
RELATIONSHIP OF CITRIC ACID CONTENT AND BODY CONDITION TO FAT / PROTEIN RATIO IN MILK AS INDICATORS OF NEB

Ducháček J., Beran J., Stádník L., Vacek M., Štolc L.

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 - Suchbátka, Czech Republic

E-mail: Duchacek@af.czu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was evaluation of the fluctuations of citric acid and group of BCS in relationship to ration of fat / protein in milk during the first four months of lactation. For this experiment was selected 27 Holstein cows with different milk yields and lactation order. The ration of fat / protein and citric acid content were monitored. The ration of fat to protein in milk had first decreasing and then slightly increasing trend. The citric acid content in the monitoring period had decreasing character. SAS 9.1. and their method GLM have been used as a basic modeling program and statistical methods. Statistical model for fat / protein ration and citric acid content in milk depending on groups of loss of condition and week of lactation have been tested. Among the effects in the model and the ratio of fat / protein and citric acid content were found either equivocal or low significant relationships. We can conclude that both monitored indicators are affected by week of lactation and intensity of loss of condition.

Key words: ratio of fat / protein in milk, negative energetic balance, citric acid, holstein cows

Acknowledgments: This study was supported by NAZV QH91270 and MSM 6046070901.

ÚVOD

Krávy se po otelení dostávají do záporné energetické bilance (NEB). Tato NEB se projevuje především ve složení mléka a kondici. Jako nejčastější indikátory NEB jsou používány vývoje kondice, poměr tuk/bílkovina a obsah kyseliny citronové v mléce. Obsahem složek v mléce a energetickým metabolismem ve vztahu k mléčné užitkovosti se zabývali Sojková et al. (2010). Obsah kyseliny citronové je značně proměnlivý ukazatel a je laboratorně stanovován buď z krve nebo z mléka. Podle Töpela (1976) jsou citráty v mléce zastoupeny v koncentraci od 0,2% obsahu. Většina citrátů v mléce je podle tohoto autora ve formě volné kyseliny citronové a v buňkách mléčné žlázy se syntetizuje z kyseliny pyrohroznové. Podle práce od Illka a Pechové (1997) může být množství kyseliny citronové v mléce dobrým ukazatelem energetického metabolismu dojníc. V posledních letech bylo publikováno několik prací zaměřených na analýzu kyseliny citronové v mléce. Například Kubešová et al. (2009) analyzovali obsah kyseliny citronové v mléce ve vztahu k reprodukci u dojníc holštýnské (H) a českého strakatého skotu (C). Proto jsme odvodily hypotézu, že existuje vztah mezi indikátory energetické bilance. U krav, které ztratily více kondice v prvním měsíci po otelení, by tedy měla nastat změna poměru tuk/bílkovina a obsahu kyseliny citrmonové v mléce.

MATERIÁL A METODIKA

Na vybrané farmě s chovem holštýnské skotu bylo opakovaně odebráno mléko od 27 kusů krav s různou dojivostí a pořadím laktace. Mléko od jednotlivých krav bylo odebráno v týdenním intervalu od 7. do 119. dne laktace. Od každého kusu byly odebrány dvě standardní vzorkovnice s mlékem. Mléko v první vzorkovnici bylo určeno pro stanovení základních složek mléka. Z obsahu tuku a bílkovin byl vypočítán poměr tuk/bílkovina v mléce. Mléko z druhé vzorkovnice bylo analyzováno na obsah kyseliny citronové. Analýza obsahu kyseliny citronové v mléce byla realizována spektrofotometrickou metodou podle doporučené metodiky (Genčurová, 2008). Vzorek mléka o objemu 3 ml byl převeden do 25 ml odměrné baňky. Následně se přidalo 5 ml roztoku kyseliny trichloroctové a tento roztok se doplnil destilovanou vodou po rysku. Následovalo kvantitativní převedení této směsi do kádinky a zde se nechala 30 minut inkubovat při pokojové teplotě. Vzorek byl následně přefiltrován. Mezitím byla připravena osmibodová koncentrační řada z citrátu trisodného a kyseliny trichlóroctové. Koncentrační řada i vzorky mléka se v množství 0,5 ml odpipetovaly do zkumavek. Posléze bylo do těchto vzorků napipetováno 0,65 ml pyridinu a 2,85 ml acetanhydridu. Vzorek byl důkladně promíchán a inkubován ve vodní lázni při teplotě 32°C po dobu 30 min.. Kyselina citronová s pyridinem a acetanhydridem vytváří žlutě zbarvený komplex, jehož intenzita zbarvení byla následně měřena spektrofotometrem Genesys 10VIS při vlnové délce 428 nm. Hodnoty ze spektrofotometru byly následně porovnávány proti koncentrační řadě s již známými obsahy kyseliny citronové. Výsledky byly přepočítány na koncentraci v mmol/l mléka. Celkem bylo analyzováno 414 vzorků, v průměru 15,3 vzorku na dojnici, přičemž

