



Vad säger akutfasproteinerna haptoglobin och serum amyloid A om tankmjölkens sammansättning och processegenskaper? Slutrapportering av projektet SLF V0630015

Åse Sternesjö, professor, Inst. för livsmedelsvetenskap, SLU, 750 07 Uppsala

Bakgrund

Mastit utgör den vanligast förekommande och ekonomiskt mest förlustbringande sjukdomen inom mjölkproduktionen. Utöver det lidande som sjukdomen innebär för kon, resulterar mastit i reducerad mjölkproduktion. Mjölk från mastitkor har dessutom en avvikande sammansättning som i sin tur påverkar mjölkens kvalitet och processbarhet på ett flertal sätt (Auldust & Hubble, 1998; Le Roux et al., 2003). Störst betydelse för mjölkens processegenskaper har förändringarna i mjölkens proteinsammansättning, såsom reducerad kaseinhalt, ökad mängd vassleproteiner samt ökad proteolytisk aktivitet resulterande i minskat ostutbyte och sämre produktkvalitet. Mjölkens innehåll av somatiska celler (SCC) har länge varit det vanligaste måttet på juverhälsa och tankmjölkens celltal är en viktig betalningsgrundande kvalitetsparameter (EC, 2004). Det saknas dock entydiga vetenskapliga rön för vid vilken nivå tankmjölkens celltal har en negativ effekt på mjölkens kvalitet och omfattande forskning har under de senaste decennierna genomförts med målsättning att finna nya markörer för inflammatoriska processer i juvret (Pyörälä, 2003). Forskningen har även motiverats utifrån utvecklingen av automatiska mjölkningssystem eftersom dessa inte möjliggör manuell undersökning av juver och mjölk (Mottram, 1997).

Under senare år har uppmärksamhet riktats mot de s.k. akutfasproteinerna (acute phase proteins; APP) och deras roll i samband med inflammatoriska processer. Akutfasproteinerna utgörs av en grupp serumproteiner som produceras och frisätts huvudsakligen från levern, och vars koncentrationer förändras dramatiskt vid stimuli, t.ex. trauma, infektion eller sjukdom. Hos nötkreatur anses haptoglobin (Hp) och serum amyloid A (SAA) utgöra de känsligaste akutfasproteinerna och serum-koncentrationerna av dessa ökar kraftigt vid olika typer av akut och kronisk sjukdom (Alsemgeest et al., 1994; Horadagoda et al., 1999; Murata et al., 2004). Förhöjda nivåer av Hp och SAA i serum är en ospecifik markör för skada eller sjukdom som kan initieras av många stimuli. I samband med mastit ökar permeabiliteten mellan blod och mjölk, varvid akutfasproteinerna även påträffas i mjölk, troligen som ett resultat av läckage från blodet (Eckersall et al., 2001, Nielsen et al., 2004). Hp och SAA i mjölken blir således en specifik markör för mastit, eftersom mjölk från friska juver normalt inte innehåller detekterbara halter av akutfasproteinerna (Pyörälä, 2003; Grönlund et al., 2003; Petersen et al., 2004, Grönlund et al., 2005).

Hittills har undersökningar av Hp och SAA i mjölk i regel utförts utifrån perspektivet mastitdiagnostik, och oftast med experimentella mastiter och med ett begränsat antal friska kor som kontroller. Det saknades fram till nyligen undersökningar som belyser förekomsten av Hp och SAA i mjölk från "kliniskt friska kor", samt undersökningar beträffande samband mellan förekomsten av Hp och SAA i mjölk och mjölkens sammansättning och

