, s. 85-90.
- NRL ČR (2008): *Metodický pokyn na stanovení reziduí inhibičních látek ve tkáních, mléce, vejcích a potravinách*. Jihlava, SVÚ Jihlava, 14 s.
- OKERMAN L., CROUBELS S., CHERLET M., DE WASH K., DE BACKER P., VAN HOOFF J. (2004): Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues. *Food Additives and Contaminants*, 21, s. 145-153.
- STAR PROTOCOL (2002): Screening test for antibiotic residues. Fougères, Laboratoire D'Etudes et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants. *Community Reference Laboratory*, 14 s.
- SVS ČR, SVS SR (1991): *Veterinární laboratorní metodiky - Hygienu potravin*. Bratislava, ÚVIO, 130 s.

Přijato do tisku 13. 9. 2014  
Lektorováno 1. 10. 2014

## OBSAH IMUNOGLOBULINŮ JAKO INDIKÁTOR KVALITY KOLOSTRA

**Volodymyr Skalka, Markéta Vašíčková, Ladislav Čurda**  
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav mléka, tuků a kosmetiky

### Content of immunoglobulins as quality indicator of colostrum

#### Abstrakt

Vzhledem k vysokému obsahu biologicky aktivních látek se kolostrum stává důležitou surovinou pro výrobu potravních doplňků a funkčních potravin. Indikátorem kvality mleziva je vysoký obsah imunoglobulinů, především IgG1. Metody pro jejich stanovení jsou nezbytné pro kontrolu suroviny, průběhu zpracování i finálních produktů. Cílem práce bylo ověřit vybrané metody a posoudit je z hlediska shody se standardní metodou radiální imunodifuze (RID), rychlosti a cenové dostupnosti. Pro RID se osvědčil kit BindingSite. Měření hustoty a indexu lomu lze použít pro rychlé a levné orientační stanovení. Byly zjištěny značné rozdíly mezi výsledky z RID a SDS-PAGE. Za perspektivní lze považovat vylučovací chromatografii (SEC), která vykazuje dobrou shodu s RID ( $R^2=0,9501$ ), vyžaduje malé množství vzorku a je poměrně rychlá.

**Klíčová slova:** mlezivo, imunoglobuliny, radiální imunodifuze, index lomu, hustota, vylučovací chromatografie

#### Abstract

With respect to high content of biologically active components colostrum becomes important raw material for production of food supplements and new functional foods. Indicator of colostrum quality is high content of immunoglobulins, first of all IgG1. Methods for their estimation are essential for control of raw material, processing and final products. The aim of this work was to verify

selected methods and evaluate them from the point of view of agreement with radial immunodiffusion (RID), time and price of analysis. Kit BindingSite proved successful for RID. Density and refraction measurement is useful for fast and inexpensive estimation of immunoglobulin concentration. Rather big differences were found between results from RID and SDS-PAGE. Size exclusion chromatography (SEC) seems to be perspective for IgG analysis. It has good agreement with RID ( $R^2=0,9501$ ). SEC also needs small amount of sample and it is rather fast.

**Key words:** colostrum, immunoglobulins, radial immunodiffusion, refraction index, density, size exclusion chromatography

#### Úvod

Kolostrum (mlezivo) je sekret mléčné žlázy savců produkováný v prvních hodinách po porodu. Kromě toho, že je nezbytnou prvotní potravou mláďete, v posledních letech vzrůstá zájem o jeho využití v doplňcích stravy a funkčních potravinách. Jde o tekutinu bohatou na živiny i nejrůznější biologicky aktivní látky. Jednou ze základních složek mleziva jsou imunoglobuliny, které se výrazně podílejí na rozvoji základní obranyschopnosti mláďete. Jejich obsah je dosti variabilní, po porodu velice rychle klesá, rychle se mění i obsah dalších biologicky aktivních látek. Vysoká cena suroviny i produktů z mleziva může vést k tomu, že se využívá i mlezivo z pozdějších nádojů. Obsah imunoglobulinů může proto sloužit jako indikátor kvality mleziva při nákupu suroviny zpracovateli i pro kontrolu finálních produktů. Cílem práce bylo ověřit dostupné metody, které by mohly sloužit ke stanovení obsahu imunoglobulinů v kolostru.

