

IJFST 50TH CELEBRATION CONFERENCE: THE FUTURE OF FOOD INNOVATION, NUTRITION AND TECHNOLOGY



Ve dnech 17. - 19. února proběhla na Univerzitě Lincoln v Christchurch na Novém Zélandu konference IJFST 50th Celebration

Conference: The future of food innovation, nutrition and technology, která byla pořádána v souvislosti jubilem časopisu International Journal of Food Science and



Technology. Konference se zúčastnilo přes 200 vědeckých pracovníků a studentů z 50 zemí. Na úvod konference promluvili prof. Charles Brennan a Dr. Andrew West, kteří účastníky přivítali na konferenci a přiblížili zaměření a budoucí plány University Lincoln.



Hlavní přednášku s názvem Milk, dairy proteins and dairy products: a 40-year story přednesl prof. Jean-Marc Chobert z francouzské výzkumného centra INRA-Bia zaměřenou na vlastnosti bílkovin mléka. Poté již následovaly přednášky, které byly každý den rozděleny do 6-8 sekcí s různým tématickým zaměřením:

- Designing foods for human health
- Novel food processing techniques
- Process optimisation and product improvement
- Understanding meat science quality
- Manipulating post harvest physiology to improve food quality
- Food sustainability and security

- Understanding food product quality
- Food safety and microbiology
- Traditional food products
- Novel sensing and analytical techniques
- Dairy science
- Advancement in food science
- Food processing and quality
- Grain processing and technology

Výzkumný ústav mlékárenský se prezentoval na konferenci třemi pracemi od Ing. Ivany Hyršlové, MVDr. Gabriely Krausové, PhD. a Ing. Markéty Borkové, PhD. zabývajícími se využitím kravského a kozího kolostra do doplňků stravy, vlivem prebiotik na adhezenci vybraných kmenů laktobacilů a změnou složení kozího mléka během laktace po přidavku *Chlorella vulgaris* do krmiva.

Nedaleko města Christchurch se nachází také malá tradiční sýrárna Barry's Bay, kterou se nám během návštěvy Nového Zélandu podařilo navštívit. První sýry typu čedar byly v sýrárně Barry's Bay vyrobeny v roce 1895. Mléko pro výrobu sýrů pochází od fríského plemene krav chovaných na několika okolních farmách. V Barry's Bay totiž říkají: "Our milk comes from local cows. We don't know their names, but we know where they live." V současné době v sýrárně vyrábějí i sýr Gouda, Maasdam, velmi dobrý plísňový sýr Peninsula Blue a celou řadu sýrů s příchutěmi.



MOŽNOSTI DETEKCE MASTITID MĚŘENÍM ENZYMATICKÉ AKTIVITY

ŠUSTOVÁ K.¹, POLÁČKOVÁ M.¹, KUČTÍK J.²

¹ Ústav technologie potravin,

² Ústav chovu a šlechtění zvířat, Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Possibilities to detect mastitis problems by monitoring of enzymatic activity

Abstrakt

Cílem studie bylo vyhodnocení analýzy enzymatické aktivity v mléce k zjišťování mastitid. Práce shrnuje dosavadní poznatky o laktát dehydrogenáze a o dalších enzimech, jejichž zvýšená aktivita v mléce se sleduje jako potencionální ukazatel mastitid u dojnic a malých přežvýkavců.

Klíčová slova: somatické buňky, laktát dehydrogenáza, technologické vlastnosti mléka, kozí mléko, ovčí mléko

Abstract

The aim of this study was to assess the feasibility of monitoring enzymatic activity in milk to detect mastitis problems. The actual knowledge of the enzyme lactate dehydrogenase is summarized in this work. Increased activity of enzymes in milk may be a useful indicator of mastitis in dairy cows and small ruminants.

Key words: somatic cells, lactate dehydrogenase, technological properties of milk, goat's milk, sheep's milk

Mastitidu lze definovat jako zánětlivý proces, který vede k nepříznivému zdravotnímu stavu mléčné žlázy (BUCEK, 2011; VIGUIER a kol., 2009). Jedná se o multifaktoriální onemocnění (STUHR a kol., 2013), obvykle je však způsobené bakteriální infekcí (GRÖHL a kol., 2004). Mastitidy patří ke globálním infekčním onemocněním, které velmi negativně ovlivňují ekonomiku chovu mléčného skotu, (BZDIL, 2011; JAGLIČ a kol., 2014; JEŽKOVÁ 2014; MIEKLEY a kol., 2012; PEREIRA a kol., 2011; VĚŘÍŠ, 2013), a ovcí (HORÁK a kol., 2012). V chovu koz v našich podmínkách je zatím méně častým onemocněním (FANTOVÁ a kol., 2012). Mastitidy negativně ovlivňují technologickou kvalitu mléka a také kvalitu hotových výrobků, mimo jiné i v důsledku zvýšené enzymatické aktivity (FERRERO a kol., 2014).

Změny mléka vlivem mastitid

Během mastitid dochází nejen k poklesu dojivosti, ale především k řadě změn ve složení mléka (KESTER a kol., 2014). Z důvodu snížené schopnosti syntézy poškozené tkáň, ale také z důvodů menší prostupnosti glukózy v důsledku boje o energii mezi sekrečními buňkami a fagocytujícími buňkami, dochází k poklesu obsahu laktózy a zvyšování obsahu chloridů (DE OLIVY a kol., 2013). Do mléka se uvolňují hydrolytické enzymy, jakými jsou např. laktát dehydrogenáza a β -galaktosidáza (STUHR a kol., 2013; HUSSAIN a kol., 2012). Mléko od zvířat trpících mastitidou má zvýšenou proteolytickou aktivitu. Dochází k nárůstu nonplasminu, zvyšuje se hladina plazminu a plazminogenu, tyto změny jsou spojeny s degradací kaseinu (LEITNER a kol., 2004), což má za následek snížení relativního podílu kaseinu v mléce. Vzdůstá také množství proteoso-peptonů (SILANIKOVE a kol., 2014). V průběhu klinické a subklinické mastitidy dochází také k významnému poklesu vápníku. V důsledku těchto změn se zhoršuje syřitelnost mléka i jeho tepelná stabilita.

