

**שימוש בחלב של פרות שעברו תהליך התייבשות חלקי, כמקור לנוזל
דמוי קולוסטרום לשימוש כמזון בריאותי**

דוח סופי: שנה ג – יולי 2013

תכנית מחקר: 362-0253-12

מוגשת להנהלת ענף חלב

צוות היגוי: בריאות עטין

נסים סילניקוב*¹, גבריאל לייטנר²

¹ המכון לחקר בע"ח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

² המכון הווטרינרי ע"ש קימרון, בית דגן

תקציר

חלב הינו מוצר בסיסי לבני אדם בכל הגילים: תינוקות, ילדים, נוער ומבוגרים. בשנים האחרונות התפתח מחקר מקיף כדי לנצל את המגוון האדיר של חומרים אורגניים המופרשים לחלב לפיתוח מוצרים בעלי ערך בריאותי מוסף לבני אדם (מזון פונקציונאלי או מזון רפואי). דגש מחקרי מקיף הושם בשימוש מי הגבינה (המוצר המתקבל לאחר הפרדת השומן וקזאין מחלב). מחקר בסיסי שנעשה במעבדתנו בשנים האחרונות הצביע על כך, שחלק מפרות החלב לקראת סוף הלקטציה, המייצרות כמות מועטה של חלב, הרכב החלב משתנה בהשוואה לתקופת הלקטציה העיקרית. חלב זה אינו מתגבן ולכן חסר ערך לייצור גבינות. מצד שני, מי הגבינה של פרות אלו עשירים באופן מיוחד במרכיבים של מערכת החיסון, העשויים לתרום לבריאות בני אדם. במסגרת מחקר זה נבחנו פרות, עזים וכבשים בדגש על תקופת סוף הלקטציה לגבי הרכב החלב וכן נעשה ניסיון לבדוק האם לחלב זה יתרונות למניעת נזקי חמצון, האופייניים לבעיות רבות, כולל מחלות נפוצות של מערכת העיכול.

תוצאות המחקר תמכו בהנחת היסוד, שחלב המיוצר בסוף התחלובה עשיר ברכיבים של מערכת החיסון. ניסויים ברמה של תרבית תאים הראו, שחלב זה או מרכיבים מהחלב עשויים לשמש כמקור למזון רפואי. נראה לכן, שיש מקום להמשיך את המחקר במודלים של בע"ח, במיוחד תחת עקה חמצונית ולחפש אינדיקציות נוספות תוך שימוש בטכניקות של פרוטאומיקה כדי לבדוק שימושים נוספים לחלב פרות המיוצר בסוף התחלובה כמזון רפואי.

ABSTRACT**Characterization and use of milk from late-lactating dairy animals (colostrum-like milk) as a source for medicinal food****Nissim Silanikove¹ and Gabriel Leitner²**¹*Institute of Animal Science, Agr. Res. Org. (ARO), Bet Dagan*²*Mastitis Reference Laboratory, Kimaron Veterinary Institute, Bet Dagan*

Final Report to project 362-0253-12

Milk serves as a basic food for hundred millions of humans of all ages. In recent years extensive research has been carried out across the world, exploiting milk for producing valuable products that have positive effects on human health, with particular emphasize on whey. Recently it has been shown that milk of cows producing low amount of milk in late lactation does not coagulate. That milk was found to be rich in components of the immune system and antioxidants. Therefore it has a potential to serve as a source of medicinal food, or medicinal products. In the frame of the present study, milk from late lactating cows, sheep and goats was examined for the presence of components of the immune system. In addition, it was examined whether whey concentrate made from milk of late lactating cows can prevent oxidative stress induced on mammary and digestive tract epithelial cells. Oxidative stress is an etiological factor of many diseases of the gastrointestinal tract. The results obtained in these experiments confirmed the basic hypothesis; namely, the milk of late lactating cows is rich in components of the immune system. Research on cell culture level has been shown that whey concentrates prepared from the milk of late lactating cows can ameliorate and prevent oxidative stress almost completely. It is concluded: i. The result of this project justifies extension of the research on oxidative stress in animal models; and ii. Extending the range of analysis should be carried out by applying proteomic techniques for identifying other potential active components. Over all, it seems that milk of late lactating cows producing low amount of milk may serve as a suitable source for developing medicinal foods which potentially will lead to a novel industrial branch of milk products.