#### Struktura a vlastnosti imunoglobulinů

Imunoglobuliny tvoří komplexní skupinu látek produkovanou plazmatickými buňkami, tzv. B lymfocyty. Tyto látky se výrazně podílejí na vzniku a podpoře imunity. Imunoglobuliny se vyskytují jako monomery nebo oligomery základního Y tvaru. Ten se skládá ze čtyř polypeptidových řetězců: dvou identických lehkých řetězců (L) s molekulovou hmotností kolem 25 kDa a dvou identických těžkých řetězců (H) s molekulovou hmotností v rozmezí 55 kDa - 76 kDa v závislosti na třídě imunoglobulinu. Struktura Y tvaru je stabilizována, pomocí disulfidových vazeb, které jsou inter- i intramolekulární. Těžký H řetězec je tvořen konstantní (C) oblastí, která zahrnuje 3 - 4 domény obsahující přibližně 110 aminokyselin, a variabilní oblast (V) na N-konci. Lehké řetězce jsou typu  $\lambda$  nebo  $\kappa$  (u hovězích imunoglobulinů převažuje z 90 %  $\lambda$  typ), jsou tvořeny z jedné domény C na C-konci a jedné V domény na N-konci. Z variabilní domény L a H řetězce na koncích Y tvaru vzniká antigenní vazebné místo. Podle druhu konstantní oblastí těžkých řetězců rozlišujeme několik tříd a podtříd imunoglobulinů: IgG (podtřídy IgG1, IgG2), IgA, IgM, IgE a IgD. IgG tvoří monomery (cca 150 kDa), IgA dimery, IgM pentamery (Farrell a kol., 2004; Madureira a kol. 2007).

Imunoglobuliny společně s laktoferinem, lysozymem a laktoperoxidasou, tvoří velmi důležitý antimikrobiální a antivirový ochranný systém mléka a mleziva. Hlavní biologickou funkcí imunoglobulinů společně s proteiny tzv. komplementu v kravském mlezivu je bezprostředně po porodu dodat imunologickou ochranu mláděti. Imunoglobuliny tvoří asi 1 % z celkových mléčných bílkovin a asi kolem 6 % ze všech syrovátkových bílkovin. Nejvíce zastoupenou třídou imunoglobulinů v kravském mléce a mlezivu jsou IgG s podílem 80-90 %. Nejvyšší koncentrace těchto Ig se nachází v mlezivu první den po porodu (20 - 200 mg.mL<sup>-1</sup>). Během dalších dnů jejich obsah klesá na 0,15 - 0,80 mg.mL<sup>-1</sup> (Mehra a kol., 2006). IgG má několik funkcí, podílí se na opsonizaci (podpora fagocytózy imunitních buněk), slouží jako prevence vazby patogenů na endoteliální výstelky, inhibuje bakteriální metabolismus tím, že blokuje enzymy, způsobuje aglutinaci bakterií a neutralizuje toxiny a viry. Na koncentraci IgG v kolostru mají vliv různé faktory, jako např. hormonální a genetické faktory, počet laktací a výživa (Gomes a kol., 2011).

## Metody pro stanovení imunoglobulinů

V literatuře patří nejčastěji zmiňované metody stanovení imunoglobulinů různé imunochemické metody (především RID a ELISA) a měření hustoty, méně často se používají chromatografické metody (kapalinová chromatografie v různých modifikacích RP-HPLC, SEC, IEC, afinitní), elektroforetické metody (SDS-PAGE, CZE) nebo nefelometrie. K novějším technikám patří biosenzory založené na povrchové plasmonové rezonanci (Gapper a kol., 2007).

## Materiál a metody

Kravské mlezivo pocházelo ze ZD Kojčice a kozí mlezivo poskytla firma Betula pendula s.r.o. Vzorky byly dodány a skladovány v zamraženém stavu při -18 °C. Byly odebírány pouze vzorky z prvního nádoje.

