

VYBRANÉ ASPEKTY VARIABILITY LAKTOFERINU A LYSOZYMU V MLÉCE

SELECTED ASPECTS OF THE VARIABILITY OF LACTOFERRIN AND LYSOSYME IN MILK

Oto Hanuš¹ – Hana Nejeschlebová¹ – Klára Bartáková¹

Marcela Klimešová¹ – Radoslava Jedelská¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský, Ke Dvoru 12a, 160 00, Praha, Česká republika;
Veterinární univerzita Brno, Palackého 1946/1, 612 42, Brno, Česká republika

<https://doi.org/10.11118/978-80-7701-100-6-0075>



ABSTRAKT

Bioaktivní laktoproteiny v mléce, laktoferin (LF) a lysozym (LYS), nabízejí možnosti kontroly zdraví mléčné žlázy při rutinních analýzách v praxi. Korelace výsledků LF a LYS mezi referenční HPLC a nepřímou metodou MIR-FT byly: 0,79 a 0,51 ($p < 0,001$). Pro LF v kozím mlezivu to bylo 0,91 ($p < 0,001$). Dvě vyšší hodnoty jsou analyticky využitelné. Korelace LF k ukazatelům zdraví vemene prokázaly na možnost praktické interpretace v kontrole zdraví mléčné žlázy.

Klíčová slova: mléko, kráva, koza, analýza, laktoferin, lysozym, zdraví vemene

ABSTRACT

The bioactive lactoproteins in milk, lactoferrin (LF) and lysozyme (LYS), offer possibilities for monitoring mammary gland health in routine analyses in practice. The correlations of LF and LYS results between the reference HPLC and the indirect MIR-FT method were: 0.79 and 0.51 ($p < 0.001$). For LF in goat colostrum it was 0.91 ($p < 0.001$). The two higher values are analytically usable. The correlations of LF to udder health indicators demonstrated the possibility of practical interpretation in monitoring of mammary gland health.

Keywords: milk, cow, goat, analysis, lactoferrin, lysozyme, udder health

ÚVOD

Bioaktivní mléčné proteiny laktoferin (LF) a lysozym (LYS) jsou důležité minoritní složky mléka, které jsou současně předmětem zvýšeného zájmu výzkumu i praxe. Uvedené vyplývá ze skutečnosti, že vykazují antibakteriální účinky (Arnold et al., 1982; Ghosh et al., 2018) a jsou součástí imunitního systému mléčné žlázy. LF je transportní glykoprotein vázající železo, který patří do skupiny transferinů. Je uznán jako potravinový doplněk, včetně kojenecké výživy a bývá i součástí kosmetiky, právě pro jeho antibakteriální aktivitu. LYS je ubikvitární enzym, který se vyskytuje u lidí, zvířat i rostlin. V mlékárenské praxi se lysozym využívá především při výrobě sýrů jako přírodní konzervant, který inhibuje růst klostridií způsobujících pozdní duření.

Z hlediska aktuálního výzkumu zajímavou otázkou jsou možnosti referenčních i nepřímých analýz LF (Soyeurt et al., 2007, 2012, 2020; Nejeschlebová et al., 2025) a LYS (Hanuš et al., 2025) a dále možnosti využití jejich hodnot v případném řízení prevence mastitid. Je tomu tak proto, že bývají zaznamenány vztahy LF a LYS v mléce k dalším průvodním ukazatelům mastitid, zejména subklinických. Příspěvek se zabývá posouzením některých výsledků kalibračních modelů nepřímých metod stanovení LF a LYS v mléce a kolostru a poznatky ohledně vybraných faktorů variability LF a LYS vzhledem na některé ukazatele zánětu mléčné žlázy.

