

ELŻBIETA KOSTYRA, HENRYK KOSTYRA*

Charakterystyka frakcji peptydowych mleka pochodzącego od krów zdrowych i z chorym wymieniem (mastitis)

Katedra Położnictwa Wydziału Weterynarii,
* Zakład Biochemii Żywności Wydziału Technologii Żywności, AR-T, 10-743 Olsztyn

Zastosowanie nawet najskuteczniejszego systemu niszczącego patogenną mikroflorę obecną w mleku, w momencie kiedy zaszły już zmiany o charakterze proteolityczno-lipolitycznym, nie zapobiega utracie niektórych właściwości żywieniowych i technologicznych mleka. Ograniczenie tych właściwości nie wydaje się być jedyną stratą, ponieważ w takim mleku mogą znajdować się również substancje o działaniu farmakodynamicznym na tkankę nerwową i na mięśniówkę gładką. Związkami tymi są aminy biogenne, tyramina, tryptamina i histamina (5). Innymi substancjami są peptydy opimowe o działaniu podobnym do związków narkotycznych (3).

Celem pracy było porównanie frakcji peptydowych mleka normalnego i mleka pozyskanego od krów dotkniętych zapaleniem wymienia wywołanym przez *Str. agalactiae*.

Materiał i metody

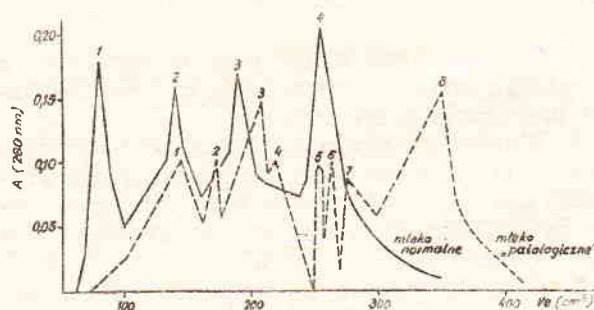
Próbki mleka pobierano od dwóch krów tej samej rasy i wieku. Jedna była zdrowa, druga natomiast wykazywała podkliniczny stan zapalny wymienia. Ilość komórek somatycznych w mleku oznaczano stosując TOK (6). Selekcję mleka ze względu na rodzaj mikroflory wywołującej zapalenie wymienia przeprowadzono metodą Camp test opisaną przez Burbiankę (2).

Białka mleka strącano za pomocą TCA o końcowym stężeniu 12%. TCA usuwano z roztworu metodą ekstrakcji przy użyciu eteru etylowego. Zawartość azotu niebiałkowego w roztworze oznaczano mikrometodą Kjeldahla opisaną przez Budślawskiego (1). Ekstrakt peptydowy rozdzielano metodą sączenia molekularnego na żelu „Bio-gel P-4”. Stosowano kolumnę o wymiarach 2,5×60 cm. Na kolumnę наносono 30 mg ekstraktu peptydowego. Frakcje peptydowe eluowano wodą destylowaną z szybkością 60 cm³/h. Zbierano 4 cm³ frakcji, które identyfikowano spektrofotometrycznie przy długości fali 280 nm. Uzyskane frakcje peptydowe z rozdziału na żelu „Bio-gel P-4” liofilizowano, po czym rozpuszczano w 100 µl wody destylowanej. Następnie poszczególne frakcje peptydowe rozdzielano metodą wysokonapięciowej elektroforezy biułowej (4). Równoległe te same frakcje rozdzielano za pomocą cienkowarstwowej chromatografii na płytkach z żelem krzemionkowym. Jako rozpuszczalnik w chromatografii cienkowarstwowej stosowano układ: n-butanol, kwas octowy, woda (4, 4, 1v/v). Do rozdzielców elektroforetycznych наносono 40 µl próby, natomiast do chromatografii cienkowarstwowej 20 µl. Frakcje identyfikowano za pomocą wywoływacza ninhydrynowego (4). Obecność amin identyfikowano badając fluorescencję w świetle UV. Skład aminokwasowy ekstraktu peptydowego oznaczano przy wykorzystaniu analizatora aminokwasów f-my Jeol. Do hydrolizy pobierano 200 mg ekstraktu peptydowego. Hydrolizę przeprowadzano za pomocą 6 M HCl w temp. 383 K przez 22 h.