Možnosti detekce mastitid

Právní předpisy Evropské unie (nařízení 853/2004 zdůrazňují, že mléko určené k lidské spotřebě musí pocházet výlučně od zdravých zvířat (VIGUIER a kol., 2009). Trend směřuje k větší produkci mléka za účelem zvýšení zisku, a to vytváří potřebu senzorů a podpůrných systémů za účelem včasného odhalení zdravotních prob-

lémů dojnic. Díky soustavnému vědeckému výzkumu se systémy pro detekci mastitid stávají stále sofistikovanější (FRIGGENS a kol., 2007).

K posouzení kvality mléka se využívá řada metod, které se dělí do dvou skupin, a to na metody založené na měření pomocí automatických senzorů a na metody pozorování enzymatické aktivity mléka (FERRERO a kol., 2014; MIEKLY a kol., 2012). Ve světě se nejčastěji používají testy zahrnující měření SCC (počet somatických buněk v 1 ml mléka), enzymatickou analýzu a kalifornský srážecí test. Nevýhodou stávajících systémů a modelů pro detekci mastitid na základě běžně užívaných senzorů je vysoký počet falešných nálezů, což brání jejich vyšší frekvenci využití v praxi. Dále je nižší využití těchto modelů v praxi zapříčiněno častou kombinací sice vysoké citlivosti ale nízkou specifitou nebo naopak. Většina automatické detekce, která byla vyvinuta pro použití na farmách, se využívá pro detekci klinických mastitid (HUYBRECHTS a kol., 2014). Tyto metody může využít jak zemědělec, tak veterinář přímo na místě a vyžadují relativně málo školení. Jedním z nejstarších takovýchto testů je californská mastitis test (VIGUER a kol., 2009), jehož modifikace se využívá i u nás pod názvem NK test (VASIL', 2001).

Přehled nejčastěji využívaných diagnostických metod:

Praktický význam z pomocných diagnostických metod mají metody na stanovení celkového počtu somatických buněk v mléce, obsahu chloridů, pH mléka, určení frakcí bílkovin v mléčném séru a stanovení některých enzymů (VASIL', 2001).

1. Přítomnost somatických buněk v mléce

Počet somatických buněk se zvyšuje, vniknou-li do vemene patogeny. Postižená tkáň mléčné žlázy na to reaguje obranou reakcí ve formě silného zánětu. Tak se ve velkých počtech přesouvají leukocyty z krve do alveol, aby patogeny, které pronikly do mléčné žlázy, fagocytovaly a zničily. Díky působení původců mastitid dochází k odumírání mlékotvorných buněk, které jsou společně s leukocyty mlékem vylučovány z vemene ven (VRŠKOVÁ a kol., 2014; JELÍNKOVÁ, 2012; FUTO a kol., 2012).

Měření počtu somatických buněk se používá po celém světě jako indikátoru stavu mléčné žlázy krav, ovcí a koz i k posouzení celkového zdravotního stavu zvířete (PERSOON a OLEFSSON, 2011; PIEPERS a kol., 2007; STUHR a kol., 2013). Sledování počtu somatických buněk v mléce slouží v řadě zemí pro zařazení mléka do jakostních tříd. Ovšem zvýšení počtu somatických buněk může být nejenom důsledkem zánětlivého procesu vlivem přítomnosti intramamární infekce, ale také vlivem fyziologických procesů jiných než patologických, jako je např. říje, pokročilá fáze laktace, stres (KALANTARI a kol., 2013; RAYNAL-LJUTOVAC a kol., 2007). Posuzování zdraví vemene na základě hodnot somatických buněk pouze z jednoho měření tedy nemá samo o sobě dostatečnou vypoví-

dající schopnost, respektive může vést k chybným závěrům.

Mléko od zdravých nebo neinfikovaných dojnic obsahuje počet somatických buněk (SCC) do hladiny 100 000 v 1 ml mléka (CHAGUNDA a kol., 2006; STUHR a kol., 2013). Top kvalitu mléka vykazují dojnice s počtem somatických buněk do 50 000 v 1 mililitru mléka (SEYDLOVÁ, 2013).

Zastoupení dojnic s počtem somatických buněk do 50 000 v průběhu laktace klesá, a to až na polovinu výskytu. Tolerovaná hranice pro počet somatických buněk je ještě od 51 000 do 100 000. Zastoupení počtu somatických buněk od 101 000 do 800 000 se prodlužující dobou, po kterou je produkováno mléko, významně zvyšuje. Procentuální zastoupení dojnic s počtem somatických buněk přesahujících 800 000 je vysoké, ale relativně stále v průběhu celé laktace. Naměřený průměr počtu somatických buněk na začátku laktace, do 40 dnů po otelení, a nad 305 dnů je vysoký a dosahuje až 280 000. Střed laktace vykazuje nižší hodnoty (SEYDLOVÁ, 2013).

V Evropě se zvýšení hladiny somatických buněk nad 200 000 buněk v 1 ml mléka běžně používá jako indikátor mastitidy (VIGUIER a kol., 2009). Někteří autoři poukázali na možnost infikované jedné čtvrti vemene dojnice již při hodnotách počtu 100 000 somatických buněk v 1 ml mléka (VRŠKOVÁ a kol., 2014). V USA je právní limit pro počet somatických buněk stanovený úřadem pro kontrolu potravin a léčiv na hranici 750 000 buněk v 1 ml mléka pro krávy, který se má nadále snižovat až na hranici, která je stejná i v rámci Evropské unie.

