

Afslutningsrapport

Mælke kvalitet – betydning af somatiske celler

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2006-78

November 2006



mejeriforeningen

danish dairy board

**Mælke kvalitet - BETYDNING AF SOMATISKE
CELLER I MÆLK**

**AF LOTTE BACH LARSEN & JACOB H. NIELSEN
AFDELING FOR RÅVAREKVALITET
DANMARKS JORDBRUGSFORSKNING**

SUMMARY IN ENGLISH

Even at a moderately increased cell count, an increased level of a series of quality deteriorating enzymes and markers for these is present, both proteolytic and oxidative, and some of these are primarily associated with the cell fraction (cathepsin B) while others primarily are present in the skim milk (plasmin) or both places (cathepsin D/procathepsin D).

The content of cathepsins in the milk varies between early secretion, colostrum and milk. This indicates that there is a physiologically regulating function of these enzymes in the mammary gland. Moreover, the studies have shown that there still is a number of proteolytic enzymes in milk which have not yet been identified. That the cathepsin D activity of milk increases with the cell count is attributable to an increased content of its pro enzyme and not an increased activation of the pro enzyme present – contrary to the plasmin system.

At clinical mastitis an extensive decomposition of the casein can occur, where up to more than 50% may be decomposed. Moreover, the casein and the milk quality from non-infected glands can be influenced negatively. The responsible enzymes comprise both plasmin and the cell-associated proteases cathepsin B and D. In milk from the infected glands, it especially seems to be the cell-associated proteases which are responsible for proteolysis, while in the non-infected glands plasmin seems to be responsible.

Infusion experiments with LPS resulted in clinical signs of mastitis and caused proteolysis in milk from infected glands. There was a slightly increased proteolysis in milk from non-infected glands, which confirms that spreading of poor milk quality from infected glands to non-infected glands can take place, even though no clinical signs appear. Refrigerated storage showed that in milk with cell counts of 1,000,000, proteolysis of the milk protein takes place after 3 days of storage.

This might have an effect on products, including cheese yield, but there was no sensory differences of the stored sample with high cell count and a control sample.

Model experiments have shown that plasmin, contrary to what has previously been reported in literature, can decompose κ -casein. Moreover, not only plasmin but also cathepsin D were able to cause extensive casein decomposition in the area of approx. 50% of plasmin measured in the number of free amino terminals. However, there was also indications of synergy effects between the enzymes which can contribute to the protein decomposition by acute and subclinical mastitis where both the enzymes are present. Master maps of the fragment formation at decomposition of caseins with plasmin and cathepsin D can be used as references in future studies of proteolysis developments in milk or cheese caused by natural proteases.

The increased level of proteolytic enzymes with the cell count means that the content of peptides in raw milk all ready in dairy milk with a moderately increased cell count (500,000 cells/millilitre) is higher than in high quality milk. The peptides originated from casein and were the result of the increased proteolysis. Not only plasmin, but also enzymes, that can originate from the somatic cells, contributed to the proteolysis, as e.g. cathepsins and elastase.

Sensory analysis of skim milk with added proteases showed that the effect of plasmin on the flavour was lower than the effect of trypsin. Trypsin added in a high concentration caused a flavour somewhat like cardboard, bitter and metal, while plasmin added in a high concentration had a tendency to give a flavour somewhat like fatty/creamy.

Formål: At tilvejebringe ny viden om somatiske cellers indflydelse på kvalitetsparametre i mælk og opbygge ny viden der gør det muligt at reducere kvalitetsforringelser forårsaget af somatiske celler i mælk.

MÅL

- At klarlægge hvilke komponenter (enzymer, aktivatorer og inhibitorer) forhøjet celletal i mælk bidrager med, og hvorvidt disse hidrører fra blodserum eller udskilles fra de somatiske celler.
- Betydningen af udvalgte enzymer, aktivatorer og inhibitorer hidrørende fra mælkens celler på mælke kvalitet.
- At belyse betydningen af mekanisk belastning og køling i relation til aktivering/lysning mælkens somatiske celler og hvorledes dette påvirker mælkekvaliteten.
- At afdække mulige proces teknologiske tiltag, der kan reducere effekten af somatiske celler på mælkekvaliteten.

BAGGRUND

Interessen for fødevarekvalitet har i de sidste år været stærkt stigende. Forbrugeren interesserer sig således for spisekvalitet såvel som de blødere kvalitetsparametre eksempelvis dyrevelfærd, oprindelse og lignende. Dagspressen har således en betydelig indflydelse på forbrugers stillingtagen og valg af levnedsmidler og der har i den seneste tid været fokus på forekomsten af somatiske celler i dansk mælk. Somatiske celler i mælken er med til at hindre udvikling af infektioner i yveret og under normale omstændigheder en naturlig betingelse for høj dyrevelfærd. Forhøjet celletal i mælk som resultat af subklinisk mastitis udgør et æstetisk problem for forbrugeren og påvirker mælkekvaliteten gennem øget proteolyse og lipolyse (Senyk et al., 1985; Christen et al.,