מבוא ותיאור הבעיה

חלב הינו מוצר בסיסי לבני אדם בכל הגילים: תינוקות, ילדים, נוער ומבוגרים. הרכב החלב משתנה בשלבים שונים של התחלובה, בהתאם לצורכי הוולד או הפרה. חלב הנוצר ביומיים הראשונים לאחר ההמלטה נקרא קולוסטרם. קולוסטרם הנו נוזל המכיל ריכוז גבוה (הרבה מעבר לזה של חלב רגיל או נוזלים ביולוגים אחרים) של אימונוגלובולינים (בעיקר מסוג G) וחומרים אחרים כגון לקטופריין, אלבומין, ויטמינים, מינרלים, חומצות גרעין, אנזימים (בעיקר ידוע על ריכוז גבוה של ליזוזימים ולקטופראוקסידאז) ופקטורי גדילה (בעיקר ידוע על ריכוז גבוה של TGF β 1 β 2). קולוסטרם חיוני לתמיכה במערכת החיסון של הוולד, לשמירת בריאותו ולמניעת מחלות. תכונות אלו של הקולוסטרם ידועות היטב וקולוסטרם משמש לייצור מזון רפואי לתועלת בריאות האדם. קולוסטרם כמזון רפואי משמש לעידוד מערכת החיסון, במיוחד לאלו שמערכת החיסון שלהם מוחלשת (לדוגמא חולי איידס) או נמצאת תחת עומס טבעי גבוה, כגון ספורטאים מקצועיים ואנשים המקדישים זמן רב לאימון גופני. קולוסטרם נחשב כתוסף תזונתי מעולה לכאלו המעוניינים בהרזיה, ומשייכים תכונה חיובית זאת לתכונתו לעודד שריפת שומן וכושרו לספק מרכיבים תזונתיים חיוניים. קולוסטרם מיוצר באופן מסחרי מחלב בקר במספר ארצות, כשהמדינה המובילה בתחום זה היא ניו-זילנד. המחיר האופייני של קולוסטרם לצרכן (כמשקה או קפסולות מיובשות) נע בין 200 ל-400 דולר אמריקאים לקילו ואריזה טיפוסית לצרכן שוקלת בין 100 ל-400 ג' חומר. מדובר לכן באחד מתוספי המזון היקרים ביותר הנמצאים בשוק, שיש להם ביקוש רב.

ממצאים קודמים של קבוצת מחקר זו הראו, שריכוז החומרים מעודדי מערכת החיסון ובעלי פעילות אנטי בקטריאלית כמו גם ריכוז המינרלים, עולה בנוזלים המופרשים ע"י פרות חלב בזמן היובש. הגדלת ריכוזם של מרכיבים אלו נועדה להגביר את יכולת בלוטות החלב להתמודד עם פלישה של חיידקים בזמן היובש (או להילחם בחיידק שנשאר מהלקטציה). ראוי לציין שזוהי תקופה רגישה ביותר לפרה עקב הלחץ התוך עטיני הנוצר מהייבוש הפתאומי ועקב העובדה שהבלוטה אינה מרוקנת בגלל הפסקת החליבה. גם אם ריכוז האימונוגלובולינים ושאר המרכיבים הפעילים אינו מגיע לזה שבקולוסטרם, הוא עולה במידה רבה על ריכוזו בחלב רגיל. יתר על כן, ממצאים ראשוניים נוספים מצביעים על כך שבפרות בהן יש ירידה טבעית של ייצור החלב אל מתחת ל-20 ליטר ביום, יש שינוי בהרכב החלב. חלבן של פרות אלו מכיל ריכוזים גבוהים של מרכיבים בעלי פעילות ביולוגית. לכן נראה שפרות אלו עברו תהליך ייבוש חלקי בעודן בתחלובה. בטבע, זו כנראה צורת ההתייבשות הטבעית ברוב היונקים.