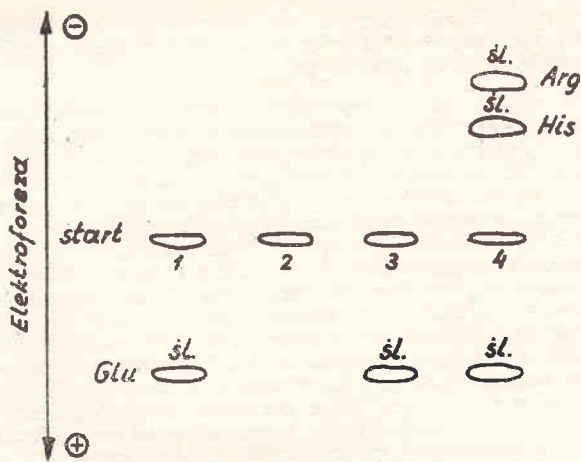
Wyniki i omówienie

Rozdziały ekstratów peptydowych mleka normalnego i pochodzącego od krowy z zapaleniem wymienia uzyskane na żelu „Bio-gel P-4” — przedstawiono na ryc. 1. Ekstrakt peptydowy mleka normalnego rozdzielił się na 4 frakcje, które eluowały się w zakresie 50—300 cm³. Natomiast ekstrakt peptydowy mleka od krowy z zapaleniem wymienia rozdzielił się na 8 frakcji eluujących się w objętości 50—360 cm³. Świadczy to, że w mleku tym białko degradowane jest w większym stopniu do niskocząsteczkowych frakcji peptydowych niż w mleku normalnym. Dodatkowym potwierdzeniem tego faktu jest porównanie zawartości azotu niebiałkowego w obu ekstraktach peptydowych. Zawartość ta w ekstraktach peptydowych mleka normalnego i pochodzącego od krowy z zapaleniem wymienia wynosiła odpowiednio 28 i 70 mg w 100 cm³ mleka.

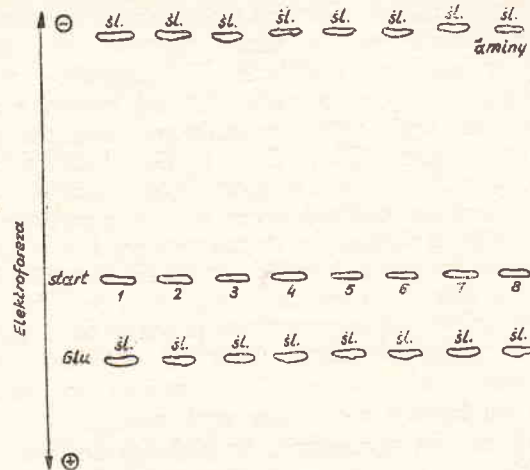
Na ryc. 2 przedstawiono rozdziały elektroforetyczne frakcji peptydowych mleka normalnego uzyskane z sączenia molekularnego na żelu „Bio-gel P-4”. W żadnej frakcji nie stwierdzono peptydów o charakterze kwaśnym lub zasadowym. We frakcjach 1, 3 i 4 wykryto obecność Glu. Natomiast we frakcji 4 poza Glu występowały również Arg i His. W wyniku rozdzielania tych samych frakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej uzyskano podobne wyniki, które przedstawiono na ryc. 3. Frakcja 2 nie uległa rozdzielaniu. Po jednej dodatkowej frakcji uzyskano w wyniku rozdzielania frakcji 3 i 4. Rozdział frakcji 1 ujawnił obecność dwóch dodatkowych frakcji. Te same rozdziały dla ekstraktu peptydowego mleka pochodzącego od krowy z zapaleniem wymienia przedstawiono na ryc. 4 i 5. W tych rozdzia-



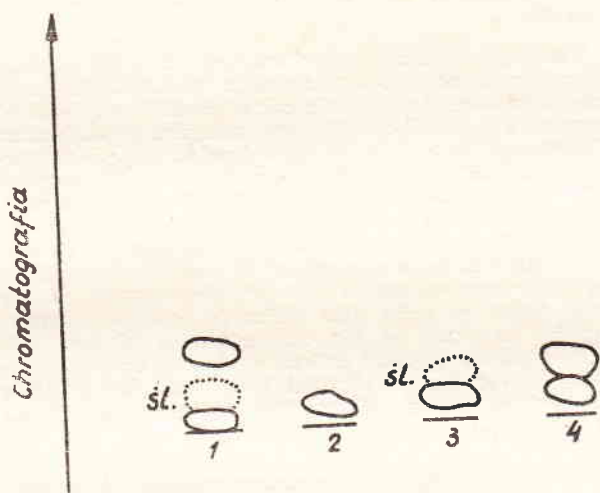
Ryc. 1. Rozdział ekstraktu peptydowego mleka normalnego i „patologicznego” na żelu „Bio-gel P-4”