1994). Det må formodes, at aktivering af mælkens somatiske celler er af afgørende betydning for mælkens oxidative stabilitet. Nyere studier viser således, at aktiverede neutrofile granulocytter danner hydrogenperoxid, som efterfølgende kan aktivere laktoperoxidase og myeloperoxidase. Hydrogenperoxid aktiveret laktoperoxidase danner reaktive radikaler, som fremmer uønskede kædereaktioner, fx oxidation af lipider, proteiner og vitaminer (Nielsen et al., 2000; Østdal et al., 2000a, Østdal et al., 2000b). Viden om hvorvidt specifikke enzymer, inhibitorer og aktivatorer hidrører direkte fra mælkens celler, stammer fra blodserum eller yverepithel er yderst begrænset for en lang række af mælkens enzymer, og ny viden på dette område er vigtig før det gennem procesteknologiske tiltag bliver muligt at minimere kvalitetsforringende aspekter som følge af forhøjet celletal.

Nærværende projekt skal tilvejebringe ny viden om hvorledes somatiske celler påvirker mælkens kvalitet og hvorledes det er muligt at reducere effekten af somatiske celler i mælk ved nye procesteknologiske tiltag.

AFVIGELSER FRA PROJEKT PLAN

Projektforlængelse

Projektet er forlænget to gange grundet barsler og blev afsluttet ved udgangen af 2005

RESULTATER

I: IDENTIFIKATION AF ENZYMER, INHIBITORER OG AKTIVATORER HIDRØRENDE FRA SOMATISKE CELLER I MÆLK

Effekt af klinisk mastitis på proteolyse og mælkens sammensætning og holdbarhed: Infektionsforsøg med *Streptococcus uberis*

Projektets første forsøg omfattede et dyrlægekontrolleret infektionsforsøg med 4 dyr, der blev inficeret på en kirtel med *Streptococcus uberis*. *S. uberis* er en meget almindelig miljø-betinget mastitisbakterie, og ansvarlig for en signifikant andel af de kliniske mastitistilfælde i Danmark.

Prøver blev taget fra kontrol nabo-kirtlen og fra den ”inficerede” kirtel en gang inden infektion og ved de efterfølgende 3 malkninger, dvs. svarende ca. til 1,5 døgn efter infektion. Dyrene blev herefter behandlet med antibiotika.

Der var forholdsvis stor variation mellem dyr i responset på infektion med *S. uberis*. Selv om alle 4 dyr viste tegn på klinisk mastitis i den inficerede kirtel var det kun i 3 af disse, der var en stigning i celletal og medfølgende øget proteolyse.

Samlet statistisk analyse påviste dog overordnet set, at logSCC var markant højere i mælk fra inficerede kirtler, sammenlignet med ikke-inficerede kirtler. Ydermere steg logSCC med malkningsnummer for de inficerede kirtler. Resultater vedrørende proteolyse viste, at niveauet af frie N-terminaler var signifikant højere i mælk fra inficerede kirtler sammenlignet med ikke-inficerede, og desuden at det steg med celletallet. Analyse af kaseinet fra inficerede og ikke-inficerede kirtler viste en omfattende nedbrydning, især af kaseinet fra malkning 3, og især i de prøver, der havde størst respons på celletal, hvor mere end 50 % af kaseinet var nedbrudt. Et af de dannede fragmenter havde en størrelse, svarende til α_{S1} -I kasein fragmentet. Det viste, at der var en negativ udvikling i mælkekvaliteten fra malkning 1 til malkning 3 efter infektion. En andet meget markant resultat var, at det ikke kun var kvaliteten af den inficerede kirtel, der var påvirket, men også kvaliteten af mælken fra nabo-kirtlen, på trods af, at den ikke var inficeret og ej heller havde forhøjet celletal.

Der blev herefter indledt undersøgelser af proteolytiske enzymer i prøverne for at kunne pege på, hvilke enzymer, der var ansvarlige for den observerede kvalitetsforringelse. Niveauet af både plasmin og plasminogen var højere i mælk fra de inficerede kirtler sammenlignet med mælk fra ikke-inficerede. Grundet variation mellem dyr, og yderligere kompliceret med en øget plasminogen aktivering fra malkning 1 til malkning 3 efter infektion, var disse forskelle ikke signifikante. Derimod var middel-stigningen i plasmin aktivitet i mælk fra både inficerede og ikke-inficerede kirtler signifikant højere sammenlignet med deres pre-infektionsniveau.

Der var desuden en signifikant effekt af celletal på cathepsin D aktiviteten, og aktiviteten var for dette enzym signifikant højere i mælk fra de inficerede kirtler sammenlignet med ikke-inficerede. Immunoblotning viste, at mælk fra inficerede kirtler indeholdt både cathepsin D og cathepsin B.

For at studere betydningen af enzymer, inhibitorer og co-faktorer, der kan relateres til somatiske celler i mælk for mælke kvaliteten blev der udført et lagringsforsøg med opbevaring af mælk fra *S. uberis* forsøget ved 10°C i op til 72 timer, og udviklingen i frie amino-terminaler, som et mål for proteolysegraden, blev bestemt. Samlet set pegede lagringsforsøgene på, at det i mælk fra inficerede kirtler med meget højt celletal primært er andre proteaser, end plasmin og bakterielle proteaser, der var ansvarlig for den proteolyse, der fandt sted under lagringen.