minimální počet vzorků od dojnice činil 6 vzorků a maximální 17 vzorků. Z těchto dat byly vyřazeny údaje s obsahy tuku v mléce nad 7% a obsahy kyseliny citronové v mléce nad 22,5 mmol/l. U hodnocených zvířat byla také během odběru vzorků stanovována tělesná kondice (BCS). Kondice byla hodnocena v měsíčních intervalech podle metodiky pro lineární popis zevnějšíku u holštýnského skotu s odchylkou 0,25 bodu. Pro BCS byly stanoveny rozdíly mezi hodnoceními v průběhu laktace a při otelení. Podle ztráty kondice 28 dní po otelení byly zvířata rozdělena na dvě skupiny: zvířata u kterých poklesla BCS o 0,25 a méně bodů a zvířata u kterých BCS pokleslo o 0,5 bodů a více. V první skupině se ztrátou BCS 0,25 bodu a méně bylo zařazeno 12 zvířat. Ve druhé skupině se ztrátou BCS 0,5 a více bodů bylo zjištěno 15 zvířat. Z obsahu ukazatele poměru tuk/bílkovina, obsahu kyseliny citrónové, týdnů laktace a skupin podle ztráty kondice byla vytvořena databáze. Vyhodnocení probíhalo ve statistickém programu SAS 9.1. pomocí procedury ANOVA (GLM). Bylo testováno několik variant modelů výpočtu. Nejvhodnější variantou byl model s obsahem kyseliny citronové a poměrem tuk/bílkovina jako závislými proměnnými. V tomto modelu byly skupiny ztrát kondice a týdny laktace jako nezávislými proměně. Vyhodnocení bylo realizováno jak pro skupiny ztrát kondice, tak i pro týdny laktace.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Od 27 krav holštýnského skotu bylo zhodnoceno celkem 414 vzorků. Od vybraných zvířat jsme měli od 6 do 17 vzorků mléka. Základní statistiky sledovaných proměnných: poměr tuk/ bílkovina, kondice a kyseliny citronové jsou uvedeny v tabulce 1. V tomto grafu jsou vyhodnoceny průměry, směrodatné odchylky, rozptyl, rozpětí, standardní chyba, koeficient variability a extrémní sledovaných proměnných.

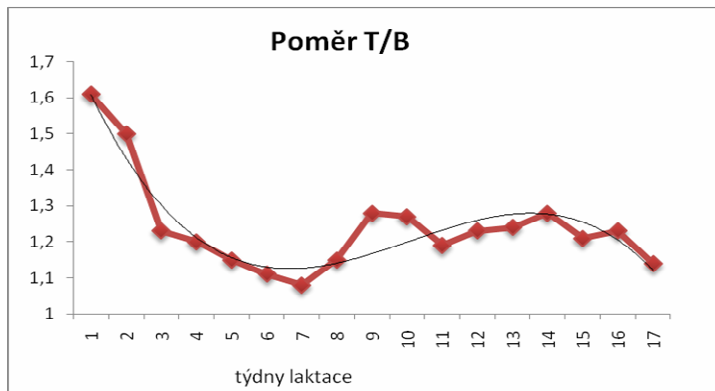
Tab. 1 Základní statistiky sledovaných ukazatelů souboru

Proměnná	N	μ	s	min.	max.	Rozpětí	s^2	stand. chyba	V (%)
KC	396	9,575	3,475	3,719	22,21	18,491	12,074	0,175	36,292
POM	408	1,227	0,376	0,27	4,801	4,801	0,141	0,019	30,652
Kondice	117	2,684	0,381	1,5	3,75	2,25	0,145	0,035	14,18

Vývoj poměru tuk/ bílkovina je uveden v v grafu 1. Tento ukazatel má z počátku klesající charakter přibližně do 7 týdne laktace. Dále docházelo k mírnému zvýšení a ustálení hodnot, což svědčí o určitém vyrovnání energetického stavu dojnic. Proto je tento graf proložen polynomicickou funkcí 3 stupně, kterou lze popsat modelovou rovnicí:

$$y = -0,0009x^3 + 0,0287x^2 + 0,2559x + 1,8369 \quad (R^2 = 0,8678).$$

Graf 1. Vývoj poměru tuk/bílkovina v mléce



Podle Dirksen (1994) a Hagert (1992) poměr tuk/ bílkovina nižší než 1,4 indikuje energetickou nedostatečnost. Poměr tuk/bílkovina má vztah i ke zdravotnímu stavu. Tento vztah zjišťoval ve své práci Geishauser a kol. (1997).