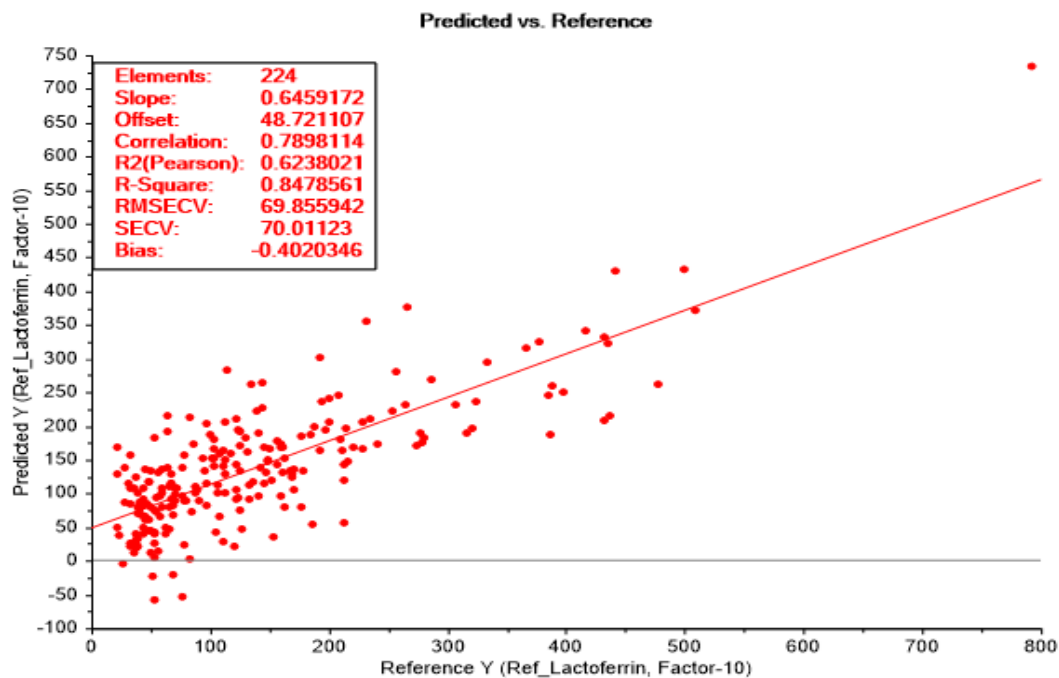
MATERIÁL A METODIKA

Byly odebírány individuální vzorky mléka dojníc při kontrole užitkovosti v zimním a letním období od plemene holštýn (H) a české strakaté (C). Soubory: I $n = 120$, při zvýšené selekci vzorků podezřelých ze subklinické mastitidy (H a C, 1 : 1); II $n = 91$; III $n = 21$, H a C. Soubory pak byly podle účelu hodnocení slučovány. Dále bylo odebráno 24 vzorků kozího mleziva, 2. (12) a 5. (12) den laktace. Referenční analýzy (LF a LYS) byly provedeny vysoceúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC): Alliance 2695 s PDA 2996 detektorem (Waters, USA) a kolonou Poroshell (Agilent Technologies, USA). Složení vzorků bylo měřeno na analyzátoru mléka (MIR-FT) DairySpec FT (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA). Obsah laktózy byl vyjádřen jako % monohydrátu laktózy. Kalibrace infraanalyzátoru (MIR-FT) pro měření LF byla instalována firemně (Craig Parsons, Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA). Počet somatických buněk (PSB) v mléce byl stanoven pomocí metody průtočné cytometrie na fluoro-opto-elektronickém čítači částic Somacount 300 (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA). Měrná vodivost byla stanovena na konduktometru Hanna Instruments HI5321-02 (Woonsocket, USA). Přístroj byl kalibrován příslušným solným roztokem (KCl; $10,2 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$) pro měření každé sady vzorků mléka. Bod mrznutí mléka (BMM) byl stanoven kryoskopem Cryo-Star automatic (Funke-Gerber, Německo). Přístroj byl pravidelně kalibrován standardy solných roztoků (Funke-Gerber, Německo). Statistická analýza byla provedena výpočtem základních charakteristik mléčných ukazatelů. Výsledky ukazatelů PSB a LF byly logaritmicky transformovány. Při tvorbě kalibračních modelů (metoda PLS) a hodnocení vztahů mezi ukazateli a jejich výsledky byla použita lineární regrese a korelační analýza. Všechny operace byly provedeny v programu MS Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