Samlet pegede disse undersøgelser på, at der ved klinisk mastitis kan forekomme omfattende nedbrydning af kaseinet, hvor helt op til mere end 50 % kan være nedbrudt. Desuden kan kaseinet og mælke kvaliteten fra ikke-inficerede nabo-kirtler være påvirket i negativ retning. De enzymer, der kan være ansvarlige nedbrydningen omfatter både plasmin, og de mere direkte-celleassocierede proteaser som cathepsin B og D. De detaljerede undersøgelser peger på, at det i mælken fra de inficerede kirtler især er de celle-associerede proteaser, som cathepsinerne, og muligvis andre endnu ikke påviste proteaser, der er ansvarlige for proteolysen her, mens det i de ikke inficerede nabo-kirtler sandsynligvis er plasmin, der er ansvarlig. Dette kan tilskrives, at plasmin stammer fra blodet i form af plasminogen, og sandsynligvis stiger i alle dyrets kirtler pga. en systemisk påvirkning af dyret med forringet blod-mælk barriere til følge.

II: BETYDNING AF CELLESPECIFIKKE ENZYMER, INHIBITORER OG AKTIVATORER PÅ KVALITETSUDVIKLING OG KVALITET AF MÆLK

Effekt af subklinisk mastitis på indhold af kvalitetsforringende enzymer i mælk og cellefraktion: Mælk fra dyr med moderat forhøjet celletal

Mælk blev udtaget på kirtelniveau fra 10 lakterende køer med subklinisk mastitis på en kirtel. Køerne blev udvalgt til forsøget på basis af en CMT test (California Mastitis Test), der er almindelig anvendt i praksis i besætninger til karakterisering af sub-klinisk mastitis, og afspejler mængden af DNA i mælken. Kirtler med CMT scores på 4-5 blev karakteriseret som havende sub-klinisk mastitis, mens kirtler med en CMT på 3-4 fra det samme dyr blev brugt som kontrol. Formålet med forsøget var at undersøge mælkens kvalitet og indhold af enzymer ved moderat forhøjet celletal, dvs. dyr, der leverer mælk til mejeriet. Enzymindholdet blev undersøgt i hhv. skummetmælksfraktionen og i cellefraktionen efter kølelysering på prøver fra kirtler med hhv. høj og lav CMT.

Resultater vedrørende plasmin viste, at plasmin aktiviteten i mælk er associeret med skummetmælken og ikke med cellefraktionen. Der var desuden, for de fleste af dyrene i forsøget, som forventet, et højere niveau af plasmin i mælken fra kirtler med høj CMT værdi sammenlignet med lav CMT værdi.

Målt ved aktivitetsassays (der bestemmer samlet mål for cathepsin D + procathepsin D) var der endvidere et højere niveau af cathepsin D-relateret aktivitet i mælk og cellelysat fra kirtler med høj CMT værdi end med lav CMT værdi for de fleste af dyrene. Ved anvendelse af zymografi blev der ligeledes påvist cathepsin D aktivitet i celler fra mælk med høj CMT, men ikke i celler fra kirtler med lav CMT.

Aktivitetsassays viste desuden, at cathepsin D, i modsætning til plasmin, findes både i skummetmælksfraktionen og associeret med cellerne. Immunoblotning ved brug af antistof mod cathepsin D bekræftede, at der findes enzymer fra cathepsin D systemet i både skummetmælk og i mælkens cellefraktion. I skummetmælk findes enzymet primært som procathepsin D, mens der i cellelysaterne findes både det aktive enzym (cathepsin D) og pro-formen (procathepsin D). Den del af cathepsin D, der findes i skummetmælken kan have en effekt i valleprotein-indeholdende mejeriprodukter, med et surt pH, fremstillet af mælk med moderat forhøjet celletal, idet proenzymet cathepsin D i disse prøver kan aktiveres. Resultaterne viste videre, at den celleassocierede del af cathepsin D-aktiviteten kan fjernes fra mælk ved at behandle den, således at cellerne fjernes, ved

f.eks. centrifugering eller filtrering, men det skal ske inden cellerne er gået i stykker (lyseret) og har frigivet deres indhold.

Ved brug af immunoblotning blev der også undersøgt for tilstedeværelse af cathepsin B i prøverne. Der blev påvist aktivt cathepsin B i cellelysater fremstillet fra høj CMT mælk, mens der ikke kunne detekteres cathepsin B i skummetmælksfraktionen. Det peger på, at cathepsin B primært er associeret med cellefraktionen i disse prøver.