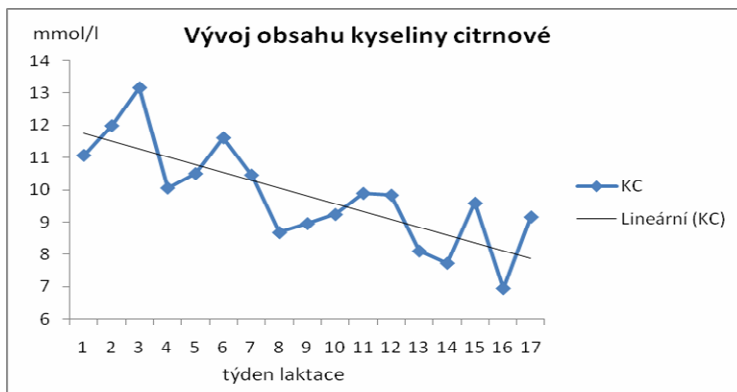
Dalším ukazatelem energetického stavu krav je hodnocení tělesné kondice (BCS). U BCS docházelo v průměru k jejímu poklesu z 3,18 na začátku laktace až na 2,48 ve 12 týdnů laktace. V následujícím období již došlo k ustálení a mírnému nárůstu BCS. K podobným výsledkům v hodnocení BCS došli také Maršálek et al. (2008). Zde byl zjištěn průměrný pokles BCS během prvních šesti měsíců laktace z 3,59 na 2,43 bodů a současně zjistili, že k nejvýznamnějšímu poklesu BCS dochází do třetího měsíce po otelení. V této práci dále zjistili, že v průběhu laktace BCS poklesne v průměru o 1,16 bodu. Také podle Parker (2009) může BCS u krav klesnout až na hodnotu 2,5 bodů, při ztrátě 1,5 kg tukové tkáně za den. K poklesu BCS ale může podle tohoto autora docházet až do 4. měsíce laktace, což se v našem sledování nepotvrdilo. Kvůli rozdílným podmínkám a změnám BCS v průběhu laktace jsme zvířata rozdělili do skupin podle ztráty kondice v prvním měsíci po otelení viz metodika.

Neposledním ukazatelem NEB je také obsah kyseliny citronové. V našem pokusu byl zjišťován obsah kyseliny citronové z mléka. Podle Kubešové et al. (2009) byla nejvyšší koncentrace kyseliny citronové naměřena v prvních pěti týdnech laktace u H. Nejnižší obsah kyseliny citronové byl zaznamenán v 9. týdnu laktace (6,00 mmol/l). Podle Genčurové (2008) se za fyziologické rozpětí obsahu kyseliny citronové považuje 8 až 10 mmol/l (0,149 až 0,187 %). Hodnoty pod vymezeným oborem potom indikují energetický nedostatek metabolismu krav a vyšší hodnoty energetický přebytek. Také Garnsworthy et al. (2006) pozoroval úroveň kyseliny citronové (citrátu) u dojnic v průběhu laktace. V jeho výzkumu se prokázala jako signifikantně vyšší (11,3 mmol/l) koncentrace u krav na začátku laktace než u krav uprostřed laktace (9,7 mmol/l).

Průměrný obsah kyseliny citronové se ve sledovaném období pohyboval od hodnoty 6,95 mmol/l v 16 týdnu do 13,16 mmol/l ve třetím týdnu laktace viz graf 2. Tento graf je proložen lineárním trendem, který je charakterizován následující rovnicí:

$$y = -0,2429x + 12,01 \quad (R^2 = 0,6022).$$

Graf 2 Vývoj obsahu kyseliny citronové v mléce



Standardní odchylka obsahu kyseliny citronové byla poměrně vysoká a dosahovala hodnot 3,47 mmol/l. Výsledné koncentrace v našem výzkumu nejsou v souladu s fyziologickým rozpětím uváděným v práci od Genčurové (2008) ani s rozpětím uvedeným ve studii od Kubešové et al. (2009). V naší práci jsme sice dosáhli vyšších koncentrací, ale v podstatě se shodujeme se studií od Garnsworthyho et al. (2006).