Na rozdíl od krav je sekrece mléka u ovcí a koz apokrinní a cytoplazmatické částice, které jsou podobné somatickým buňkám, jsou normální součástí mléka. Tyto částice nejsou klasifikovány jako buňky, jelikož neobsahují jádra nebo DNA, i když obsahují značné množství RNA a proteinů (SOUZA a kol., 2012).

Počet somatických buněk je v kozím mléce o poznání vyšší, a to i u vzorků mléka ze zdravého vemene a zvyšuje se po celou dobu laktace. Značně se liší výsledky od jednotlivých jedinců. Průměrný počet somatických buněk od zdravých koz se pohybuje 50 000 - 400 000 v 1 ml mléka na počátku laktace (MCDOUGALL a kol., 2001). V průběhu laktace může docházet k výkyvům a počet somatických buněk může překročit hodnotu 1 000 000 buněk v 1 ml mléka, aniž by tato hodnota znamenala infekci mléčné žlázy. Počet somatických buněk v mléce koz je více ovlivněn normálními fyziologickými faktory než u krav, proto zde nemohou platit normy pro počet somatických buněk jako u krav (PERSSON a OLOFSSON, 2011).

Axmann (2012) také uvádí, že počet somatických buněk v kozím mléce je vyšší než v kravském a fyziologicky kolísá až na 500 000 tis. buněk/ml. Počet buněk překračující hodnotu 500 000 u koz často vykazují i zvířata, u nichž nebylo infikované vemeno. Detekce mastitid vede, podle tohoto autora, ke zvýšení až na hodnoty 2 000 000 buněk/ml.

U ovčího mléka je počet somatických buněk vyšší než u kravského mléce. Fyziologická hranice kolísá mezi hodnotami 0 až 500 000 v 1 ml mléka. Střední zánět se vyznačuje počtem somatických buněk v rozmezí od 500 000 do 2 000 000 v 1 ml mléka (HORÁK a kol., 2012).

V USA je pro mléko kozí a ovčí limit počtu somatických buněk stanoven na 1 000 000 buněk (PAAPE a kol., 2007), zatímco směrnice EU zatím neobsahují zákonné požadavky (STUHR a kol., 2013).

2. Stanovení pH mléka

Stanovení pH mléka se provádí pomocí indikátorových papírků nebo pH metrem, tedy potenciometricky. Nárůst pH mléka z důvodu mastitidy je detekován pomocí bromthymolové modře (VIGUIER a kol., 2009). Mléko od zdravé dojnice má hodnoty pH v rozpětí 6,3 - 6,7. Během akutní mastitidy je hodnota pH 6,95 - 7,3 a více. U chronické formy se rozpětí pH nachází ve fyziologickém rozmezí hodnot nebo je mírně alkalické (VASIL', 2001). Fyziologické hodnoty pH kozího mléka se pohybují okolo 6,50 - 6,80, u ovčího jsou tyto hodnoty v rozmezí 6,51 - 6,85 (PARK a kol., 2007).

Měřením pH mléka lze tedy stanovit změny ve zdraví mléčné žlázy (FUTO a kol., 2012). Výhodou testu je jeho rychlost detekce a nízké náklady na pořízení. Nevýhodou naopak malá citlivost v porovnání s ostatními testy (VIGUIER a kol., 2009).

3. Viskozigenní testy

Nejnámější formou viskozigenního testu je NK-test. Diagnostickou reagensií je zde červený průsvitný roztok povrchově aktivních látek, alkylylsulfonátu a fenolové červeně v destilované vodě, s upravenou koncentrací vodíkových iontů. Zkouška se provádí na miskách, které jsou umístěny na posuzovací paletě. Dva ml čerstvě nadojeného mléka se smísí spolu s dvěma ml reagensie a při naklání palety pod úhlem 45° se posuzuje reakce, která proběhne zpravidla do 30 sekund. Pozitivní reakce se projevuje výraznou tvorbou vloček, vláken a změnou konzistence ve formě zgelovatění až koagulace. Působení rozdílného pH na barevný indikátor způsobí současně barevnou reakci (VASIL', 2001).

Tato metoda je založena na principu lyze somatické buňky s následným uvolněním nukleových kyselin a jiných složek buněčného obsahu po přidání detergentu do vzorku mléka. V případě vysokého počtu somatických buněk dochází k vytvoření tzv. gelové konzistence. Nicméně výklad může být subjektivní, a to může mít za následek falešný nálezh ohledně mastitid. Výhodou této metody je jeho rychlost, test lze použít přímo na místě a nízké pořizovací náklady. Nevýhodou již zmíněná obtížná interpretace výsledků a nízká citlivost (VIGUIER a kol., 2009).

4. Detekce pomocí enzymů

Výzkum změn enzymových aktivit, spojených s výskytem původce onemocnění, může vést k včasné detekci mastitid (STUHR a kol., 2013). Enzymy jsou pro-

teiny, které jsou biologickými katalyzátory. Jsou produkovány buňkami a hrají důležitou roli v procesu metabolismu těla. Další z jejich funkcí je antioxidační a jsou součástí vrozené imunity (YANG a kol., 2014).

Některé dostupné enzymatické testy jsou rychlé, ale zatím se pro přesnější stanovení využívají jen v laboratorních (VIGUIER a kol., 2009). Mnohé z testů jsou časově velmi náročné pro analýzu ve velkém měřítku (WELBECK a kol., 2011). Výsledky vědeckých pokusů však prokazují, že měření enzymatické aktivity má diagnostický potenciál pro detekci mastitid (KALANTARI a kol., 2013).