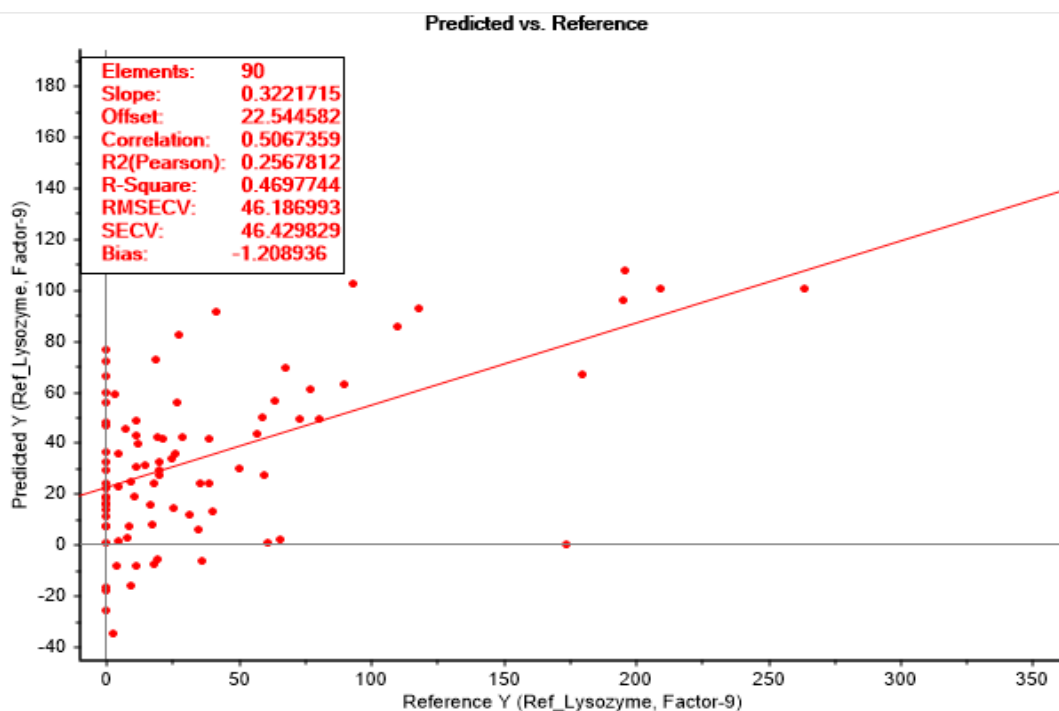
VÝSLEDKY A DISKUZE

Po vyhodnocení vztahů infraskpekter k referenčním hodnotám LF a LYS byly derivovány případné kalibrační modely pro nepřímou metodu MIR-FT. Korelační koeficienty těchto modelů, mezi výsledky metody referenční a nepřímé činily 0,79 a 0,51 (obr. 1 a 2; $p < 0,001$). Ukázalo se tak, že zatímco model LF by mohl být prakticky využitelný k rutinním odhadům koncentrace LF v mléce, např. v kontrole mléčné užitkovosti k dokumentaci dynamiky zdraví vemene, model LYS může naznačit jen velmi hrubý odhad. Důvodem pro nižší spolehlivost výtěžnosti signálu MIR-FT u LYS může být výrazně nižší obsah LYS v porovnání k LF. Zajímavý výsledek byl dosažen při v podstatě „nestandardním měření“ LF v kozím mlezivu (obr. 3) pomocí MIR-FT s LF kalibrací na kravské mléko. Korelační koeficient činil 0,91 ($p < 0,001$). Výsledek je příznivý z analytického pohledu, jakkoliv je postup nestandardní. Příznivý výsledek lze metodicky vysvětlit výrazně vyšším obsahem LF v mlezivu oproti zralému mléku.