Pro praktické hodnocení NEB existují ještě další ukazatelé (vývoj obsahu mastných kyselin v mléce, obsah močoviny v mléce apod.), ale ty jsme v tomto vyhodnocení nebraly v úvahu. Následně byl sestaven model a byly testovány efekty viz metodika. V první variantě modelu pro odhad nejmenších čtverců (LSM) pro skupiny ztrát kondice (poměr tuk/bílkovina a obsah kyseliny citronové v mléce) viz tabulka 2.

Tab. 2 Odhad parametrů LSM pro poměr T/B a obsah kys. citronové podle skupin ztráty kondice

POM					
skupiny podle ztráty kondice	POM LSMEAN	standardní chyba	H0:LSMEAN=0 Pr > t	t hodnota	Pr > t
1	1,2740764	0,029993	<,0001	1,35	0,1773
2	1,2232649	0,022975	<,0001		
KC					
skupiny podle ztráty kondice	POM LSMEAN	standardní chyba	H0:LSMEAN=0 Pr > t	t hodnota	Pr > t
1	10,005748	0,277136	<,0001	1,62	0,1071
2	9,4501521	0,21179	<,0001		

MENDELNET 2010

Pro ukazatel poměr tuk/bílkovina byla hodnota R-kvadrát 0,093144 (model měl průkaznost $P = 0,0019$). Pro ukazatel obsah kyseliny citronové byla hodnota R-kvadrát 0,139736 ($P < 0,001$). Druhá varianta výpočtu byla model pro odhad LSM pro týdny laktace (poměr tuk/bílkovina a obsah kyseliny citronové v mléce) viz tabulka 3 a 4. Hodnoty R - kvadrátu byly stejné jako v předchozí variantě.

Tab. 3 Odhadnuté parametry LSM pro poměr tuk/bílkovina v mléce podle týdnů laktace

POM			
týdny	POM LSMEAN	Standardní chyba	Pr > t
1	1,620286	0,0951059	<,0001
2	1,516789	0,0892625	<,0001
3	1,240193	0,0748051	<,0001
4	1,203246	0,0705561	<,0001
5	1,161126	0,0705561	<,0001
6	1,118679	0,0705561	<,0001
7	1,08114	0,0718595	<,0001
8	1,158939	0,0718595	<,0001
9	1,289344	0,0764773	<,0001
10	1,27545	0,074723	<,0001
11	1,190158	0,0732455	<,0001
12	1,236959	0,0732455	<,0001
13	1,249018	0,0732455	<,0001
14	1,287174	0,0732455	<,0001
15	1,219917	0,0732455	<,0001
16	1,232791	0,0732455	<,0001
17	1,146191	0,0780519	<,0001

Tab. 4 Odhadnuté parametry LSM pro obsah kyseliny citronové v mléce podle týdnů laktace

KC			
týdny	kc LSMEAN	Standardní chyba	Pr > t
1	10,8404383	1,0508712	<,0001
2	10,8348121	0,8568831	<,0001
3	11,4807138	0,7200939	<,0001
4	12,4863834	0,6606662	<,0001
5	9,5917254	0,6356013	<,0001
6	9,2958380	0,6473312	<,0001
7	11,8988796	0,6598062	<,0001
8	8,7404396	0,6598062	<,0001
9	9,2707411	0,6738692	<,0001
10	8,9096746	0,6731069	<,0001
11	9,6076396	0,6598062	<,0001
12	9,6204663	0,6731069	<,0001
13	8,9993596	0,6598062	<,0001
14	8,3433996	0,6598062	<,0001
15	9,1880796	0,6598062	<,0001
16	8,3351596	0,6598062	<,0001
17	7,9313996	0,6598062	<,0001