4.1. Detekce pomocí laktátu dehydrogenázy

Laktát dehydrogenáza (LDH nebo LD), všudypřítomný cytoplazmatický enzym, který se vyskytuje u obratlovců, bezobratlých, rostlin a u mikrobů (KALANTARI a kol., 2013), byl objeven v raném období enzymologie. Enzym se běžně vyskytuje v několika rozdílných molekulárních formách (KOPPERSCHLÄGER a KIRCHBERGER, 1996). Jedná se o enzym složený ze čtyř podjednotek, které tvoří až pět možných kombinací LD₁ - LD₅. Jeho obsah se prokazatelně zvyšuje během zánětu a působí tak jako časný ukazatel mastitidy (WELBECK a kol., 2011).

Laktát dehydrogenáza se může uvolnit v průběhu imunitní odpovědi u leukocytů a parenchymálních buněk mléčné žlázy. Uvolnění enzymů do mléka lze pozorovat po infuzi stafylokokového α -hemolyzinu. LDH slouží v tomto případě jako ukazatel rostoucí mléčné propustnosti. Byly provedeny testy u kravského mléka na ověření hodnot počtu somatických buněk a úrovně laktátu dehydrogenázy. Ověření toho modelu pro kozí mléko musí být ale ještě provedeno (STUHR a kol., 2013). Původ zvýšení laktátu dehydrogenázy v mléce je v důsledku zvýšení počtu leukocytů v postižené tkáni a ze somatických buněk během mastitidy po invazi mikroorganismů (LARSEN, 2005).

KATSOULOS a kol. 2010 identifikoval aktivitu laktátu dehydrogenázy jako nejspolehlivější ukazatel u tří analyzovaných enzymů, kterými byly alkalická fosfatáza, aspartátaminotrasferáza a LDH pro detekci mastitid mléka ovcí a koz. FRIGGENS a kol., 2007 testovali dynamický deterministický model pro včasné zjištění mastitidy pomocí LDH jako indikátoru v mléce. Aby byli schopni posoudit, zda je LDH dostatečným faktorem pro posouzení mastitidy dojnice, měli k dispozici hodnoty počtu somatických buněk. Bylo prokázáno, že aktivita LDH se zvyšuje u mléka od dojnic infikovaných mastitidou. Koncentrace LDH v průběhu zánětu mléčné žlázy má potenciál, aby byla používána jako screeningový test pro detekci subklinické mastitidy (KALANTARI a kol., 2014).

LDH byl prokázán jako významný marker pro sledování mastitidy. Při infekci mléčné žlázy dochází k uvolnění enzymů včetně LDH do mléka, jak bylo zmíněno již dříve, v důsledku odpovědi imunitního systému. Čím je těžší infekce, tím je hladina LDH vyšší. Koncentrace LDH koreluje s počtem somatických buněk. Zvýšení koncentrace LDH nastává často ještě před samotným zvýšením počtu somatických buněk v mléce, díky čemuž lze provést

včasnou diagnostiku. Tohoto faktu využívají testy Udder Check.

Jedná se o testovací proužky s reagenčním polštářkem, na kterém je nanesen imobilizovaný substrát L-laktátu. V důsledku řady enzymatických reakcí je tento substrát oxidován enzymem laktát dehydrogenázou, obsaženým v mléce, přitom současně indikátor modrého zbarvení nitrotetrazolium je redukován na fialově zbarvený formazan. Intenzita zbarvení formazanu je poté přímo úměrná koncentraci LDH obsažené v mléce.

Tyto testy nesmějí přijít do kontaktu s přímým slunečním světlem. Vždy se využívá mléko, do kterého nebyly přidány konzervační látky. Vzorky je dále nutno promíchat v případě, že stály déle než 10 minut před provedením testu. Pokud testovaný vzorek obsahuje mlezivo, čtení barevné reakce je obtížnější. Čím je barva formazanu na reagenčním polštářku tmavší, tím vyšší je koncentrace laktátu dehydrogenázy v mléce, což ukazuje na vyšší pravděpodobnost infekce.

Samotný postup testu je velmi jednoduchý. Stačí ponořit testovací proužek s detekčním polštářkem do vzorku mléka, které je čerstvě nadojené nebo zchlazené a následně ohřáté na pokojovou teplotu. Po 2 minutách přiložíme testovací proužek ke škále a odečítáme hodnoty (viz tab. 1).

Tab. 1 Interpretace výsledků aktivity laktát dehydrogenázy (LDH)

Výsledek na barevné škále	Pravděpodobnost infekce	Aktivita LDH
-	nízká	$\leq 100 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$
+	mírná	$100 - 200 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$
++	vysoká	$200 - 500 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$
+++	velmi vysoká	$\geq 500 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$

Na Ústavu technologie potravin byly testy Udder Check odzkoušeny u mléka, z kterého byly somatické buňky odstředěny. Testy vykazovaly dobrou korelaci k SCC.

To znamená, že by mohly zachytit i mléko, z kterého byly původně somatické buňky odstředěny.

4.2. Detekce pomocí β -glukuronidázy

β -glukuronidáza patří do skupiny enzymů hydroláz. V důsledku imunitní odpovědi těla dochází k zvýšení její hladiny. Dříve nebyla považována za citlivý parametr pro detekci mastitidy, ale v roce 1986 byly provedeny pokusy, na základě jejichž výsledků je detekce pomocí β -glukuronidázy považována za citlivý a velmi efektivní parametr pro hodnocení mastitidy u dojnic. Pro detekci mastitidy u kozího mléka je potřebné jeho hladinu posoudit na základě výsledků počtu somatických buněk (STUHR a kol., 2013).