III: BETYDNING AF KØLING OG MEKANISK BELASTNING PÅ SOMATISKE CELLERS UDSKILLELSE AF KVALITETSFORRINGENDE ENZYMER OG CO-FAKTORER

Der blev også undersøgt for tilstedeværelse af oxidative enzymer i skummetmælk og cellelysater fra forsøget. Ved aktivering af peroxidase med hydrogen peroxid blev der ikke fundet nogen signifikant sammenhæng mellem mælk fra kirtler med høj og lav CMT værdi, hverken i skummetmælk eller i cellelysater. Ved en mere specifik aktivering af laktoperoxidase med tert-butyl hydroperoxid sås der generelt en højere aktivitet i cellelysater fra mælk med højt celletal, end fra mælk med lavt celletal. ESR målinger af den radikal-intensitet, der kan induceres ved tilsætning hydrogenperoxid til skummetmælk viste, at der var en tendens til større radikaldannelse i skummetmælken fra køer med subklinisk niveau af celler sammenlignet med mælk fra kontrolkirtlerne. Som et mål for proteinoxidationen blev dityrosindannelsen i skummetmælk efter tilsætning af hydrogenperoxid bestemt. Resultaterne viste, at der blev dannet dityrosin, og at denne dannelse kunne inhiberes ved tilsætning af azid. Der var signifikant forskel i dityrosindannelsen mellem skummetmælk fra kirtler med høj og lav CMT-værdi, og desuden var der positiv korrelation mellem celletal og dannet dityrosin.

Tilsætning af cellelysater til skummetmælk, og efterfølgende inkubering af disse prøver ved 4°C viste, at der blev spaltet i kaseinerne, idet der blev dannet forskellige nye fragmenter, hveraf et med en molekylmasse svarende til α_{S1} -I kasein fragmentet.

Tilsammen viser undersøgelseerne, at der allerede ved moderat forhøjet celletal findes forhøjet niveau af en række kvalitetsforringende enzymer, både proteolytiske og oxidative, og at nogle af disse primært er associeret med cellefraktionen (cathepsin B), mens andre findes primært i skummetmælken (plasmin) eller begge steder (cathepsin D/procathepsin D).

Lagringsforsøg og sensorik af opblandet mælk fra infusionsforsøg med LPS

Der er i projektet gennemført et infusionsforsøg på 5 SDM køer med LPS (lipopolysaccharid) fra *Streptococcus uberis* mastitisbakterien. Formålet var at undersøge effekten af højt celletal mælkens kvalitet i infunderede kirtler og i nabo-kirtler, samt at belyse effekten af celler på mælkens flavour. Et *infusionsforsøg* adskiller sig fra et *infektionsforsøg* ved at man undgår bidrag af enzymer og aktivatorer fra agens. Undersøgelserne på mælkens kvalitet blev udført både på kirtelniveau og i blandingsmælk, hvor effekten af opblanding af høj celletals-mælk med god kvalitet skummetmælk blev undersøgt før og efter lagring.

Bestemmelse af frie amino-terminaler viste et flere gange forhøjet niveau i mælk fra kirtler infunderet med LPS sammenlignet med mælk fra ikke-infunderede nabo-kirtler, og med niveauet inden infektion. Niveauet var højest i mælk fra 1. malkning efter infusion, og var faldet lidt til 2. malkning, hvilket kunne tyde på, at mælkekvaliteten var ved at rette sig, ligesom der sås et fald i celletal. Der var dog en tendens til, at niveauet af frie amino-terminaler i de ikke-infunderede kirtler steg efter infusion i nabo-kirtlerne, hvilket indikerer en vis ”spredning af dårlig mælkekvalitet” fra de infunderede kirtler til nabokirtler, selv om disse ikke udviste tegn på inflammation. En tilsvarende ”spredning af dårlig mælkekvalitet” er ligeledes vist i dette projekt i forbindelse med undersøgelserne af mælkens kvalitet og sammensætning efter infektion med *S. uberis* (under punkt **I**).

Undersøgelser af plasminaktiviteten viste, at der var meget forhøjet plasmin aktivitet i mælk fra LPS behandlede kirtler, mens niveauet var svagt forhøjet i mælk fra nabokirtlerne. Undersøgelser af plasminogen viste, at der var forhøjet niveau af

plasminogen-afledt aktivitet i mælk fra LPS-infunderede kirtler fra 1. malkning efter infusion, men at dette var faldet meget fra 1. til 2. malkning, hvilket kunne tyde på en øget plasminogen aktivering i mælk mellem 1. og 2. malkning. Isolering og undersøgelse af kaseinet viste, at der var tydelig kaseinnedbrydning med kvantitativ effekt på kaseinet i mælk fra infunderede kirtler, men i mindre omfang på kaseinet fra de ikke-infunderede nabo-kirtler. Zymografier af enzymaktivitet i mælken fra forsøget viste, at der var cathepsin D aktivitet især i følgende sekventielle rækkefølge i de infunderede kirtler: plasminogen stiger som følge af en forringet blod-mælk barriere → der sker en (øget) aktivering af plasminogen til plasmin → plasmin stiger → de celle-associerede enzymer som cathepsin D, stiger → kasein nedbrydes.

Analyse af peroxidase aktivitet i mælk fra infunderede og ikke-infunderede kirtler viste, at peroxidase aktiviteten blev øget i såvel infunderede som ikke-infunderede nabokirtler. Dette resultat bekræfter, at infektion ikke kun påvirker mælke kvaliteten i inficerede kirtler, men påvirker mælke kvaliteten fra dyret.