Imunoglobuliny byly analyzovány metodou radiální imunodifuze (RID) pomocí kitů BindingSite (Velká Británie) a IDBiotech (Francie). Principem metody RID je difuze vzorku agarosovým gelem a následná interakce analyzovaného proteinu s navázanou specifickou protilátkou. Po vytvoření vazby antigen-protilátka se vytvoří precipitační kruh, jehož průměr slouží k přepočtu koncentrace imunoglobulinů v analyzovaném vzorku. Po aplikaci vzorku jsou agarosové destičky kultivovány v případě IDBiotech po dobu 24 h/37 °C, kit BindingSite je kultivován 72 h při 25 °C.

Pro měření hustoty byl použit automatický hustoměr Densito 30PX (Mettler-Toledo, Švýcarsko), index lomu byl měřen refraktometrem DR301-95 (Krüss, Německo).

Pro charakteristiku vzorku mleziva byla vedle elektroforezy SDS-PAGE použita metoda vylučovací (size exclusion) chromatografie (SEC-HPLC). Před nanesením byl z 200 µL mleziva oddělen tuk a kasein pomocí kyselého

sražení kyselinou octovou a octanem sodným při pH 4,6. Po odstředění a filtraci přes mikrofiltr (PVDF, póry 0,22 µm) bylo 25 µL naneseno na kolonu BioSep SEC S3000 (Phenomenex, USA). Jako mobilní fáze byl použit 100 mM fosfátový pufr pH 6,8 s průtokem 0,75 mL.min<sup>-1</sup> při 25 °C. Eluované bílkoviny byly detekovány při 280 nm.

## Výsledky a diskuse

### Radiální imunodifuze

Při stanovení imunoglobulinů v kravském mlezivu radiální imunodifuzí byly na 28 vzorcích mleziva porovnány kity dvou firem, IDBiotech a BindingSite. Každý vzorek byl analyzován dvakrát. Mezi prvním a druhým měřením koncentrace imunoglobulinů stejných vzorků mleziva kitem IDBiotech se objevila poměrně výrazná odchylka. U tohoto kitu mají vzniklé precipitační kruhy málo ostré okraje, a proto mohou být odchylky způsobené méně přesným odečtem. Při vizuální kontrole agarosových destiček byly rovněž vidět nerovnosti ve struktuře gelu, které mohou ovlivnit průběh precipitační reakce mezi imunoglobulinem a protilátkou. Ve srovnání s kitem BindingSite, jsou výsledky získané na destičkách IDBiotech přibližně poloviční. Kit BindingSite umožňuje kvantifikaci imunoglobulinů s využitím dvou metod. První metoda pracuje s kalibrační řadou, druhá metoda vychází z přepočítávací tabulky. Porovnáním hodnot získaných u stejných vzorků oběma metodami nebyl objeven statisticky významný rozdíl ve výsledcích. Proto pro další analýzy byla již využita jen metoda bez užití kalibrační řady. Při opakovaném měření nebyly odchylky mezi měřeními statisticky významné (F a t test) na rozdíl od kitu IDBiotech. Hodnoty koncentrace imunoglobulinů ve vzorcích kravského mleziva získané RID jsou shrnuty v tabulce 1.

**Tab. 1** Koncentrace imunoglobulinů v kravském mlezivu

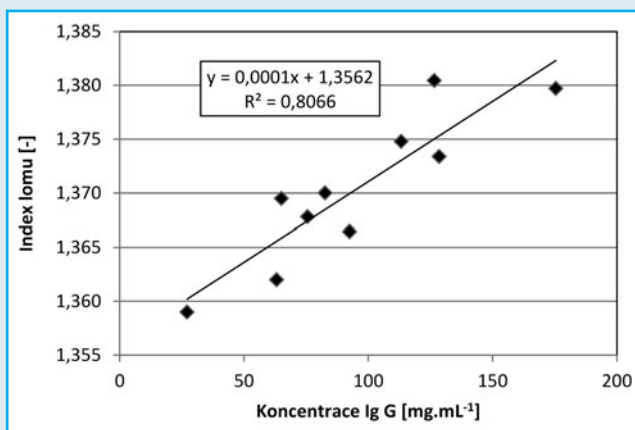
	Rozeptí	Medián	Průměr	s	Výrobce kitu
IgG [mg.mL <sup>-1</sup> ]	21,2-93,8	47,1	48,5	18,6	IDBiotech
IgG [mg.mL <sup>-1</sup> ]	18,4-240,5	88,5	96,2	49,7	BindingSite

s - výběrová směrodatná odchylka

Elfstrand a kol. (2002) uvádějí průměrnou hodnotu obsahu IgG stanoveného pomocí kitu BindingSite ve vzorcích prvního nádoje 90±7,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Biemann a kol. (2010) využili rovněž RID pro stanovení imunoglobulinů a uvádějí průměrný obsah 94,4 mg.mL<sup>-1</sup>, Rivero a kol. (2012) 93,3 mg.mL<sup>-1</sup>. Hodnoty naměřené pomocí kitu BindingSite jsou v dobré shodě s publikovanými údaji.