4.3. Detekce pomocí alkalické fosfatázy

Pod pojem alkalická fosfatáza (ALP) zahrnujeme celou skupinu relativně nespecifických enzymů, které při alkalickém pH hydrolyticky štěpí různé estery kyseliny fosforečné. Alkalická fosfatáza je membránově vázaný glykoprotein,

který je široce distribuován v živočišných tkáních a mikroorganismy. Výskyt alkalické fosfatázy v mléce byl poprvé uznán v roce 1952 (FOX a KELLY, 2006).

Alkalická fosfatáza v mléce je přírodní fosfatáza, která se podílí na metabolismu. Jedná se o jeden z endogenních enzymů v mléce. U skotu hraje důležitou roli v metabolismu glukózy. Je klíčovým enzymem při trávení a metabolismu tuku. Jedná se o monoesterázu, která katalyzuje hydrolýzu monoesterů. Její aktivita může být ovlivněna mnoha faktory (YANG a kol., 2014).

V mléce jednotlivých živočišných druhů a mezi jednotlivci v rámci stáda se její obsah značně liší. Zvýšená hladina ALP je především během mastitid. Aktivita alkalické fosfatázy je velmi úzce spjata i s celkovým počtem mikroorganismů (CPM). Při zvýšeném počtu CPM dochází k nárůstu aktivity alkalické fosfatázy v mléce, což je důsledkem vzniku mikrobiální alkalické fosfatázy. Vyšší aktivita je rovněž v mlezivu (CHOVANEC a kol., 2008).

Nárůst koncentrace a aktivity alkalické fosfatázy je během zánětlivého procesu vyvolán leukocyty, poškozenými intersticiálními buňkami epitelu a poškozenými leukocyty, stejně jako u LDH (KALANTARI a kol., 2013). Aktivita se mění nepřímo v závislosti na dojívnosti, ale je nezávislá na obsahu tuku, na chovu a výživě (FOX a KELLY, 2006).

4.4. Detekce pomocí kyselých fosfatáz

Kyselá fosfatáza se na rozdíl od alkalické formy tohoto enzymu nachází výhradně jen v leukocytech. V mléce je její obsah téměř nepatrný. Její aktivita se výrazně zvyšuje během onemocnění mléčné žlázy. Rovněž je její aktivita vyšší v mlezivu. Enzym na rozdíl od své alkalické formy není aktivován Mg^{2+} ale je mírně aktivován Mn^{2+} a je velmi silně inhibován fluoridem (FOX a KELLY, 2006).

Aktivita kyselých fosfatáz dosahuje svého maxima 5 - 6 dní po porodu, načež následuje pokles, který zůstává na nízké hladině až do konce laktace (FOX a MCSWEENEY, 1998). Nárůst aktivity enzymu je vyvolán nástupem mastitidy (FOX a KELLY, 2006).

4.5. Detekce pomocí amylázy

Amyláza je hlavním enzymem se sacharidovou aktivitou. Jedná se o hydrolázu, jejíž účinek spočívá ve štěpení škrobu (YANG a kol., 2014). Amyláza pochází hlavně ze slinných žláz a pankreatické tkáně. Nachází se ve dvou formách jako α -amyláza a β -amyláza (FOX a KELLY, 2006). V mléce je vyšší obsah α -amylázy. Vyskytuje se v laktoglobulinové frakci syrovátkových bílkovin. Vzhledem k tomu, že kravské mléko neobsahuje škrob, ale pouze nízké hladiny oligosacharidů, je funkce amylázy v mléce zatím nejasná.

Aktivita amylázy se různí, vyšší je v mlezivu, ale po několika dnech se její aktivita snižuje na minimum a opět se zvyšuje ke konci laktačního období. Amylázová aktivita je úzce spojena s druhem zvířete, stádiem laktace, věkem, zdravotním stavem, výživou zvířete a individualitou jedince. Jakmile dojde ke zvýšení leukocytů v mléce, stoupá

i aktivita amylázy, což slouží jako vhodný marker detekce mastitid. Amyláza je poměrně tepelně stabilní enzym (FOX a KELLY, 2006).

4.6. Detekce pomocí katalázy

Kataláza je jeden z prvních enzymů, který byl prokázán v mléce. Je distribuován široce v rostlinných, mikrobiálních a živočišných tkáních a sekretech. Úlohou katalázy v mléce je rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Kataláza dále v mléce přeměňuje dusitany na dusičnany, přičemž rychlost této oxidace je přímo úměrná koncentraci tohoto enzymu. Aktivita katalázy v kravském mléce je $2 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ (SILANIKOVE a kol., 2009).

Kataláza je obsažena v leukocytech a je tedy v mléce obsažena vždy. Aktivita katalázy je vyšší v mlezivu a při nárůstu počtu somatických buněk (FUTO a kol., 2012). Při mastitidě se aktivita katalázy zvyšuje výrazně (FOX a KELLY, 2006), stejně jako při všech případech poruch sekrece mléka (ASHELY a LI, 2013). Aktivita katalázy v syrovém mléce je přímo úměrná počtu somatických buněk, což z katalázy dělá užitečný ukazatel pro rychlou a snadnou detekci mastitidy a abnormálního mléka (FUTO a kol., 2012).

4.7. Detekce pomocí laktoferinu

Laktoferin je glykoprotein vázající železo. Jedná se o enzym, který má v těle mnoho úloh, mezi nejvýznamnější patří přenos železa a antibakteriální funkce (MOLENNAR a kol., 1996). U krav byl pozorován vliv fyziologických faktorů na koncentraci laktoferinu v mléce. U laktoferinu byla vysledována přímá úměra s nárůstem počtu somatických buněk.