egenskaper. För att belysa dessa aspekter genomfördes 2004- 2006 ett av SLF finansierat projekt med titeln "Akutfasproteiner som markörer för förändringar i mjölkens sammansättning och egenskaper vid juverinflammation" (Dnr 286/02, projektnummer 230061). I projektet utvecklades en optisk biosensormetod för analys av Hp (Åkerstedt et al., 2006), som senare användes för att studera förekomsten av Hp i olika typer av mjölkprover. I en av delstudierna undersöktes förekomsten av Hp och SAA i juverdels-, samlings- och tankmjölksprover (Åkerstedt et al., 2007). Syftet med studien var att undersöka (1) vilka koncentrationer av Hp och SAA som förekommer i respektive typ av mjölkprov, samt (2) om det finns samband mellan SCC och förekomsten av APP i mjölk. Resultaten påvisade signifikant högre SCC i juverdels-, samlings- och tankmjölkprover som innehöll SAA, emedan motsvarande samband mellan Hp och SCC endast observerades för juverdels- och samlingsprover. I en uppföljande studie med samlingsmjölk från ett större antal djur (n=89) studerades samband mellan förekomsten av akutfasproteinerna i mjölk och mjölkens sammansättning. Mjölkprover som innehöll Hp innehöll lägre halter totalprotein och kasein; prover som innehöll SAA innehöll lägre laktoshalt och hade ett lägre kaseintal, dvs kvoten mellan kasein och totalprotein var lägre. Mjölkprover som innehöll akutfasproteiner uppvisade dessutom högre SCC (Åkerstedt et al., 2008a). Samma material uppvisade inga samband mellan SCC och totalprotein eller kasein, endast mellan SCC och laktos. Sammanfattningsvis tycks alltså förekomsten av akutfasproteiner i mjölken indikera förändringar i mjölkens sammansättning, spec. dess proteinsammansättning.

Som en uppföljning till vår tidigare studie på samlingsmjölk har vi i det nu avslutade projektet studerat förekomsten av Hp och SAA i tankmjölk för att undersöka om APP kan ge vägledning beträffande tankmjölkens sammansättning och koaguleringsegenskaper.

Material och metoder

Tankmjölksprover

Undersökningen genomfördes i samarbete med Milko (Grådö mejeri, Hedemora) och totalt ingick 91 tankmjölksprover. Dessa togs ut som ett extra prov (ca 200 ml) av tankbilschaufförerna vid ordinarie hämtning.

Analys

Vissa analyser påbörjades samma dag som de hämtades på mejeriet och samtliga analyser, i de fall dessa inte kunde utföras på fryst mjölk, avslutades i regel inom 1 dygn från det att de hämtades på mejeriet (fett, protein, laktos, kasein och vassleprotein, celltal, koagulerings-egenskaper). En portion av mjölkprovet frystes in (-70°C) för senare analys av akutfasproteiner (Hp, SAA) och proteolys.

Det totala antalet celler i tankmjölksproverna analyserades med rutinmetodik (Fossomatic 5000, Foss Electric) liksom innehållet av protein, fett och laktos (Fourier Transform Instrument, FT120, Foss Electric) vid Kungsängens forskningscentrum. Tankmjölkens innehåll av kasein bestämdes enligt Arla Foods metod (Arla Foods, 2000). I analysen löpefalls kaseinerna och proteinmängden i den resulterande vasslefraktionen bestäms med IR. Vassleproteinets subtraheras därefter från mjölkens totala proteininnehåll och resterande protein utgörs av kasein. Kaseintalet uttrycks som kaseinets andel av det totala proteinet.

Tankmjölkens innehåll av peptider och små proteinfragment är ett mått på nedbrytningen av mjölkens proteiner. Proteolysen bestämdes genom analys av mängden fria aminoterminaler (Wiking et al., 2002). I analysen denatureras mjölkens intakta proteiner genom tillsats av triklorättiksyra och efter ett centrifugeringssteg för att avlägsna proteinerna, används supernatanten för vidare analys. Fluorescamin tillsätts och vid reaktion med peptidernas fria aminoterminaler bildas ett fluorescerande ämne som bestäms. Graden av proteolys kvantifierades med hjälp av en standardkurva med isoleucin som standard. Tankmjölkens koagulerings-egenskaper studerades med en reologisk metod (Allmere et al., 1999). Löpe tillsätts mjölkprovet som placeras i en Bohlin-reometer. Instrumentet registrerar därefter den förändring i motstånd som uppstår när mjölken koagulerar. Förloppet studeras under 30 minuter, varvid gelstyrkan (Pa)

vid 1500 sek efter tillsats av löpe, samt tiden (s) för att uppnå motståndet 5 Pa användes i sammanställningen.