IV: KLARLÆGNING AF PROCESTEKNOLOGISKE TILTAG DER REDUCERER DE KVALITETSREDUCERENDE EFFEKTER AF CELLER OG UNDERSØGE BETYDNING FOR PRODUKTHOLDBARHED OG SMAG

Opblanding af mælk fra infunderede kirtler med indkøbt skummetmælk blev undersøgt i et lagringsforsøg. Efter lagring (3 dage ved 4°C) var der en stigning i proteinnedbrydningen som målt ved stigning i antallet af frie amino terminaler i både den "rene" indkøbte skummetmælk (kontrollen) og i den opblandede mælk, der samlet havde et celletal på 1.000.000. Dog var både niveau og stigning signifikant højere ved lagring af den opblandede mælk end i den "rene" skummetmælk. Der var ikke i den opblandede mælk nogen stigning i den samlede plasmin aktivitet under lagring, og effekten på stigningen i frie amino-terminaler kan skyldes både den plasmin, der er til stede og bidrag fra celle-associerede proteaser.

Der blev udført sensorik på den opblandede skummetmælk med celletal på 1.000.000 efter forudgående pasteurisering. Disse sensoriske analyser viste ingen perceptuelle forskelle mellem kontrol skummetmælken og den modsvarende prøve med det høje celletal. Det betyder, at de forskelle der måtte være, og som bl.a. blev afspejlet i det forhøjede niveau af frie amino terminaler, ikke var af betydning for den sensoriske kvalitet.

Effekt af laktationsstadiet og celletal for proteolytiske enzymer i mælk

Variationer i indhold af cathepsiner i mælk på forskellige laktationsstadier og celletal blev yderligere undersøgt i et separat studie hvor også tidlig sekret og kolostrum indgik. Formålet var at undersøge effekten af laktationsstadiet og celletal på celle-medieret proteolyse i mælk. Cathepsin D aktiviteten fandtes at være højst i tidlig sekret (udtaget i goldperioden ca. 14 dage for forventet kælvning), lavest i kolostrum og på i middel niveau i mælk i løbet af selve laktationsperioden, hvor aktiviteten var ret konstant. Også cystein protease aktivitet blev undersøgt, og her var aktiviteten højst 1 uge efter kælvning, og lavest i midt-sen laktationsmælk. Cystein protease aktiviteten menes at stamme fra bl.a. cathepsin B, men det er sandsynligt, at der også findes andre cystein proteaser i mælk, som endnu ikke er identificeret. Desuden blev proteolytisk aktivitet fra en ikke-identificeret protease detekteret. Immunoblotting viste, at den målte cathepsin D aktivitet i tidlig sekret stammede fra aktivt cathepsin D og procathepsin D, der blev aktiveret i assayets lave pH, mens aktiviteten i kolostrum og mælk primært skyldtes procathepsin D. Der var positiv korrelation mellem celletal og cathepsin D aktivitet. Immunoblots viste, at stigningen i aktiviteten med celletallet kunne tilskrives øget indhold af procathepsin D (der aktiveres i assayet), og ikke af selve den aktive form i mælken. Det viste, at der, i modsætning til plasmin-systemet, ikke finder øget cathepsin D-aktivering sted i mælken ved højt celletal.

Modelforsøg: Effekt af bovine celle-associerede proteaser på kaseinnedbrydning

Der er gennemført modelforsøg til belysning af bidraget af celle-associerede enzymer for proteolyse i mælk. Som enzymer blev anvendt plasmin og cathepsin D. Forsøgene omfattede både tilsætning af enzymerne enkeltvis og i kombinationer, for derigennem at kunne belyse

eventuelle synergieffekter proteaserne imellem. Forsøgene blev udført med kasein som substrat ved mælke-pH (pH 6.7), og afspejler dermed forskelligt proteasers mulige bidrag til proteinnedbrydningen i rå mælk med forhøjet celletal. Resultaterne bekræftede, at bidraget fra plasmin var højere end fra cathepsin D, bl.a. fordi mælkens pH ligger tættere på plasmins optimum end cathepsin D's. Der var dog en stigning i proteolysegraden, målt som antallet af frie amino-terminaler, både med tilsat plasmin og tilsat cathepsin D, og cathepsin D var i stand til også at forårsage omfattende nedbrydning, svarende til ca. 50% af plasminniveauet efter en inkubation på ca. 1 døgn ved 37°C. Den største protein nedbrydning blev dog observeret i det forsøg, hvor der først blev tilsat plasmin, og derefter cathepsin D, der gav større nedbrydning end i forsøget, hvor de blev tilsat samtidig. Det tyder på, at der kan være en synergieffekt mellem enzymerne.

Nedbrydningsmønsteret i disse modelforsøg blev yderligere analyseret ved hhv. to-dimensionel gel elektroforese, og ved peptid-mapping og -identifikation gennem LC MALDI spotting. Disse to metoder supplerer hinanden, idet der ved de to-dimensionelle geler kan ses fragmenter ned til ca. 5 kDa, mens der ved LC metoden kan detekteres meget mindre peptider, ned til få resters længde. Begge metoder kombineres med MALDI-TOF MS, hvorved proteiner, fragmenter og peptider kan identificeres. Tilsammen har disse modelforsøg resulteret i frembringelse af et masterkort, der kan anvendes i forbindelse med fremtidige karakteriseringer af proteolyseprocesser i mælk og ost.