HISS a kol., 2008 se pokusili potvrdit tuto závislost i u kozího mléka. Výsledkem jejich výzkumu bylo zjištění, že oba parametry, obsah laktoferinu v závislosti na počtu somatických buněk, jsou ovlivněny různými faktory. Leukocyty, které jsou součástí SCC se dostávají do mléka z krevního oběhu, zatímco laktoferin je syntetizován přímo v mléčné žláze. Ačkoli existuje přímá úměra mezi počtem somatických buněk a obsahem laktoferinu v mléce, nelze dojít k závěru, zda může být laktoferin použitý jako parametr vedle nebo namísto počtu somatických buněk pro posouzení kvality kozího mléka.

7.8. Detekce pomocí plazminu a plazminogenu

Plazmin je hlavní proteolytický enzym v mléce krav a ovcí, ve kterém se vyskytuje společně s neaktivním plazminogenem a aktivátory plazminogenu, které jej aktivují na plazmin a inhibitory plazminogenu a plazminu (LEITNER a kol., 2004). Plazmin je velmi teplotně stabilní enzym a v posledních letech se stal předmětem rozsáhlého výzkumu. Jedná se o nejvýznamnější proteolytický enzym v mléce. Bovinní plazminogen je jednořetězcový glykoprotein obsahující 786 aminokyselinových zbytků s vysokou molekulovou hmotností. Plazminogen se převede na plazmin štěpením peptidické vazby mezi 557. a 558. aminokyselinou, konkrétně mezi argininem a izoleucinem,

pomocí specifických proteáz. Plazmin má optimální aktivitu při pH 7,5 a teplotě 37 °C (FOX a KELLY, 2006).

V mléce se plazmin váže na povrch kaseinových micel, které slouží jako jeho substrát (CORTELLINO a kol., 2006). Hlavním substrátem je pro plazmin β -kasein. Během procesu sýření přechází do sýřeniny, zatímco inhibitory plazminu a plazminogenu jsou rozpustné v mléčném séru. Plazmin snižuje schopnost mléka k dalšímu zpracování, hydrolyzuje α_2 -kasein a β -kasein (THEODORU a kol., 2007), frakce α_1 -kasein hydrolyzuje na γ -kasein a proteozo-peptony (BASTIAN a BROWN, 1996). Zvýšení plazminogenu a plazminu v mléce má negativní vztah ke koagulaci mléčných bílkovin, dochází ke zhoršení koagulačních schopností. Nárůst plazminogenu a plazminu je registrován na konci laktace. Obsah plazminu se zvyšuje při onemocnění mléčné žlázy (URECH a kol., 1999). Systém plazmin-plazminogen je ovlivněn zdravotním stavem zvířete. Na základě studií bylo zjištěno, že aktivita plazminu vzrůstá se zvyšujícím se počtem somatických buněk, zatímco aktivita plazminogenu není závislá na počtu somatických buněk vůbec (THEODORU a kol., 2007).

CORTELLINO a kol., 2006 provedli studii, která se zabývala aktivitou plazminu a plazminogenu v mléce koz. Zjistili, že aktivita plazminu byla vyšší než aktivita u ostatních přežvýkavců (pro porovnání s kravským mlékem o 17 - 50 %, oproti ovčímu o 45 %), zatímco aktivita plazminogenu byla výrazně nižší.

Shrnutí

Na základě výzkumných aktivit v posledních letech vznikají nové možnosti, jak rychle a efektivně diagnostikovat mastitidu v chovech. V České republice se občas objevují snahy prvovýrobců dodávat mléko ke zpracování s odstředěnými somatickými buňkami a vyhnout se tak případným postihům za mléko nevyhovující stávajícím legislativním předpisům.

Je třeba opakovaně informovat a vzdělávat prvovýrobce mléka o problémech, které při zpracování mléka od dojníc s vyšším počtem somatických buněk nastávají, že takovéto mléko má značně pozměněné technologické vlastnosti. A také je třeba upozornit na fakt, že již existují jednoduché enzymatické testy, které jsou schopny i v "odstředěném" mléce původně vysoké počty somatických buněk zjistit.

Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou projektu NAZV KUS QJ1230044 Stanovení parametrů pro legislativní hodnocení kvality a zdravotní nezávadnosti syrového mléka krav, ovcí a koz.

Literatura

AXMANN, R. (2012): Možnosti redukce výskytu mastitid ve stádech ovcí. *Náš chov*, 72, č. 2, s. 37-39, ISSN 0027-8068
ASHLEY, J., LI, S., F. (2013): An aptamer based surface plasmon resonance biosensor for the detection of bovine katalase in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 48, s. 126-131.