### Stanovení hustoty a indexu lomu

Vzhledem k tomu, že metoda RID je časově náročná a cena kitů poměrně vysoká, byly ověřovány další metody, které by poskytly výsledky rychleji s nižšími náklady. Použitý hustoměr Densito 30PX byl zapůjčen jen na krátkou dobu, proto bylo provedeno orientační měření jen u 5 vzorků kravského a 5 vzorků kozího mleziva, každý byl změřen 2x. Kravské kolostrum mělo rozmezí koncentrací



Obr. 1 Závislost indexu lomu na koncentraci IgG

IgG podle RID 63 až 129 mg.mL<sup>-1</sup> (pro kozí mlezivo nejsou data z RID k dispozici). Rozsah naměřených hustot byl 1,0516-1,0705 g.L<sup>-1</sup> pro kravské mlezivo a 1,0301-1,0495 g.L<sup>-1</sup> pro kozí mlezivo. Byl získán poměrně vysoký koeficient determinace (0,9571; kravské mlezivo), nebyl potvrzen výrazně užití vztah k obsahu bílkovin, který se uvádí v literatuře (Morin a kol., 2011). Práce s digitálním hustoměrem je rychlá a pohodlná, v praxi se zatím častěji uplatňuje kolostrometr - skleněný hustoměr na mlezivo, který však vyžaduje velký objem vzorku. Hustota mleziva je značně závislá na teplotě, měření je proto nutné provádět při konstantní teplotě. Měření bez kontroly teploty bylo jedním z důvodů horších výsledků ( $R^2=0,469$ ) získaných na velkém souboru 915 vzorků (Pritchett a kol., 1994).

Index lomu mleziva podobně jako hustota se vyznačuje dobrou korelací s obsahem bílkovin, respektive jejich hlavní složkou v mlezivu imunoglobulinů. Měření indexu lomu může tedy sloužit jako další rychlá metoda pro odhad obsahu IgG. Na obr. 1 je uvedena závislost indexu lomu na koncentraci IgG stanovených RID, koeficient determinace  $R^2$  je nižší (0,8066) než pro hustotu, v obou případech je však soubor vzorků poměrně malý. Těsnější vztah byl v tomto případě nalezen mezi indexem lomu a obsahem hrubých bílkovin ( $R^2=0,9736$ ). Pro 5 vzorků byla změřena rovněž refrakce kyselá syrovátky připravené z mleziva, v tomto případě byl koeficient determinace výrazně vyšší (0,9799). Metoda vyžaduje pouze malé množství vzorku (0,25 až 1 mL), snáze se rovněž kompenzuje vliv teploty. Je však vhodné eliminovat vliv kaseinu a tukových kuliček.

### SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforéza se ukázala být vhodnou metodou pro kvalitativní analýzu proteinů kravského i kozího mleziva. Spojením profilu markeru bílkovin (standardu) a zón jednotlivých separovaných proteinů lze základní bílkoviny identifikovat. Cílem experimentu bylo ověřit, zda lze intenzitu elektroforetických zón použít pro kvantitativní vyhodnocení obsahu IgG. Vzorek kravského mleziva se známým obsahem IgG stanoveným RID byl nanášen v několika ředěních a použit pro kalibraci

metody. Gely byly vyhodnoceny po naskenování programem SigmaGel (Jandel Scientific, Německo). Při porovnání hodnot koncentrace imunoglobulinů získaných pomocí SDS-PAGE elektroforézy a RID (Tab. 2) je zřejmé, že hodnoty koncentrace imunoglobulinů se u některých vzorků značně liší. Důvodem může být např. rozdílné vybarvení v důsledku různé glykosylace imunoglobulinů.