Ved anvendelse af LC MALDI spotting metoden blev dannelsen af peptider fra kasein med cathepsin D yderligere undersøgt. Efter 30 timers inkubering var der, monitoreret ved 280 nm, dannet 5 dominerende peptider, hvoraf de to blev identificeret ved MALDI-TOF: Et fragment fra N-terminalen af α_{S1} -kasein (Arg1-Gln9), der ikke tidligere er blevet identificeret dannet af cathepsin D, samt et fragment fra den C-terminale del af β -kasein (Tyr192-Phe205).

I forbindelse med projektet er der endvidere gennemført en række forsøg hvor man har beskrevet sammenhængen mellem oxidation og proteolyse. Resultaterne af dette viser at der ved moderat oxidation forekommer en forøget proteolyse i mælk medens der ved intensiv oxidation så en mindsket proteolyse i forhold til kontrol mælken. For at belyse årsagen til den øgede proteolyse blev der gennemført en række modelstudier med plasmin og proteolysen af kaseiner blev analyseret ved at måle antallet af N-terminaler i systemet.

Her viste forsøg at såfremt der var høje koncentrationer af aldehyder til stede i systemet øgedes proteolysegraden, mens at aktiviteten af plasmin under de nærværende forhold ikke påvirkedes. Det blev foreslået, at den øgede proteolyse skyldtes dannelse af Schiff'ske baser.

Effekt af celletal på peptider dannet i rå mælk

Peptiddannelse i skummetmælk ved forskellige niveauer af celletal blev undersøgt i et studie ved anvendelse af kapillar HPLC kombineret med MALDI-TOF MS (LC MALDI spotting). Formålet var, gennem karakterisering af peptider til stede i mælk, at identificere spaltningsteder, og derved at kunne pege på, hvilke kvalitetsforringende enzymer, der var ansvarlige for proteolysen. Peptidfraktionerne blev prepareret fra mælk med celletal på hhv. 50.000, 500.000 og 16.000.000 celler/ml og separeret på kapillar HPLC, og de separerede peptider direkte spottet ud på MALDI-target plader til MS identifikation. Prøverne repræsenterer hhv. mælk med god kvalitet (klasse 1E), mælk med moderat forhøjet celletal, der bliver leveret til mejeriet (klasse 2), samt mastitis mælk, der ikke bliver leveret. HPLC analysen viste, at der var en stigning i mængden af peptid-materiale allerede fra 50.000 til 500.000 celler/ml, selv om niveauet, som forventet, var højst i prøven med 16.000.000 celler/ml.

De identificerede peptider stammede fra både α_{S1} -, α_{S2} - β -kasein. Ved at undersøge, hvor peptiderne stammede fra, kunne enzymerne plasmin, cathepsin B, D, G og elastase foreslåes som ansvarlige proteaser. Der var desuden også spaltningsteder, der ikke har været rapporteret tidligere i litteraturen. Disse kunne skyldes aktivitet fra endnu ikke-identificerede proteaser. Forsøget viste, at ikke kun plasmin, men også enzymer, der kan stamme direkte fra de somatiske celler, bidrager til proteolysen i mælk – allerede i mejerimælk ved moderat forhøjet celletal.

Sensorik og sensometri af mælk med forskelligt indhold af bovine mælke-proteaser

Da det indledende sensorikforsøg (under punkt **III.**) ikke viste målbare sensoriske forskelle på mælk med forskelligt niveau af celletal blev det i stedet besluttet, i forståelse med MFF, at ændre denne indsats til i stedet at omfatte effekt på mælkens sensoriske

egenskaber ved tilsætning af naturlige, bovine proteaser til mælk, i niveauer, der er realistiske.

Der blev derfor i oktober 2005 gennemført et sådant forsøg i samarbejde med sensorikgruppen på KVL, hvor den sensoriske effekt (smag) af tilsat plasmin til skummetmælk blev undersøgt. Effekten af plasmin blev sammenlignet med effekten af trypsin, der er et tilgængeligt, naturligt enzym, der ligner plasmin i specificitet, men som dog kløver hyppigere. Seks forskellige sensoriske deskriptorer blev anvendt (vammel/sød, fed, plastik, pap, metallisk og bitter) til smagsprofilering via et panel bestående af 10 eksterne dommere. Prøverne omfattede en kontrol uden tilsat enzym, samt prøver tilsat to forskellige niveauer af både plasmin og trypsin (hhv. 5 og 10 mg/l skummetmælk).

Plasminet blev tilsat som frisk aktiveret plasminogen. Mængden af aktiverbart plasmin i mælk er normalt på 1-2 mg/l, dvs. den tilsatte mængde er 5-10 gange højere end det niveau, men i en størrelsesorden, som kan findes i typer af mælk med højt celletal.