BASTIAN, E., D., BROWN, R., J. (1996): Plasmin in milk and dairy products: an update. *Inter. Dairy J.*, 6 (5), s. 435-457.
BUCEK, P. (2011): Využití somatických buněk ve šlechtění skotu. *Veterinářství*, 60 (1), s. 43-48.
BZDIL, J. (2011): Sezónnost výskytu vybraných patogenů mléčné žlázy skotu. *Veterinářství*, 60 (1), s. 38-42.
CORTELLION, G., LOCCI, F., RAMPILLI, M. (2006): An investigation of the plasmin-plasminogen system in caprine milk and cheese. *Inter. Dairy J.*, 16 (6), s. 619-622.
DE OLIVY, A., M., DÍAZ, J., R., MOLINA, M., P., PERIS., C. (2013): Quantification of milk Šeld and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *J. of Dairy Sci.*, 96 (12), s. 7698-7708.
FANTOVÁ, M., MÁTLOVÁ, V., MALÁ, G., KACEROVSKÁ, L., SKŘIVÁNEK, M., ŠLOSÁRKOVÁ, S. (2012): *Chov koz*. 3. vyd. Praha: Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz v ČR vydalo nakl. Brázda, 231 s. ISBN 978-80-209-0393-8.
FERRERO, F., J., VALLEDOR., M., CAMPO, J., C. (2014): Screening method for early detection of mastitis in cows. *Measurement*. 47, s. 855-860.
FOX, P., F., KELLY, A. (2006): Indigenously enzymes in milk: Overview and historical aspects. *Inter. Dairy J.*, 16 (6), s. 500-532.
FOX, P., F., MCSWEENEY, P., L., H. (1998): *Dairy chemistry and biochemistry*, London, Blackie Academic & Professional, 478 s. ISBN 0-412-72000-0.
FRIGGENS, N., C., CHAGUNDA, M., G., G., BJERRING, M., RIDDER, C., HOJSGAARD, S., LARSEN, T. (2007): Estimating Degree of Mastitis from Time-Series Measurements in Milk: A Test of Model Based on Lactate Dehydrogenase Measurement. *J. of Dairy Sci.*, 90 (12), s. 5415-5427.
FUTO, P., MARKUS, G., KISS, A., ADÁNYI, N. (2012): Development of Catalase-Based Amperometric Biosensor for the Determination of Increased Catalase Content in Milk Samples. *Electroanalysis*, 24 (1), s. 107-113.
HISS, S., MEYER, T., SAUERWEIN, H. (2008): Lactoferrin concentrations in goat milk throughout lactation. *Small Ruminant Research*, 80 (1 - 3), s. 87-90.
HORÁK, F., AXMANN, R., ČERVENÝ, Č., DOLEŽAL, P., DOSKOČIL, J., HOŠEK, M., HRBEK, I., HUMPÁL, J., JŮZL, M., KLIMEŠ, J., KUČTIK, J., LITERÁK, I., MAREŠ, V., MILERSKI, M., NOVÁK, J., PINDÁK, I., ŠLOSÁRKOVÁ, S., ŠUSTOVÁ, K., ŠVĚDA, J., TUZA, J., VÁGENKNECHTOVÁ, M., VESELÝ, P., ZEMAN, L. (2012): *Chováme ovce*. 1. vyd. Praha: Brázda s. r. o., 2012. 384 s. 1. ISBN 978-80-209-0390-7.
HUSSAIN, R., JAVED, M., T., KHAN, A. (2012): Changes in Some Biochemical Parameters and Somatic Cell Counts in the Milk of Buffalo and Cattle Suffering Mastitis. *Pakistan Veterinary J.*, 32 (3), s. 418-421.
HUYBRECHTS, T., MERTENS, K., DE BAERDEMAEKER, J., DE KETELAERE, B., SAEYS, W. (2014): Early warnings from automatic milk Šeld monitoring with online synergistic kontrol. *J. of Dairy Sci.*, 97 (6), s. 3371-3381.
CHAGUNDA, M., G., G., FRIGGENS, N., C., RASMUSSEN, M., D., LARSEN, T. (2006): A Model for Detection of Individual Cow Mastitis Based on an Indicator Measured in Milk. *J. of Dairy Sci.*, 89 (8), s. 2980-2998.
CHOVANEK, M., GOLIAN, J., ŠKARBOVÁ, B., SOKOL, J. (2008): Vybrané faktory ovlivňující aktivitu alkalické fosfatázy v mlieku. *Mliekarstvo*. 39, (3), s. 46-51.
JAGLIČ, Z., ČERVINKOVÁ, D., VLKOVÁ, H., BABÁK V., LORENCOVÁ, A., SEVDLOVÁ R. (2014): Prevalence bakteriálních původců subklinických mastitid v České republice. *Veterinářství*, 64 (2), s. 142-145.
JELÍNKVÁ, J. (2012): Co nám říkají somatické buňky. *Náš chov*, 12, s. 56-58.
JEŽKOVÁ, A. (2014): Výživa a zdravotní stav mléčné žlázy. *Náš chov*, 2, s. 71-72.
KALANTARI, A., SAFI, S., FOROUSHANI, A., R. (2013): Milk lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase as biomarkers in detection of bovine subclinical mastitis. *Annals of Biolog. Research*, 4 (2), s. 302-307.
KATSOULOS, P., D., CHRISTODOULOPOULOS, G., MINAS, A., KARATZIA, M., A., POURLIOTIS, K., KRITAS, S., K. (2010): The role of lactate dehydrogenase, alkaline phosphate and aspartate aminotransferase in the diagnosis of subclinical intramammary infections in dairy sheep and goats. *J. of Dairy Research*, 77, s. 107-111.