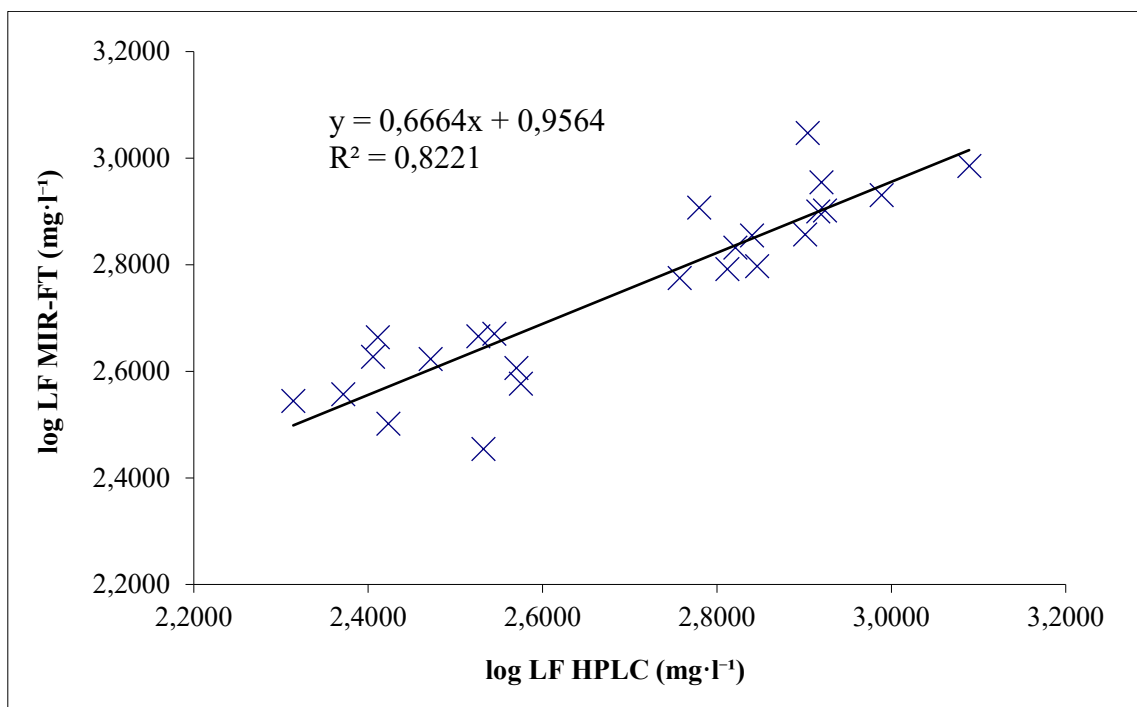
Dále byly prokázány některé vztahy LF a LYS k vybraným ukazatelům zdravotního stavu mléčné žlázy. V kravském mléce byly vypočteny korelace mezi LF HPLC a laktózou -0,45 ($p < 0,001$), PSB 0,53 ($p < 0,001$), konduktivitou 0,33 ($p < 0,01$) a BMM -0,15 ($p > 0,05$). V kozím mlezivu to byl vztah mezi LF MIR-FT a log PSB a laktózou: 0,251 ($p > 0,05$) a -0,84 ($p < 0,001$). V případě LYS kravského mléka byl zajímavý korelační vztah poměrně logicky pozorován k obsahu laktózy, -0,56 ($p < 0,001$; $n = 64$).