ZÁVĚR

V průběhu laktace dochází k vývoji BCS. K největším změnám, tedy poklesům, dochází do konce prvního měsíce laktace. Po tomto období došlo již pouze k malým změnám a postupně se hodnoty ustálily. Podle předpokladu se tedy vyrovnávala NEB a dojnice přestávaly ztrácet zásobní tukovou tkáň. U obsahu kyseliny citronové byly průměrné hodnoty ve sledovaném období v rozmezí 6,95 až 13,16 mmol/l. Následně byly realizovány výpočty pro výše jmenované efekty viz metodika. Pro hodnocení podle týdnů laktace byly výsledkem i tabulky vztahů mezi týdny laktace. Tyto vztahy mezi týdny laktace ovšem byly v drtivé většině neprůkazné a nabývaly hodnot od přibližně - 4,5 do 4,5. Do hodnocení vzájemných vztahů pomocí metody ANOVA bylo zařazeno poměrně málo efektů. Pokud jsme do výpočtu dodaly další efekty, výpočet sice proběhl, zvýšila se nám hodnota R-kvadrátu, ale nebyly dopočítány hodnoty LSM průměrů. Výsledkem je, že existuje vztah mezi poměrem tuk/ bílkovina, obsahem kyseliny citrónové a týdny laktace, skupiny ztráty kondice. Z toho vyplývá, že oba sledované ukazatele jsou ovlivněny týdny laktace i intenzitou ztráty kondice. Bohužel pro případ efektu skupin ztrát kondice je to neprůkazné ovlivnění. Pro týdny laktace je průkaznost $P < 0,01$.

LITERATURA

Dirksen G. (1994): Kontrolle von Stoffwechselparametern bei Milchkühen an Hand von Milchparametern, Proc. XVIII World Buiatrics Congr. (Bologna), 35-45.

Garnsworthy, P.C., Masson, L.L., Lock, A.L., Mottram, T.T. (2006): Variation of milk citrate with stage of lactation and de novo fatty acid synthesis in dairy cows, J. Dairy Sci., 89, 1604 - 1612.

Geňurová V. (2008): Studium vztahů přímých a nepřímých analytických metod pro kontrolu základních složek a vlastností mléka. Disertační práce, ČZU Praha, 126 s.

Geishauer T. D., Leslie K. E., Duffield T. F. B., Edge V. L. (1997): An Evaluation of Protein/Fat Ratio in First DHI Test Milk for Prediction of Subsequent Dispalced Abomasum in Dairy Cows. Can. J. Vet. Res.; 62, 144 - 147.

Hagert C. (1992): Kontinuierliche Kontrolle der Energie- und Eiweißversorgung der Milchkühe während der Hochlaktation anhand der Konzentrationen von Azeton, Harnstoff, Eiweiß und Fett in der Milch (Dissertation). München, Universität, Vet. Med Fak, 126 p.

Illek J., Pechová A. (1997): Poruchy metabolismu dojnic a kvalita mléka. Metabolic disorders at cows and milk quality. Farmář, 6, 29-30.

Kubešová M., Fazon T., Melich J., Trávníček J., Maršálek M. (2009): Analysis of milk urea and citrate content during the postpartal period and their impact on reproduction in dairy cows. Původní vědecké sdělení, Výzkum v chovu skotu, Research Institute for Cattle Breeding, Ltd., ročník LI, 1, 185 svazek, ISSN 0139-7265.

Maršálek M., Zedníková J., Pešta V., Kubešová M. (2008): Holstein cattle reproduction in relation on milk Yield and body condition score. University of South Bohemia in České Budějovice, Agricultural faculty, Department of Special Livestock Breeding, J. Central Europe Agriculture, 9, 4, 621- 628.

Parker R.,(publikováno 1989) (poslední vydání 1996): Using Body Condition Scoring in Dairy Herd Management, Ministry of Agriculture, Food & Rural Affairs, Ontario, (on-line)(2009-12-14), dostupné z: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/facts/94-053.htm#top>, poslední aktualizace 15.12.2008.

Sojková K., Hanuš O., Říha J., Genčurová V., Hulová I., Jedelská R., Kopecký J. (2010): Vliv fyziologie laktace při vyšší a průměrné užitkovosti na složení, vlastnosti a zdravotní ukazatele mléka dojníc holštýnského plemene skotu. Agrovýzkum Raportín, Scientia Agric. Bohem., 41, 21-28.

Töpel A. (1976): Chemie und Physik der Milch. Lizenznummer: 114-210/71/76, Bestellnummer: 5461038, VEB Fachbuchverlag Leipzig.

Ing. Jaromír Ducháček, Ing. Jan Beran, Doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D, Ing. Mojmír Vacek, CSc., prof. Ing. Ladislav Štolc, CSc., Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Kamýcká 129, Praha 6 – Suchbátka, 165 21, e-mail: Duchacek@af.czu.cz, tel. +420 224 383 070.