Eksplorativ dataanalyse (PCA) viste, at den største effekt opnåedes ved tilsætning af trypsin i høj koncentration (10 mg/l), hvorimod plasmin i den høje koncentration tilsat (10 mg/l) lignede effekten af trypsin tilsat i lav koncentration (5 mg/l). Trypsin tilsat i høj koncentration bevirkede en smag af skummetmælken i retning af deskriptorerne bitter, pap og metallisk smag, modsat smagen af mælk med tilsat plasmin i høj koncentration, der lå mere i retningen mod deskriptorerne vammel/sød og fed.

Regressionanalyse (PLS) viste, at metallisk, bitter og pap-smag alle var signifikant positivt korrelerede til højt niveau af trypsin, dvs. var karakteristiske for denne prøve, mens vammel/sød og fed var negativt korrelerede hertil.

For plasmin prøverne var der en tendens til en enzymatisk effekt på smagsoplevelsen i retning af fed/cremet, hvilket kan hænge sammen med teksturen. Det er dog ikke afklaret. Metal og bitter smag var negativt korrelerede til plasmin prøverne, P1 og P2.

Alt i alt må det konkluderes, at effekten af plasmin på smagen var mindre end effekten af trypsin. Det må tilskrives den større specificitet af plasmin sammenlignet med trypsin, og dermed færre kløvninger i mælkeproteinerne. Trypsin tilsat i den højeste af koncentrationerne medførte en smag i retning af pap, bitter og metal. Plasmin tilsat i den højeste af koncentrationerne havde en tendens til at give en smag i retning af fed/cremet.

KONKLUSION

Allerede ved moderat forhøjet celletal findes forhøjet niveau af en række kvalitetsforringende enzymer og markører herfor, både proteolytiske og oxidative, og at nogle af disse primært er associeret med cellefraktionen (cathepsin B), mens andre findes primært i skummetmælken (plasmin) eller begge steder (cathepsin D/procathepsin D).

Mælkens indhold af cathepsiner varierer mellem tidlig sekret, kolostrum og mælk. Det tyder på, at der er en fysiologisk regulerende funktion af disse enzymer i mælkekirtlen. Desuden har studierne vist, at der stadig i mælk findes en række proteolytiske enzymer, der ikke er identificeret endnu. At mælkens cathepsin D aktivitet stiger med celletal skyldes et øget indhold af dens pro-enzym, og ikke en øget aktivering af det pro-enzym, der findes – i modsætning til plasmin-systemet.

Ved klinisk mastitis kan forekomme omfattende nedbrydning af kaseinet, hvor helt op til mere end 50 % kan være nedbrudt. Desuden kan kaseinet og mælkekvaliteten fra ikke-inficerede nabo-kirtler være påvirket i negativ retning. De ansvarlige enzymer omfatter både plasmin, og de celle-associerede proteaser cathepsin B og D. I mælken fra de inficerede kirtler synes det især at være de celle-associerede proteaser, der er ansvarlige for proteolyse, mens det i de ikke inficerede nabo-kirtler sandsynligvis er plasmin, der er ansvarlig.

Infusionsforsøg med LPS resulterede i kliniske tegn på mastitis, og medførte øget proteolyse i mælk fra infunderede kirtler. Der var en let forøget proteolyse i mælk fra ikke-infunderede nabo-kirtler, hvilket bekræfter, at der kan ske ”spredning af dårlig

mælkekvalitet” fra infunderede kirtler til nabo-kirtler, på trods af, at disse ikke viste kliniske tegn. Kølelagring viste, at der i mælk med celletal på 1.000.000 sker proteolyse af mælkeproteinet ved opbevaring i 3 dage. Dette kan have effekt på produkter, herunder osteudbytte, men der var ikke sensoriske forskelle på den lagrede prøve med højt celletal og en kontrol prøve.

Modelforsøg har vist, at plasmin, i modsætning hvad tidligere er rapporteret i litteraturen, godt kan nedbryde κ -kasein. Desuden var ikke kun plasmin, men også cathepsin D i stand til at medføre omfattende kasein-nedbrydning i en størrelsesorden på ca. 50 % af plasmins målt i antallet af frie amino-terminaler. Der var dog også indikationer på synergieffekter enzymerne imellem, hvilket kan medvirke til proteinnedbrydningen ved akut og sub-klinisk mastitis, hvor begge enzymerne er til stede. Master-kort over fragmentdannelsen ved nedbrydning af kaseiner med plasmin og cathepsin D kan anvendes som referencer i fremtidige studier af proteolyseforløb i mælk eller ost forårsaget af naturlige proteaser.

Det forhøjede niveau af proteolytiske enzymer med celletallet betyder, at peptidindholdet i rå mælk allerede i mejerimælk med moderat forhøjet celletal (500.000 celler/ml) er højere end i høj-kvalitetsmælk. Peptiderne stammede fra kasein, og var resultat af den forhøjede proteolyse. Ikke kun plasmin, men også enzymer, der kan stamme direkte fra de somatiske celler, bidrog til proteolysen, som f.eks. cathepsiner og elastase.

Sensorisk analyse af skummetmælk med tilsatte proteaser til skummetmælk viste, at effekten af plasmin på smagen var mindre end effekten af trypsin. Trypsin tilsat i høj koncentration medførte en smag i retning af pap, bitter og metal, mens plasmin tilsat i høj koncentration havde en tendens til at give en smag i retning af fed/cremet.