בהתאם לממצאים הראשונים, יתכן ויהיה כלכלי לחלוב פרות בהריון לקראת תקופת היובש המתוכננת (210 ימים בהריון) עם תנובה נמוכה של 10-15 ליטר ליום וכן פרות שלא נכנסו להריון ומייצרות כמויות חלב הנמוכות מ-20 ליטר ליום, ולהפרידו לייצור מוצרי בריאות. גם אם יהיה צורך לייבש חלב של פרות כאלו פי 10 עד 20, כדי להגיע לריכוזים דומים לאלו שבקולוסטרם, עדיין התפוקה של חלב

פרות אלו יהיה כלכלי וזאת לאור מחירו הגבוה והדרישה הרבה למוצר מזון רפואי. מטרת המחקר לבחון בחינה יסודית את הרכב החלב בפרות בסוף התחלובה ו/או פרות לא הרות עם תנובת חלב נמוכה מ-20 ליטר ליום לשם ניתוח כלכלי אפשרי בעתיד.

תיאור מפורט של חומרים, השיטות ותוצאותיהם מתוארים בשלושה המאמרים המצורפים כחלק מהדוח.

1. Leitner, G., Merin, U. and Silanikove, N. (2011). Effects of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk quality: Comparison among cows, goats and sheep. *Int. Dairy J.*, 21:279-285.
2. Leitner, G., Merin, U., Krifucks, O., Blum, S., Rivas, A.L. and Silanikove, N. (2012). Effects of intra-mammary bacterial infection with coagulase negative staphylococci and stage of lactation on shedding of epithelial cells and infiltration of leukocytes into milk: Comparison among cows, goats and sheep. *Vet. Immunol. Immunop.*, 147:202-210.
3. Silanikove, N., Merin, U., Shapiro, F. and Leitner, G. (2013). Early mammary metabolic and immune responses during natural-like and forceful drying-off in high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 96:6400-6411

חומרים ושיטות:

בעלי חיים:

החלק הראשון של המחקר כלל פרות (149 בלוטות ללא נגיעות ו-31 בלוטות נגיעות בחיידקים מקבוצת קואגולזה שלילית באמצע התחלובה וכן 172 בלוטות ללא נגיעות, בסוף התחלובה עם כמות חלב יומית נמוכה), עיזים (37 בלוטות ללא נגיעות ו-43 בלוטות נגיעות בחיידקים מקבוצת קואגולזה שלילית, באמצע התחלובה, וכן 64 בלוטות ללא נגיעות בסוף התחלובה עם כמות חלב יומית נמוכה) וכבשים (21 בלוטות ללא נגיעות ו-29 בלוטות נגיעות בחיידקים מקבוצת קואגולזה שלילית, באמצע התחלובה, וכן 11 בלוטות ללא נגיעות בסוף התחלובה עם כמות חלב יומית נמוכה). בכל מין הושווה חלב של בעלי חיים באמצע התחלובה מרבעים ללא נגיעות בקטריאלית (בריא) ורבעים נגיעים בחיידקים מקבוצת סטפילוקוקוס הקואגולזה שלילית וכן רבעים בסוף התחלובה ללא נגיעות תוך עטינית (בריא) עם יצור חלב נמוך. בהמשך, המחקר הורחב ב-20 פרות ללא נגיעות תוך עטינית, באמצע או סוף התחלובה, למספר מדדים נוספים בהרכב. בשלב נוסף של המחקר נבחנה השפעת מקור החלב על פעילות עקה חמצונית במערכת in-vitro.

בדיקות:

בדיקות בקטריולוגיות בוצעו בהתאם להנחיות IDF (פירוט במאמר 2).
 תאים סומאטיים והרכב חלב נקבע במעבדה המרכזית, קיסריה. התפלגות התאים נקבעה ע"י שימוש
 בנוגדנים חד שבטיים וקריאה במכשיר FACS (פירוט במאמרים 1,2).
 תכונות התגבנות נקבעו במכשיר אופטיגרף (פירוט במאמר 1).
 אנליזות אנזימטיות וביוכימיות של החלב בוצעו בשיטות שונות (פירוט במאמר 3).
 ניתוח התוצאות בוצע במודלים שונים המפורטים בכל אחד משלושת המאמרים.

פעילות עקה חימצונית במערכת in-vitro.