Haptoglobin analyserades med den i det tidigare projektet utvecklade biosensormetoden (Åkerstedt et al., 2006) och serum amyloid A med en kommersiell ELISA (Tridelta, Ltd., Irland). Detektionsgränsen var i bägge analyserna 0.3 mg L⁻¹.

Samband mellan akutfasproteinerna och de olika kvalitetsparametrarna analyserades med parametriskt t-test (SAS version 9.1, SAS Institute Inc.). Observationerna delades därvid in i två grupper; förekomst eller inte förekomst av Hp (Hp+ och Hp-) respektive SAA (SAA+ och SAA-) baserat på metodernas detektionsgränser för respektive protein. Skillnader mellan prover utan respektive med respektive akutfasprotein ansågs signifikanta om p<0.05.

Resultat

Sammansättning och egenskaper hos de 91 tankmjölksproverna framgår av tabell 1.

Tabell 1. *Innehållet av haptoglobin (Hp) och serum amyloid A (SAA), samt sammansättning och egenskaper hos i studien ingående tankmjölksprover (n=91)*

Parameter	enhet	medelvärde (SD)	Minimum	Maximum
Hp	mg L ⁻¹	Ej relevant ^a	<0.3	4.700
SAA	mg L ⁻¹	Ej relevant ^a	<0.3	8.79
Fett	%	4.484 (0.427)	3.54	6.25
Totalprotein	%	3.537 (0.181)	3.12	4.21
Laktos	%	4.61 (0.107)	4.30	4.91
Celltal	cells mL ⁻¹	195000 (169600)	33000	1365000
Kaseintal		0.730 (0.0068)	0.7050	0.754
Kasein	%	2.580 (0.135)	2.200	3.069
Vassleprotein	%	0.909 (0.051)	0.822	1.092
Proteolys	Leu ekv ^b	1.112 (0.111)	0.886	1.705
Koaguleringstid	Tid (s) för att uppnå 5 Pa	120 (42)	32	278
Gelstyrka	Pa vid 1500 sek	350 (118)	162	798

^aEftersom en stor andel av mjölkproverna inte innehöll detekterbara halter av Hp respektive SAA, ansågs det inte relevant att ange ett medelvärde för respektive akutfasprotein. ^beq Leu = ekvivalent mM leucine

Tankmjölk med detekterbara halter av Hp innehöll signifikant lägre halt kasein, hade ett lägre kaseintal, uppvisade högre grad av proteolys samt högre celltal (Tabell 2). Även laktosinnehållet i tankmjölk var lägre ibland dessa mjölkprover ($p < 0.05$).

Tabell 2. Samband mellan förekomsten av haptoglobin (Hp) och olika kvalitetsparametrar i tankmjölk ($n=91$)

	Hp- ($n=72$)	S.E.	Hp+ ($n=19$)	S.E.	Differens	p-värde
Fett (%)	4.491	0.055	4.353	0.049	0.036	0.625
Totalprotein (%)	3.549	0.023	3.493	0.025	0.056	0.104
Laktos (%)	4.618	0.014	4.549	0.014	0.039	0.0498
LogSCC (mL^{-1})	5.104	0.027	5.528	0.049	-0.424	<0.0001
Kaseintal	0.731	0.0008	0.725	0.001	0.0057	0.0008
Kasein (%)	2.593	0.017	2.532	0.018	0.0609	0.0164
Vassleprotein (%)	0.908	0.0064	0.913	0.0079	-0.005	0.650
Proteolysis (Leu ekv)	1.0995	0.0135	1.1588	0.0194	-0.059	0.038
Koagtid (5Pa)	122.54	4.963	110.16	9.8623	12.384	0.259
Log gelstyrka	2.517	0.0147	2.547	0.0385	-0.030	0.399