PROJEKTETS BETYDNING FOR FREMTIDIG FORSKNING OG ANVENDELSE AF VIDEN I INDUSTRIEN

Projektet har vist, at det kan være forbundet med problemer at anvende høj-celletalsmælk til produkter, der er afhængige af en lang holdbarhed.

Allerede ved moderat forhøjet celletal kan der påvises øget proteolyse i mælk, hvilket betyder, at afregningssystemet i forhold til celletal ikke kun er begrundet i etiske aspekter.

Procesteknologiske tiltag, som f.eks. filtrering eller centrifugeringsteknikker, kan anvendes til at fjerne cellerne fra mælk, men hvis man vil undgå de skadelige effekter af cellernes enzymbatteri skal de fjernes inden de lyserer og frigiver deres indhold til mælken.

Pga. af ”spredning af dårlig mælke kvalitet” fra inficerede til raske kirtler kan det ikke anbefales af anvende kirtel-sortering af mælk.

Metoden til identifikation af peptider i mælk, der er udviklet i dette projekt, er en lovende teknik, der ville kunne benyttes i fremtidige studier af proteolyseprocesser, ikke kun i rå mælk, men i mejeriprocesser, hvor proteolyse spiller en vigtig rolle, det være sig positiv eller negativ, som f.eks. i ostemodning eller ved gelering i UHT mælk.

Der er behov for yderligere forskning i forhold til at afklare betydningen af kronisk inficerede dyr for kvaliteten af den mælk, der malkes fra kirtler med kronisk højt celletal – samt at få afklaret hvad opblanding og lagring af denne mælke type betyder for mælkekvaliteten af den blandede mælk.

Projektet har vist, at der mangler viden, både nationalt og internationalt, om betydningen af forskellige typer af mastitis bakterier for mælkens kvalitet, samt hvordan dette manifesterer sig mælkekvaliteten i eventuelle efterfølgende kroniske tilstande.

Det kræver desuden yderligere studier at afdække hvad, der er værst for mælkekvaliteten: at der mælkes mælk med i tanken fra dyr med kronisk højt celletal (sub-klinisk mastitis) eller at der malkes mælk med fra køer på et tidligt endnu ikke detekteret stadie af klinisk mastitis.

PUBLIKATIONER OG PRÆSENTATIONER

Nielsen, J. H., Røntved, C., Ingvarstsen, K. L. & Larsen, L. B. (2002). Mælkekvalitet – betydning af somatiske celler i mælk. *Mælkeritidende* **18**, 425-428.

Larsen LB, Handberg SG, Bjerring M, Rasmussen MD & Nielsen JH (2003). Proteases and protein degradation in milk from cows infected with *Streptococcus uberis*. *NorFA møde "Milk proteins, quality and health aspects, 13.-16. marts, Wadahl, Norge*.

Larsen LB, Handberg SG, Bjerring M, Rasmussen MD & Nielsen JH (2004). Proteases and protein degradation in milk from cows infected with *Str. uberis* *International Dairy Journal*, **14**, 899-907.

Larsen, L. B., Rasmussen, M. D., Bjerring, M. & Nielsen, J. H. (2004). Proteolysis of milk protein from uninfected glands and glands infected with *Streptococcus uberis*. *Symposium on Automatic Milking, 24.-26. March 2004, Lelystad, The Netherlands*.

Larsen, L. B., Steffensen, C. L., Rasmussen, M. D. & Nielsen, J. H. (2004). Effects of somatic cells in milk quality. *LMC/Food life style congress, 17.-18. March 2004, DTU, Copenhagen, Danmark*.

Steffensen C. L., Røntved C., Bjerring M., Lønne C. I., Nielsen J. H. (2006) Effect of somatic cells on the oxidative stability of milk (Submitted)

Larsen, L. B., Kelly, A. L., McSweeney, P. L. H. & Nielsen, J. H. (2005). The cathepsins in milk. *1. International IDF conference on indigenous enzymes in milk, 19.-22. April 2005, Cork, Ireland*, p. 14.

Celltallets betydning for mælkens kvalitet (2005). Foredragsmøde i Danmarks Mejeritekniske Selskab "Mælkeråvaren og dens betydning for produktkvaliteten", 3. November 2005, Sabro, Denmark.

Larsen, L. B., McSweeney, P. L. H., Hayes, M. G., Andersen, J. B., Ingvarsen, K. L., and Kelly, A. L (2006). Variation in activity and heterogeneity of bovine milk proteases with stage of lactation and somatic cell count. *International Dairy Journal*, **8**, 1-8.

Hvad er proteinspaltning? (2006). Foredrag ved Mejeribrugets Forårsseminar ”Modning og holdbarhed – hvad styrer disse processer i mejeriprodukter?”, 13.-14. marts, Dalum Landbrugsskole, Odense, Denmark.

Wedholm, A., Møller, H. S., Lindmark-Månsson, H., Rasmussen, M. D., André, A. & Larsen, L. B. (2006). Identification of peptides in milk as a result of proteolysis at different levels of somatic cell counts using LC MALDI spotting and MS/MS detection. *International Dairy Journal*, submitted.