חלב מ-3 פרות בסוף ו-3 פרות באמצע התחלובה שימש למחקר. פרות אלו נבחרו בהתאם לתוצאות החלק
 הראשון לעיל ואשר הרכבי החלב שלהן תאמו למוצעים. שומן וקזאין בחלב מ-2 המקורות הופרדו, ומי
 הגבינה שהתקבלו יובשו בליופיליזר. מי הגבינה המיובשים עורבבו היטב וכמות קטנה שלהם הומסה
 בתמיסה פיזיולוגית. ריכוז החלבון מ-2 סוגי החלב הובאה לכ-10 מ"ג/מ"ל. מי הגבינה שימשו בשני
 ניסויים.

1. כמות של 10 מיקרומיליטר הוספה לבארות בהם גודלו תאי רקמת חלב של עכברים מסוג HC
 11. תאים אלו במצב של קונפלואנסי (גידול מקסימאלי) עברו סטרס חמצוני באמצעות מי חמצן
 (כ-50 מיקרומולר) וליפופוליסקריד מחיידקי אשריכיה קולי (0.5 מ"ג למ"ל). המדדים של
 העקה החמצונית היו יצירת פראוקסידים במולקולות שומן ועירור פעולת קטלאז, אנזים הידוע
 כמפרק מי חמצן ומונע פירוק DNA גנומי שהופק מהתאים.
2. כמות של 10 מיקרומיליטר הוספה לבארות בהם גודלו תאי רקמת מעי גס של בני אדם מסוג
 CACO2. תאים אלו במצב קונפלואנסי (גידול מקסימאלי) יוצרים שכבה אפיתליאלית עם
 חיבורים הדוקים פעילים, המונעים מעבר חומרים בדיפוזיה בין התאים, כאשר הרקמה אינה
 פגועה. סוג זה של תאים משמש לעיתים תכופות כמודל לבדיקת פונקציונאליות אפיתל מערכת
 העיכול. התאים עברו סטרס חמצוני באמצעות מי חמצן (כ-1 מילימולר למשך 2 שעות). הוספה
 של הסטרס החמצוני בהשוואה לביקורת (ללא טיפול במי חמצן) ובשילוב של טיפול במי חמצן
 עם 2 מקורות החלב נבדקה ע"י מדידת הפרמטרים הבאים: חיוניות התאים (מבחן MTT, %
 מהביקורת), ריכוז ליפיד פר-אוקסידים (TBARS, מ"ג לגר' שומן), ריכוז גלוטטיון (מילימול
 לגר' חלבון), פעילות גלוטטיון רדוקטאז (יחידות לגר' חלבון), קטלאז (יחידות לגר' חלבון)
 וההתנגדות החשמלית של הרקמה (אוהם לסמ"ק).

תוצאות ודיון:

תוצאות החלק הראשון של המחקר בפרות, עזים וכבשים הכולל את כמויות החלב והרכביו וכן תכונות התגבנות מסוכמות במאמר 1, בעוד שתוצאות התפלגות תאי מערכת החיסונית מסוכמות במאמר 2. נמצאו הבדלים משמעותיים בין חלב ממקור ללא נגיעות וממקור נגוע, כאשר בעלי החיים היו באמצע התחלובה. נמצאו הבדלים משמעותיים בחלב ממקור לא נגוע באמצע או סוף התחלובה וכן נמצאו הבדלים בין מיני בעלי החיים. התוצאה המשמעותית המתייחסת למטרת המחקר קשורה להרכב החלב העשיר ברכיבים של מערכת החיסון, העשויים לתרום לבריאות בני אדם.

טבלה 1 מרכזת את תוצאות מדדי האימונוגלובולינים, לקטופריין, אלבומין, ציטרט, לקטט ומלאט. בכל המרכיבים האלו פרט לציטרט, חלה עליה משמעותית של פי 10 ויותר בריכוזם בחלב סוף התחלובה. עליה זאת מצביעה על שינויים בסינתוז החלב בשלב זה של התחלובה, על מעבר מסיבי של אימונוגלובולינים לעטין, בדומה לשלב יצירת הקולוסטרום. תוצאות אלו מצביעות על בדיקות היתכנות בריאותיות וכלכליות של הפרדת חלב זה ושימוש בו למטרות של הפרדת רכיבים בעלי ערך מוסף גבוה כגון לקטופריין או לחילופין, שימוש בחומר גלם זה להכנת מזון בראותי.