Tankmjölkprover som innehöll detekterbara halter av SAA innehöll signifikant lägre halter av laktos, högre halter vassleprotein, samt hade ett lägre kaseintal och ett högre celltal (Tabell 3).

Tabell 3. Samband mellan förekomsten av serum amyloid A (SAA) och olika kvalitetsparametrar för tankmjölkprover ($n=91$)

	SAA- ($n=23$)	S.E.	SAA+ ($n=68$)	S.E.	Difference	p-value
Fett (%)	4.504	0.102	4.477	0.049	0.027	0.800
Totalprotein (%)	3.488	0.042	3.553	0.021	-0.065	0.137
Laktos (%)	4.692	0.018	4.583	0.012	0.109	<0.0001
LogSCC (mL^{-1})	4.989	0.063	5.261	0.029	-0.272	<0.0001
Kaseintal	0.734	0.0014	0.728	0.0008	0.006	0.0009
Kasein (%)	2.559	0.032	2.588	0.016	-0.029	0.380
Vassleprotein (%)	0.883	0.011	0.918	0.006	-0.035	0.0044
Proteolys (Leu ekv)	1.082	0.0226	1.122	0.0135	-0.040	0.137
Koagtid (5Pa)	112.91	9.276	122.34	5.055	-9.43	0.359
Log gelstyrka	2.533	0.030	2.521	0.016	0.012	0.717

Diskussion

Detta är den första studien som genomförts med syfte att studera samband mellan förekomsten av APP och sammansättning och kvalitetsegenskaper hos tankmjölk. Resultaten visar att mjölk som innehåller Hp innehåller mindre kasein, mindre laktos, samt har ett lägre kaseintal, mer proteolys och ett högre celltal. På samma sätt visade studien att tankmjölk som innehåller SAA innehåller mer vassleprotein, mindre laktos, samt har ett lägre kaseintal och högre celltal. Båda akutfasproteinerna visade således samband med mjölkens proteinsammansättning på så sätt att kaseinets andel av totalproteinet (kaseintalet) var lägre när tankmjölken innehöll Hp eller SAA. Vid närvaro av Hp tycks det lägre kaseintalet kunna förklaras av ett lägre kaseininnehåll, ev. beroende på högre proteolytisk aktivitet, eftersom mjölk med Hp visade samband med dessa två parametrar. Vid närvaro av SAA tycks det istället som om det är sambandet med ett högre innehåll av vassleprotein som förklarar det lägre kaseintalet. I denna studie var sambandet mellan Hp och SCC i tankmjölk starkt, i motsats till resultatet i den tidigare studien (Åkerstedt et al., 2007). Skillnaden förklaras troligen av att materialet i den tidigare studien innehöll en högre andel tankmjölksprover med förhöjda celltal (median 258,000 celler per ml) i jämförelse med denna undersökning (median 146,000 celler). Resultaten överensstämmer med slutsatserna i vår senaste studie rörande samband mellan akutfasproteiner och samlingsmjölkens sammansättning (Åkerstedt et al., 2008a). Förekomst av Hp eller SAA i mjölk tycks indikera negativa förändringar i mjölkens proteinsammansättning, såsom högre andel vassleprotein och lägre andel kasein, och dessa samband är signifikanta även på tankmjölksnivå. I studien fann vi däremot inga samband mellan APP och mjölkens koaguleringssegenskaper.