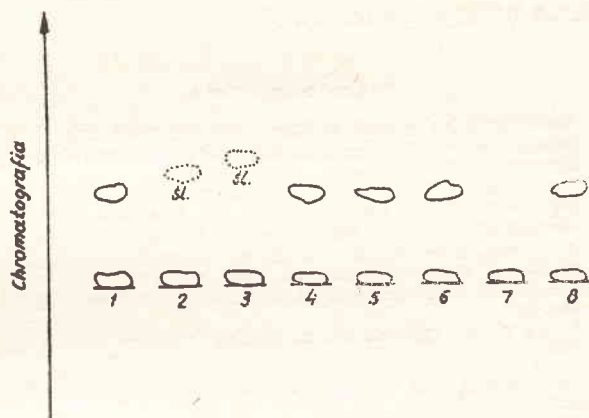
Ryc. 2. Elektroforegram frakcji peptydowych mleka normalnego uzyskanych z rozdziału na kolumnie z żelalem „Bio-gel P-4”



Ryc. 4. Elektroforegram frakcji peptydowych mleka „patologicznego” uzyskanych z rozdziału na kolumnie z żelalem „Bio-gel P-4”



Ryc. 3. Chromatogram frakcji peptydowych mleka normalnego uzyskanych z rozdziału na kolumnie z żelalem „Bio-gel P-4”



Ryc. 5. Chromatogram frakcji peptydowych mleka „patologicznego” uzyskanych z rozdziału na kolumnie z żelalem „Bio-gel P-4”

łach interesującym faktem jest to, że na elektroforegramach wszystkich frakcji peptydowych wykryto Glu i aminy. Uzyskane rozdzielacze za pomocą chromatografii cienkowarstwowej nie dostarczają żadnych dodatkowych informacji i dlatego nie są szerzej dyskutowane.

Wyniki te pozwalają na stwierdzenie dwóch faktów. Po pierwsze — obecność amin w mleku pochodzącym od krowy z zapaleniem wymienia dowodzi głębokiej degradacji białek mleka przez enzymy mikroflory patogenicznej. Po drugie — aminy jak i wolne aminokwasy prawdopodobnie tworzą kompleksy z peptydami i dlatego nie dają się w prosty sposób odzielić za pomocą sączenia molekularnego.

Wyniki analizy składów aminokwasowych ekstratów peptydowych obu badanych rodzajów mleka przedstawiono w tab. 1. Przede wszystkim należy stwierdzić, że zarówno w

Tab. 1. Zawartość aminokwasów w ekstrakcie peptydowym mleka normalnego i „patologicznego” (g/100 g ekstraktu)

Aminokwas	Mleko	
	normalne	„patologiczne”
His	9,9	7,3
Arg	1,5	śl.
Asp	6,0	8,6
Thr	4,3	3,4
Ser	4,4	6,5
Glu	16,1	21,6
Pro	12,5	0,0
Gly	5,4	4,1
Ala	4,1	3,0
Val	4,9	1,9
Ileu	2,3	1,5
Leu	10,5	1,8
Phe	15,4	9,2
Lys	11,9	14,3
NH ₃	śl.	obecny
Suma	108,8	82,2

jednym, jak i drugim ekstrakcie peptydowym obecne są te same aminokwasy, chociaż w różnych ilościach. W ekstrakcie peptydowym mleka pochodzącego od krowy z zapaleniem wymienia stwierdzono większą zawartość Asp, Glu, Ser i Gly. Zawartość pozostałych aminokwasów była niższa niż w ekstrakcie peptydowym mleka normalnego. Szczególnie dotyczyło to zawartości Pro i Arg, które występowały zaledwie w śladowych ilościach. Tak znikoma zawartość Arg wydaje się potwierdzać zaobserwowane procesy dezaminacji i dekarboksylacji, których efektem jest obecność amin i amoniaku w mleku pochodzącym od krowy z chorym wymieniem. W konkluzji można stwierdzić, że głęboka degradacja białek mleka przez peptydazy mikroflory patogennej będzie również wpływać na ciepłą stabilność mleka oraz na stopień wykorzystania białek mleka podczas produkcji sera. Natomiast obecność amin w mleku budzi zastrzeżenia natury żywieniowej.

Piśmiennictwo

1. Budzawski J.: Metody analizy żywności. WNT 1972.
2. Burbińska M., Pliszka A., Burzyńska H.: Mikrobiologia żywności. PZWL 1983.
3. Henschen A., Lottspeich F., Brantl V., Teschemacher H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 300, 1217, 1979.
4. Mastowski P.: Roczn. Nauk roln. 81, 561, 1980.
5. Sayem-El Daher N., Simard R. E., L'heureux L., Roberge A. G.: J. Chromatog. 256, 313, 1983.
6. Schalm O. W., Noorlander D. O.: J. Am. vet. Med. Ass. 130, 199, 1975.
7. Singh L. N., Ganguli N. C.: Indian J. Dairy Sci. 28, 273, 1975.