טבלה 1. ריכוזי מרכיבים של מערכת החיסון בחלב פרות ללא נגיעות תוך עטינית מאמצע התחלובה, בהשוואה לחלב פרות מסוף התחלובה המייצרות פחות מ-15 ליטר ליום (ממוצע \pm סטיית תקן)

חלב סוף תחלובה	חלב אמצע תחלובה	מדד/ מצב פיזיולוגי
7600 ± 12^b	200 ± 25^a	אימונוגלובולינים מטיפוס G (מיקרוגרם/מ"ל)
2500 ± 120^b	50 ± 15^a	אימונוגלובולינים מטיפוס A (מיקרוגרם/מ"ל)
1500 ± 110^b	150 ± 17^a	לקטופריין (מיקרוגרם/מ"ל)
1200 ± 100^b	160 ± 18^a	אלבומין (מיקרוגרם/מ"ל)
3.0 ± 1.0^b	13 ± 1.8^a	ציטרט (מילימולר)
700 ± 18^b	50 ± 15^a	לקטט (מיקרומולר)
400 ± 22^b	50 ± 16^a	מלאט (מיקרומולר)

*ערכים המסומנים באותיות שונות מובהקים סטטיסטית ברמה של 1%.
** המבחן הסטטיסטי נעשה לאחר המרת הערכים ללוג העשרוני שלהם.

השפעות מקור החלב, אמצע או סוף התחלובה על עקה חמצונית בניסויי in-vitro תוצאות השפעת עקה חמצונית במי חמצן על יצירת פראוקסידים (TBARS) ופעילות קטלאז בתאי אפיתל של בלוטת חלב של עכברות או תאי רקמת מעי גס של בני אדם מסוג CACO2 בנוכחות מי גבינה מחלב מאמצע או סוף התחלובה מובאות בטבלאות 2 ו-3.

הטיפול בשני סוגי החלב, אמצע וסוף התחלובה, הקטינה את העקה החמצונית, אך החלב של פרות מסוף התחלובה עשה זאת בצורה יעילה יותר ולמעשה מנע את הנזק החמצוני לחלוטין. ניתן להסביר את התוצאות החלקיות בעירור פעילות קטלאז, אנזים המפרק מי חמצן, ע"י הטיפולים בחלב. התוצאות מובאות בטבלה 3.

טבלה 2. השפעת עקה חמצונית במי חמצן (50 מיקרומולר) על יצירת פראוקסידים (TBARS) ופעילות קטלאז בתאי אפיתל של בלוטת חלב של עכברות בנוכחות מי גבינה מחלב מאמצע או סוף התחלובה

טיפול	ריכוז TBARS, (מיקרומול/גרם שומן)	פעילת קטלאז, יחידות למ"ל
ביקורת: ללא תוספות	5.14 ± 0.8^a	33.0 ± 3.3^a
מי חמצן	19.45 ± 0.9^b	3.0 ± 1^b
מי חמצן + מי גבינה מאמצע התחלובה	10.1 ± 1.1^c	47.0 ± 2.2^c
מי חמצן + מי גבינה מסוף התחלובה	4.7 ± 0.9^a	65.0 ± 2.3^d

*ערכים המסומנים באותיות שונות מובהקים סטטיסטית לפי מבחן T זוגי ברמה של 1% ביחס לביקורת.
השפעה של חלב מאמצע התחלובה הייתה מובהקת ברמה של 5% בהשוואה לטיפול במי חמצן בלבד.
ההשפעה של הטיפול בחלב מסוף התחלובה הייתה מובהקת ברמה של 1% בהשוואה לטיפול במי חמצן בלבד

טבלה 3. השפעת עקה חמצונית במי חמצן (50 מיקרומולר) על יצירת פראוקסידים (TBARS) ופעילות קטלאז בתאי אפיתל של בלוטת חלב של תאי רקמת מעי גס של בני אדם מסוג CACO2 בנוכחות מי גבינה מחלב מאמצע או סוף התחלובה