Publikationer och övrig resultatförmedling till näringen

Åkerstedt, M., M. Thors, K. Persson Waller and Å. Sternesjö. 2008b. Haptoglobin and serum amyloid A as biomarkers of bulk tank milk quality. Manuskript under sammanställning för publicering i *International Dairy Journal*.

Framtida forskning relaterad till mjölkråvarans kvalitet. Seminarium med deltagare från universitet, forskningsfinansierare och mejerinäringen. SLU, planeras för hösten 2008.

Presentation vid Veterinärkongressen, 2008.

Presentation vid International Conference on Mastitis Control; from science to practice. The Hague, Nederländerna, 30 september –2 oktober, 2008.

Referenser

- Allmere, T., A. Andren, M. Lindersson and L. Björck. 1998. Studies on rheological properties of stirred milk gels made from milk with defined genetic variants of κ -casein and β -lactoglobulin. *Int Dairy J*, 8, s. 899-905.
- Alsemgeest, S.P., H.C. Kalsbeek, T. Wensing, J.P. Koeman, A.M. van Ederen and E. Gruys (1994). Concentration of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) as parameters of inflammatory diseases in cattle. *Veterinary Quarterly* 16, 21-23.
- Arla Foods Analysis Regulation (2000). Chapter 30.6, edition 004, 20001210.
- Auld, M.J. and I.B. Hubble (1998). Effects on mastitis on raw milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology* 53, 28-36.
- EC, 2004. Regulation (EC) no 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union* L226, 22-82.
- Eckersall, P.D., F. J. Young, C. McComb, C. J. Hogarth, S. Safi, A. Weber, T. McDonald, A. M. Nolan and J. L. Fitzpatrick (2001). Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows

- with clinical mastitis. *Veterinary Record* 148, 35-41.
- Grönlund U, C. Hultén, P.D. Eckersall, C. Hogarth and K. Persson Waller (2003). Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Research* 70, 379-386.
- Grönlund, U., C. Hallén Sandgren and K. Persson Waller (2005). Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Veterinary Research* 36, 191-198.
- Horadagoda, N.U., K.M.G. Know, H.A. Gibbs, S.W.J. Reid, A. Horadagoda, S.E.R. Edwards and P.D. Eckersall (1999). Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Veterinary Record* 144, 437-441.
- Le Roux, Y., F. Laurent and F. Moussaoui (2003). Polymorphonuclear protolytic activity and milk composition change. *Veterinary Research* 34, 629-645.
- Mottram, T. (1997). Automatic monitoring of the health and metabolic status of dairy cows. *Livestock Production Science* 48, 209-217.
- Murata, H., N. Shimada and M. Yoshioka (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis; an overview. *Veterinary Journal* 168, 28-40.
- Nielsen, B.H., S. Jacobsen, P.H. Andersen, T.A. Niewold, P.M.H. Heegaard (2004). Acute phase protein concentration in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. *The Veterinary Record*, March 20, 361-365.
- Petersen, H.H., J.P. Nielsen, P.K.H. Heegaard (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35, 163-187.
- Pyörälä, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research* 34, 565-578.
- Wiking, L., M.B. Frost, L.B. Larsen & K.B. Qvist. 2002. Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. *Milchwissenschaft* 57, 190-194.
- Åkerstedt, M., K. Persson Waller and Å. Sternesjö. 2006. Biosensor assay for determination of haptoglobin in bovine milk. *Journal of Dairy Research* 73, 299-305.
- Åkerstedt, M., K. Persson Waller and Å. Sternesjö. 2007. Haptoglobin and serum amyloid A in relation to the somatic cell count in quarter, cow composite and bulk tank milk samples. *Journal of Dairy Research* 74, 198-203.
- Åkerstedt, M., K. Persson Waller, L. Bach Larsen, L. Forsbäck and Å. Sternesjö. 2008a. Relationship between haptoglobin and serum amyloid A in milk and milk quality. Accepted for publication in *International Dairy Journal*.