Adres autora: dr Elżbieta Kostyra, Boenigka 15/4, 10-686 Olsztyn

Костыра Э., Костыра Г. — Характеристика фракций молока от здоровых коров и больных воспалением вымени „маститом”

В работе охарактеризовано пептидные фракции, присутствующие в нормальном и маститном молоке. В маститном молоке идентифицировано бактерии *Str. agalactae*. Пептидные экстракты нормального и маститного молока исследовано, применяя методы гелевой фильтрации на Bio-gel P-4, высоконапряжённого бумажного электрофореза, тонкослойной хроматографии, а также анализа аминокислотных составов. В маститном молоке по сравнению с нормальным молоком констатировано высшее содержание пептидных фракций небелкового азота и аммиака. Добавочно обнаружено в маститном молоке амины. Констатировано также расхождение в аминокислотных составах пептидных экстрактов нормального и маститного молока. Анализ полученных результатов делает возможным оценить отрицательные последствия патогенной микрофлоры в молоке с физиологически-кормовой и технологической точки зрения.

Kostyra E., Kostyra H. — Characteristics of the peptide fractions in milk of healthy cows and cows with mastitis

The paper presents the characteristic of the peptide fractions of normal and mastitic milk. *S. agalactiae* was identified in mastitic milk. Peptide extracts of normal and mastitic milk were analyzed by molecular filtration (Biogel P-4), a high tension paper electrophoresis and a thin-layer chromatography. The amino acid composition was also analyzed. The mastitic milk contained higher levels of peptide fractions, non-protein nitrogen and ammonia in comparison to normal milk. Amines were also found in mastitic milk. Amino acid composition of the peptide extracts of the both types of milk also differed. Special attention should be given to the disappearance of Arg and Pro from the peptide extract of mastitic milk. Analysis of the results allowed to present the possible negative properties of mastitic milk in view of its technological and nutritive values.

HYTTEL P., GREVE T.: Synchronizacja rui u krów mlecznych. (Heat synchronization in dairy cows). Nord. Vet. Med. 35, 422—428, 1983 (11).

Krowy mleczne u których w celu synchronizacji rui zastosowano 2 iniekcje cloprostenole (PG1/PG2) w odstępie 13 dni poddano sztucznej inseminacji po 72 godzinach po iniekcji PG2. Równocześnie pobrano mleko w którym oznaczono poziom progesteronu. Po 30 dniach po inseminacji wszystkie krowy zbadano na ciążę badaniem rektalnym. Niezależnie od stanu fizjologicznego układu rodowego (faza lutealna, pęcherzykowa, cysty względnie małe jajniki) w chwili podania PG1, odsetek zacielen był identyczny. Na odsetek zacielen wpływało wystąpienie rui w momencie inseminacji i odstęp czasu jaki upłynął od wycielenia do zastosowania PG1.

G.

GUNARATMAN P., WILLINSON G. T., SEAWRIGHT A. A.: Badania nad toksycznością amitrazy dla kotów. (A study of amitraz toxicity in cats). Aust. vet. J. 60, 278—279, 1983 (9).

Amitraza jest stosowana u bydła i owiec do zwalczania kleszczy, u psów w leczeniu demodekozy. Badania nad wpływem amitrazy stosowanej w formie kąpeli (0,0125%; 0,025% i 0,05% roztwór wodny) u czterech kotów wykazały, że kąpiel w 0,0125% roztworze amitrazy obniżała łaknienie w okresie 24 godzin po zabiegu. Przy kąpeli w wyższych stężeniach

preparatu oprócz utraty łaknienia występowała osowiałość, utrzymująca się przez 48—72 godziny. Często obserwowano wydalanie półpłynnego kału. Kąpiele w 0,05% roztworze amitrazy nasilały objawy sedacji, utraty łaknienia i zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego oraz wywoływały rozszerzenie źrenic.

G.

PRESCOTT C. W.: Objawy kliniczne u psów i kotów przy zatruciu ołowiem. (Clinical findings in dogs and cats with lead poisoning). Aust. vet. J. 60, 270—271, 1983 (9).

W klinice uniwersyteckiej w Queensland w okresie 11 lat zdiagnozowano 68 przypadków zatrucia ołowiem u psów i trzy przypadki zatrucia ołowiem u kotów. U psów zatrucia występowały w wieku od 3 miesięcy do 3 lat, przy czym 63% zatruc wystąpiło u szceniąt w wieku 3—6 miesięcy. U 94% zatrutych psów występowały zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego (anorexia, nadmierne ślinienie, wymioty, ostra biegunka, bolesne spastyczne kolki), zaś u 67,6% zaburzenia ze strony ośrodkowego układu nerwowego. Stężenie ołowiu we krwi powyżej 0,3 ppm przy równoczesnym występowaniu objawów klinicznych uznano za stężenie toksyczne. U badanych psów to stężenie wahało się do 25 do 174 ug/dl (średnio 79 ug/dl).

G.