טיפול	חיוניות תאים	ליפיד-פראוקסידס	גלוטטיון רדוקטאז	גלוטטיון	קטלאז	התנגדות חשמלית
ביקורת: ללא תוספות	100 ± 15.0^a	1.7 ± 0.5^a	30.1 ± 5.5^a	101.5 ± 9.5^a	27.5 ± 4.4^a	92.2 ± 7.5^a
מי חמצן	65.1 ± 16.1^b	2.7 ± 0.6^b	19.2 ± 4.6^b	73.1 ± 7.5^b	15.1 ± 3.5^b	65.0 ± 5.9^b
מי חמצן + חלב מאמצע התחלובה	79.9 ± 15.2^b	1.2 ± 0.5^a	23.1 ± 5.6^b	85.2 ± 7.9^b	20.2 ± 2.9^b	78.2 ± 6.5^b
מי חמצן + חלב מסוף התחלובה	92.3 ± 15.8^a	1.9 ± 0.65^a	27.3 ± 5.7^a	95.4 ± 9.2^a	25.6 ± 4.5^a	88.3 ± 8.0^a

*ערכים המסומנים באותיות שונות מובהקים סטטיסטית לפי מבחן T זוגי ברמה של 1% ביחס לביקורת.

השפעה של חלב מאמצע התחלובה הייתה נמוכה אך לא מובהקת ברמה של 5% בהשוואה לטיפול במי חמצן בלבד.

ההשפעה של הטיפול בחלב מסוף התחלובה הייתה מובהקת ברמה של 1% בהשוואה לטיפול במי חמצן בלבד.

סיכום ומסקנות:

חלב הינו מוצר בסיסי לבני אדם בכל הגילים: תינוקות, ילדים, נוער ומבוגרים. חלב הנוצר ביומיים הראשונים לאחר ההמלטה נקרא קולוסטרומ, שהנו נוזל המכיל ריכוז גבוה (הרבה מעבר לזה של חלב רגיל או נוזלים ביולוגים אחרים) של נוגדנים (בעיקר מסוג G) וחומרים אחרים כגון: לקטופרין, אלבומין, ויטמינים, מינרלים, חומצות גרעין, אנזימים (בעיקר ידוע על ריכוז גבוה של ליזוזומים ולקטופראוקסידאז) ופקטורי גדילה. בחלק הראשון של המחקר נמצא כי חלב פרות כבשים ועזים בסוף התחלובה שונה באופן מובהק במדדים רבים מחלב באמצע התחלובה ושינויים אלו נובעים מהבדלים פיסיולוגיים, ללא קשר לנגיעות תוך עטינית. דיון רחב בתוצאות מובא במאמרים שהתפרסמו. תוצאות אלו יכולת להוות בסיס לתחשיב כלכלי להפקת מקצת ממרכיבי החלב או לחילופין, להשתמש בחלב כחומר גלם לתוספי מזון בריאותיים. תוצאות החלק השני מראות על ההשפעה הממתנת של חלב על חמצון תאים ובעיקר של חלב מסוף התחלובה. תוצאות אלו מחזקות את אפשרות בחינת פעילות הרכיבים בחלב, האם פעילות של רכיב בודד או פעילות סינרגטית וכן את יעדי שימוש החלב כחומר גלם.

לסיכום, תוצאות המחקר התלת שנתי אוששו את הנחת היסוד, שחלב של פרות שמייצרות בסוף התחלובה מעט חלב עשוי לשמש כמקור למזון רפואי. לאור תוצאות חיוביות אלו יהיה עניין להמשיך את המחקר בתחומים הבאים: בדיקה פרוטאומית מקיפה של הרכב חלב סוף התחלובה בפרות המייצרות מעט חלב, העשוי להצביע על אינדיקציות נוספות לפיתוח המוצר למזון רפואי. יש להמשיך את התוצאות החיוביות לגבי ההשפעה האנטי-חמצונית ואנטי דלקתית במודל של בע"ח שלם, קרוב לוודאי עכברי מעבדה. המשך חיובי של כיווני המחקר אלו עשוי להצדיק פיתוח ענף משקי, שינצל את התכונות החיוביות של חלב סוף התחלובה, שהודגמו בעבודה זו.