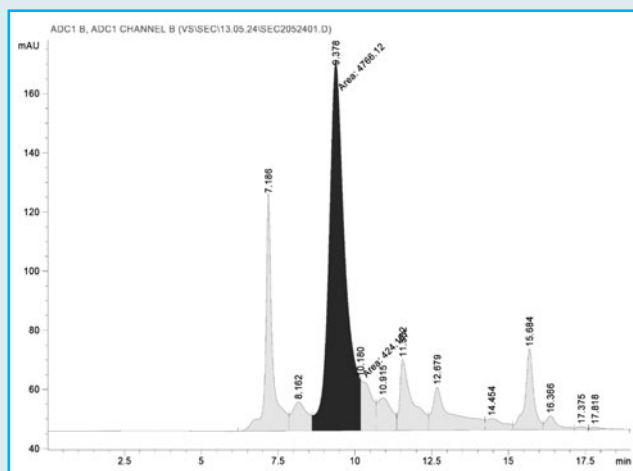
Tab. 2 Porovnání hodnot obsahu imunoglobulinů získaných SDS-PAGE metodou a RID

Vzorek	SDS-PAGE		RID		$\Delta c$ Ig
	c (Ig) [mg.mL <sup>-1</sup> ]		c (Ig) [mg.mL <sup>-1</sup> ]		
	p	s	p	s	
60	57,49	7,10	63,13	11,30	-5,64
65	61,31	8,56	64,50	5,32	-3,19
78	76,69	4,35	132,00	50,07	-55,31
84	64,89	4,75	113,56	46,19	-48,67
72	70,66	8,24	54,88	3,32	15,78
81	62,17	5,52	69,13	0,66	-6,96
83	71,71	6,84	82,63	15,73	-10,92
86	105,81	4,99	240,50	NAa	-134,69

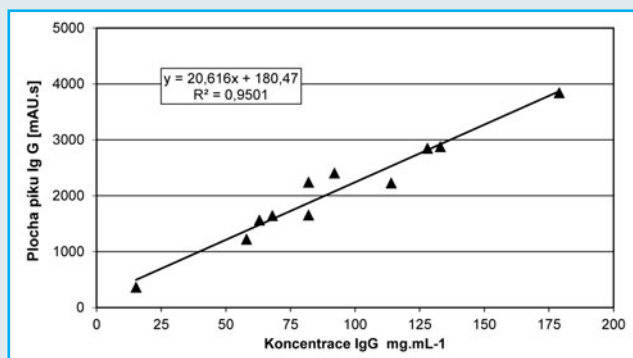
p - průměr, s - směrodatná odchylka

### Chromatografické stanovení imunoglobulinů

Příklad elučního profilu bílkovin syrovátky kravského kolostra je na obr. 2. Z obr. 3 je patrná dobrá korelace SE



Obr. 2 SEC-HPLC chromatogram bílkovin syrovátky z kravského mleziva. IgG odpovídá tmavě vyznačený pík s elučním časem 9,4 min.



Obr. 3 Korelace SE chromatografie s výsledky RID

chromatografie s výsledky RID. Metoda vyžaduje minimální množství vzorku, je poměrně rychlá a umožňuje analyzovat větší série vzorků. Nevýhodou je nezbytná investice do přístrojového vybavení.

## Závěr

V práci bylo ověřeno několik metod pro stanovení imunoglobulinů. Standardní metodou je radiální imunodifuze, je však časově i z hlediska nákladů náročná. Z metod založených na měření fyzikálních vlastností se jeví jako perspektivní měření indexu lomu po odstranění tuku a kaseinu, po ověření na větším množství vzorků by mohla být vhodná pro rutinní kontrolu mleziva s krátkou dobou analýzy i minimálními náklady. Pro detailnější kontrolu mleziva lze doporučit metodu SEC.

## Poděkování:

Práce vznikla s podporou MZe, projekt č. OJ1210376.