- KESTER, H., J., SORTER, D., E., HOGAN, J., S. (2014): Activity and milk compositional changes following experimentally induced *Streptococcus uberis* bovine mastitis. *J. of Dairy Sci.*, dostupné na <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030214008121>, [citované: 2014-11-29]
- KOPPERSCHLÄGER, G., KIRCHBERGER, J. (1996): Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. *J. of Chromatography B: Biomedical Sci. and Applications*, 684 (1-2), s. 25-49.
- LARSEN, T. (2005): Determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity in milk by fluorometric assay. *J. of Dairy Research*, 72, s. 209-216.
- LEITNER, G., MERIN, U., SILANIKOVE, N. (2004): Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *J. of Dairy Sci.*, 87 (6), s. 1719-1726.
- MCDUGALL, S., MURDOUGH, P., PANKEY, W., DELANEY, C., BARLOW, J., SCRUTON, D. (2001): Relationships among static cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*, 40 (3), s. 245-254.
- MIEKLEY, B., TRAUlsen, I., KRITER, J. (2012): Detection of mastitis and lameness in dairy cows using wavelet analysis. *Livestock Sci.*, 148 (3), s. 227-236.
- MOLENAAR, A., J., KUYSS, Y., M., DAVIS, S., R., WILKINS, R., J., MEAD, P., E., TWEEDIE, J., W. (1996): Elevation of Lactoferrin Gene Expression in Developing, Ductal, Resting and Regressing Parenchymal Epithelium of the Ruminant Mammary Gland. *J. of Dairy Sci.*, 79 (7), s. 1198-1208.
- PAAPE, M., J., WIGGANS, G., R., BANNERMAN, D., D., THOMAS, D., L., SANDER, A., H., CONTRERAS, A., MORONI, P., MILLER, R., H. (2007): Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research*, 68 (1-2), s. 114-125.
- PARK, Y., W., JUAREZ, M., RAMOS, M., HAENLEIN, G., F. W. (2007): Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68 (1-2), s. 88-113.
- RAYNAL - LJUTOVAC, K., PIRISI, A., DE CRÉMOUX, R., GONZALO, C. (2007): Somatic cell of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research*, 68 (1-2), s. 126-144.
- PEREIRA, U., P., OLIVEIRA, D., G., S., MESQUITA, L., R., COSTA, G., M., PEREIRA, L., J. (2011): Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Veterinary Microbiology*, 148 (2-4), s. 117-124.
- PERSSON, Y., OLOFSSON, I. (2011): Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53 (15), dostupné na: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1751-0147-53-15.pdf>, [citované: 2014-11-28]
- PIEPERS, S., DE MEULEMEESTER, L., KRUIJF, A., OPSOMER, G., BARKE-MA, H., W., DE VLIEGHER, S. (2007): Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J. of Dairy Research*, 74 (4), s. 478-483.
- SEYDLOVÁ, R. (2012): Mezinárodní kongres o zdraví mléčné žlázy. *Náš chov*, 2, s. 52-53.
- SEYDLOVÁ, R. (2013): Zdraví mléčné žlázy prvotek. *Náš chov*, 12, s. 52-54.
- SILANIKOVE, N., MĚŘÍN, U., SHAPIRO, F., LEITNER, G. (2014): Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidant properties and impairment of its quality. *J. of Dairy Sci.*, 97 (6), s. 3449-3455.
- SOUZA, F., N., BLAGITZ, M., G., PENNA, C., F., A., M., DELLA LIBERA, A., M., M., P., HEINEMANN, M., B., CERQUEIRA, M., M., O., P. (2012): Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Ruminant Research*, 107 (2-3), s. 65-75.
- STUHR, T., AULRICH, K., BARTH, K., KNAPPSTEIN, K., LARSEN, T. (2013): Influence of udder infection status on milk enzyme activities and somatic cell count throughout early lactation in goats. *Small Ruminant Research*, 111 (1-3), s. 139-146.
- THEODORU, G., KOMINIKIS, A., ROGDAKIS, E., POLITIS, I. (2007): Factors affecting the plasmin-plasminogen system in milk obtained from free Greek dairy sheep Leeds with major differences in milk production capacity. *J. of Dairy Sci.*, 90 (7), s. 3263-3269.
- URECH, E., PUHAN, Z., SCHÄLLIBAUM, M. (1999): Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. *J. of Dairy Sci.*, 82 (11), s. 2402-2411.
- VASIL' M. 2001: Mastitidy. s. 673-707. In KOVÁČ, G., BAJOVÁ, V. (2001): *Choroby hovädzieho dobytku*, M & M vydavateľstvo, Prešov, s. 878. ISBN: 80-88950-14-7.
- VĚŘÍŠ, M. (2013): Využití testů k rychlé diagnostice mastitid v praxi. *Náš chov*, 2, s. 51-53.
- VIGUER, C., ARORA, S., GILMARTIN, N., WELBECK, K., O KENNEDY, R. (2009): Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27 (8), s. 486-493.
- VRŠKOVÁ, M., M IDRIS, S., E., TANČIN, V., KIRCHNEROVÁ, K. (2014): Dynamika vývoje mastitidnej mikroflóry a jej rezistencie voči antibiotikám. *Slovenský chov*, 19 (5), s. 34-36.
- WELBECK, K., LEONARD, P., GILMARTIN, N., BYRNE, B., VIGUIER, C., ARORA, S., O KENNEDY, R. (2011): Generation of an anti-Nagase single chain antibody and its application in biosensor-based assay for the detection of Nagase in milk. *J. of Immunological Methods*, 364 (1-2), s. 14-20.
- YANG, M., YUE, X., XU, X., WANG, Y., WU, J., WU, R. (2014): Comparison of Milk Enzyme in Different Lactation Periods. *IERI Prodedia*, 8, s. 46-51.

Korespondenční adresa: Prof. Ing. Květoslava Šustová, Ph.D., Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav technologie potravin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, e-mail: sustova@mendelu.cz

Přijato do tisku: 9. 3. 2015

Lektorováno: 23. 3. 2015

RŮST PROBIOTICKÝCH MIKROORGANISMŮ V KRAVSKÉM KOLOSTRU

Ivana Hyršlová¹, Gabriela Krausová¹, Tereza Michlová², Volodymyr Skalka³, Ladislav Čurda³

¹ - Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha;

² - Katedra chemie, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze

³ - Ústav mléka, tuků a kosmetiky, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Growth of selected probiotic strains in bovine colostrum

Abstrakt

U vybraného souboru potencionálně probiotických mikroorganismů z rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Enterococcus* byl sledován jejich růst v kravském kolostru. U kravského kolostra bylo stanoveno základní chemické složení a koncentrace bioaktivních látek (lysozymu, laktoferinu, laktoperoxidasy a imunoglobulinu), které by mohly ovlivnit růst vybraného souboru kmenů. Koncentrace bioaktivních látek byly stanoveny s využitím spektrometrických a imunologických metod. Růst mikroorganismů v kolostru byl porovnáván na základě počtů stanovených plotnovou metodou po 24h kultivaci.