Obrázek 1: Kalibrační model MIR-FT pro obsah laktoferinu získaného referenční metodou HPLC; (n = 224), $r = 0,79$ ($p < 0,001$), 10 PLS faktorů; Craig Parsons (2024)



Obrázek 2: Kalibrační model MIR-FT pro obsah lysozymu získaného referenční metodou HPLC; (n = 90), $r = 0,51$ ($p < 0,001$), 10 PLS faktorů; Craig Parsons (2024)



Obrázek 3: Vztah mezi výsledky stanovení laktoferinu v kozím mlezivu metodou MIR-FT (s kalibrací na metodu ELISA v kravském mléce) a metodou referenční (HPLC); $n = 24$; $r = 0,907$ ($p < 0,001$)

ZÁVĚR

Ověření způsobilosti nepřímé metody MIR-FT k rutinní analýze obsahu bioaktivních proteinů, laktoferinu a lysozymu, v mléce podle referenčních výsledků HPLC přineslo poznatky k možnostem použití těchto hodnot k praktickým účelům, např. při kontrole mléčné užitkovosti. Po náznaku vztahů LF k ukazatelům zdraví mléčné žlázy se ukazuje prostor k aplikacím v kontrole zdraví vemene a aplikaci prevence subklinických mastitid.

PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla za podpory projektů MZe RO 1426 a NAZV Země QK 21010326.

LITERATURA

- Arnold, R. R., Russell, J. E., Champion, W. J., Brewer, M., Gauthier, J. J. (1982): Bactericidal Activity of Human Lactoferrin: Differentiation from the Stasis of Iron Deprivation. *Infection and Immunity*, 35, 792–799. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/iai.35.3.792-799.1982>
- Ghosh, S., Khan, N. I., Tsavalas, J. G., Song, E. (2018): Selective detection of lysozyme biomarker utilizing large area chemical vapor deposition-grown graphene-based field-effect transistor. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 29. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/iai.35.3.792-799.1982>
- Hanuš, O., Bartáková, K., Nejeschlebová, H., Vorlová, L., Navrátilová, P., Klimešová, M., Kopecký, J., Jedelská, R., Nejeschlebová, L. (2025): CM 47 – Postup rychlého aproximačního odhadu obsahu lysozymu v mléce rutinní metodou infračervené spektrometrie. Metodika, ISBN 978-80-88390-11-4.
- Nejeschlebová, H., Hanuš, O., Bartáková, K., Parsons, C., Samková, E., Vorlová, L., Thompson, G., Hasoňová, L., Konečný, R., Navrátilová, P., Klimešová, M. (2025): Lactoferrin content determined in bovine milk by HPLC and mid-infrared spectrometry – Relation to udder health and potential for detection of milk adulteration. *Czech Journal of Animal Science*, 70(11), 467–479. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/114/2025-CJAS>

Soyeurt, H., Bastin, C., Colinet, F. G., Arnould, V. M. R., Berry, D. P., Wall, E., Dehareng, F., Nguyen, H. N., Dardenne, P., Schefers, J., Vandenplas, J., Weigel, K., Coffey, M., Theron, L., Detilleux, J., Reding, E., Gengler, N., McParland, S. (2012): Mid-infrared prediction of lactoferrin content in bovine milk: potential indicator of mastitis. *Animal*, 6(11), 1830–1838. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S1751731112000791>

Soyeurt, H., Colinet, F. G., Arnould, V. M. R., Dardenne, P., Bertozzi, C., Renaville, R., Portetelle, D., Gengler, N. (2007): Genetic variability of lactoferrin content estimated by mid-infrared spectrometry in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 90(9), 4443–4450. Dostupné z: <https://doi.org/10.3168/jds.2006-827>

Soyeurt, H., Grelet, C., McParland, S., Calmels, M., Coffey, M., Tedde, A., Delhez, P., Dehareng, F., Gengler, N. (2020): A comparison of 4 different machine learning algorithms to predict lactoferrin content in bovine milk from mid-infrared spectra. *Journal of Dairy Science*, 103 (12), 11585–11596. Dostupné z: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18870>

Kontaktní adresa: prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D., Výzkumný ústav mlékárenský, Ke Dvoru 12a, 160 00, Praha, e-mail: oto.hanus@vuchs.cz