## Použitá literatura:

- BIELMANN V., GILLAN J., PERKINS N.R., SKIDMORE A.L. GODDEN S., LESLIE K.E. (2010): An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 93, s. 3713-3721.
- ELFSTRAND L., LINDMARK-MANSSON H., PAULSSON M., NYBERG L., AKESSON B. (2002): Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. *International Dairy Journal*, 12, s. 879-887.
- FARRELL H.M., JIMENEZ-FLORES R., BLECK G.T., BROWN J.E., CREAMER L.K., HICKS C.L., HOLLAE C.M., NG-KWAI-HANG K.F., SWAISGOOD H.E. (2004): Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87, s. 1641-1674.
- GAPPER L.W., COPESTAKE D.E.J., OTTER D.E., INDYK H.E. (2007): Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (1), s. 93-109.
- GOMES V., MADUREIRA K.M., SORIANO S., DELLA LIBERA A.M.M.P., BLAGITZ M.G., BENESI F.J. (2011). Factors affecting immunoglobulin concentration in colostrum of healthy Holstein cows immediately after delivery. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(Supl.1), s. 53-56.
- MADUREIRA A.R., PEREIRA C.I., GOMES A.M.P., PINTADO M.E., MALCATA F.X. (2007): Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, s. 1197-1211.
- MEHRA R., MARNILA P., KORHONEN H. (2006): Milk immunoglobulins for health promotion. *International Dairy Journal*, 16, s. 1262-1271.
- MORIN D.E., CONSTABLE P.D., MAUNSELL F.P., MCCOY G.C. (2001): Factors Associated with Colostral Specific Gravity in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 84 (4), s. 937-943.
- PRITCHETT L.C., CLIVE G.C., HANCOCK D.D., BESSER T.E. (1994): Evaluation of the hydrometer for testing immunoglobulin G1 concentrations in Holstein colostrum. *Journal of Dairy Science*, 77, s. 1761-1767.
- RIVERO M.J., VALDERRAMA X., HAINES D., ALOMAR D. (2012): Prediction of immunoglobulin G content in bovine colostrum by near-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 95 (3), s. 1410-1418.

Přijato do tisku 13. 9. 2014

Lektorováno 3. 10. 2014

# VLIV CHLADÍRENSKÝCH TEPLOT NA RŮST A PROTEOLYTICKOU ČINNOST MIKROORGANISMŮ SYROVÉHO MLÉKA

Jana Chramostová<sup>1</sup>, Natalia Rubina<sup>1</sup>,  
Veronika Šedivcová<sup>1</sup>, Miroslav Dragoun<sup>1</sup>,  
Irena Němečková<sup>1</sup>, Petr Roubal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> - Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

## Influence of low temperature on the growth and proteolysis of microorganisms isolated from raw milk

## Abstrakt

V této studii byl sledován vliv nízkých teplot skladování na růst mikroorganismů a následně vliv tohoto skladování na kvalitu trvanlivého mléka. U vzorků byl sledován celkový počet mikroorganismů a v druhé fázi i obsah primárních aminoskupin. Pro nízký počet testovaných mikroorganismů a z hlediska proteolýzy je nejlepší teplota skladování do 4 °C společně s dobou skladování 1 den. Naopak nejhorší teplotou je teplota nad 10 °C, při které celkové počty mikroorganismů v průběhu skladování rostou.

**Klíčová slova:** syrové mléko, chladírenské teploty, růst mikroorganismů, proteolýza, sterilizace

## Abstract

The influence of low temperature storage on the growth of microorganisms and the influence of this storage on quality heat treated milk were monitored in this study. Total bacterial count and the content of primary amino groups were determined. The best temperature for storage of raw milk is 2 - 4 °C for 1 day. The number of microorganisms and the content of amino groups are low. The worst temperature is temperature above 10 °C, because total content of microorganisms is growing.

**Key words:** raw milk, low temperature, growth of microorganisms, proteolysis, sterilization

## Úvod

Syrové mléko je po nadojení ihned zchlazeno na cca 4 °C. Následně je převezeno do mlékárny, kde však může být před samotným zpracováním někdy i několik dní skladováno. Při tomto skladování však mohou v syrovém mléce růst počty specifických mikroorganismů, např. psychrotrofní bakterie (bakterie rodu *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* aj.), které představují pro potravinářský průmysl problém. Během jejich růstu dochází k tvorbě tepelně stabilních enzymů, jako jsou proteasy a lipasy, které následně způsobují degradaci bílkovin