

BIOHEMIJSKI POLIMORFIZAM PROTEINA MLEKA*

Uvod

Stalni nedostatak i kriza proteina u ljudskoj ishrani intenzivirali su istraživanja u svim oblastima proteina (1). Zahvaljujući napretku metoda i tehnike ispitivanja postignuta su brojna otkrića u oblasti proteina među kojima su naročito značajna ona koja se odnose na biohemijski polimorfizam. Sami proteini mleka zbog izvesnih svojih osobina postali su materijal ispitivanja brojnih istraživača i izvan užeg mlekarskog interesa. U ovom članku želeli smo da iznesemo najnovija saznanja o biohemijskom polimorfizmu proteina mleka.

Heterogenost i nomenklatura proteina mleka

U poslednje dve decenije zahvaljujući napretku i primeni raznih analitičkih metoda utvrđen je veliki broj različitih proteina u mleku. U tome je naročito doprinela primena elektroforeze. Na slici 1 prikazane su pozicije pojedinih frakcija kazeina i proteina surutke koje se dobijaju elektroforezom na skrobnom ili poliakrilamidnom gelu. Ovom tehnikom se dobija do 20 frakcija samo od kazeina. Na osnovu rezultata dobijenih razdvajanjem pojedinih proteina i njihovih frakcija s pomoću elektroforeze izrađena je nova klasifikacija i nomenklatura proteina mleka.

Prvu detaljnu nomenklaturu proteina mleka dao je jedan komitet za nomenklaturu, klasifikaciju i metodologiju proteina mleka Američkog mlekarskog društva 1960, a ista je dopunjena 1965 (2). U tabeli 1 prikazani su osnovni elementi te nomenklature i klasifikacije proteina mleka.

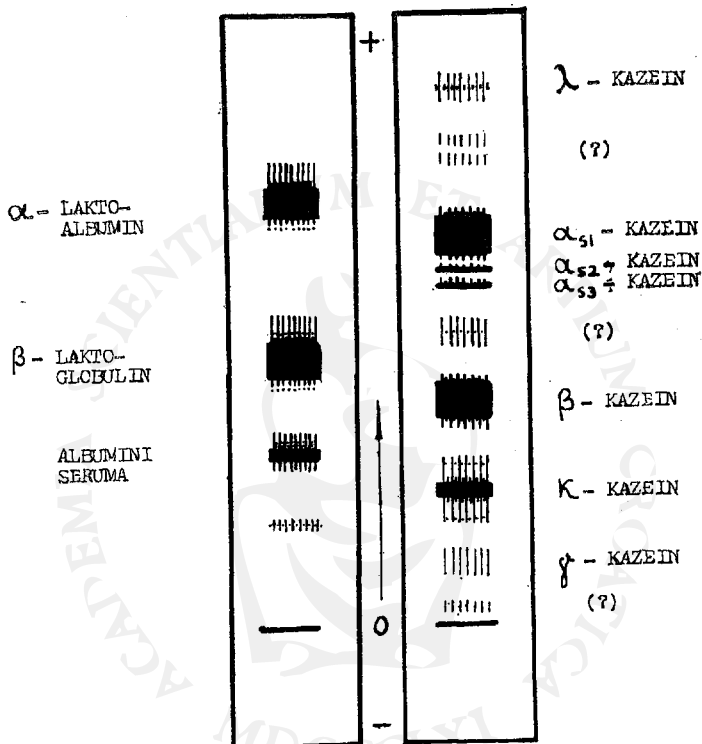
Kompleks alfa-kazeina. — To je frakcija kazeina koja sadrži alfa_s-, kapa- i lambda-kazeine koji su rastvorljivi u 6,6 M urei, a nerastvorljivi u 4,6 M urei. U ovaj kompleks spadaju dve grupe alfa-kazeina. Jednu grupu sačinjavaju komponente koje su osetljive na Ca (alfa_{s1}, alfa_{s2}-alfa_{s3}-kazein i sl.). Drugu grupu sačinjavaju komponente koje su neosetljive na Ca (kapa, lambda, alfa_s-kazein).

Alfa_s-kazeini predstavljaju frakciju kompleksa alfa-kazeina koja je nerastvorljiva u 0.40 M CaCl₂ pri pH 7,0 na 0—4° C. Ovoj frakciji pripadaju genetske forme alfa_{s1}-kazeina i drugi koji su slični alfa_s-kazeinima. Alfa_s-kazeini se stabiliziraju s pomoću kapa-kazeina protiv precipitacije s kalcijem.

Alfa_{s1}-kazeini se također stabiliziraju s pomoću kapa-kazeina protiv precipitacije od kalcijuma i predstavljaju najveći deo od ukupnog alfa_s-kazeina. Ova frakcija pokazuje genetski polimorfizam. Do sada su utvrđene četiri genetske forme ovoga kazeina.

Grupa srodnih proteina alfa_s-kazeina sastoji se od ostalih kazeina koji su osetljivi na kalcijum kao što je alfa_{s2}- i alfa_{s3}-kazeina.

* Referat sa VII Seminara za mljekarsku industriju, 13—14. 2. 1969, Tehnološki fakultet, Zagreb.



Sl. 1 — Pozicije pojedinih frakcija proteina surutke i kazeina koje se dobijaju elektroforezom na skrobnom ili poliakrilamidnom gelu

(Rad: Vujičić)

Kapa-kazein je frakcija kompleksa alfa-kazeina koja je rastvorljiva u 0.40 M CaCl_2 pri pH 7,0 na 0—4°C. To je jedan fosfogliko-protein. Kapa-kazein sadrži jedan glikomakropeptid koji je veoma hidrofilan i deluje kao zaštitni koloid u kazeinskom kompleksu. Pod delovanjem sirišnog enzima (renina) glikomakropeptid se cepa iz kompleksa i prelazi u surutku kao rastvorljiv, a kapa-kazein prelazi u para-kapa-kazein koji se destabilizira u prisustvu kalcijuma te se koaguliše s ostalim komponentama kazeinskog kompleksa. Kapa-kazein je najsloženiji protein mleka i pokazuje veliku heterogenost. Sastoji se najmanje od 7 frakcija od kojih su dve genetske forme.

Beta-kazein je frakcija kazeina koja je rastvorljiva u 4,6 M urei ali nerastvorljiva u 3,3 M urei pri pH 4,6. Sa kalcijumom se taloži na 35° C, ali ne i na 4°C. Do sada je poznato 7 genetskih forma.

Gama-kazein je frakcija kazeina koja je rastvorljiva u 3,3 M urei, a nerastvorljiva u 1,7 M urei pri pH 4,7 uz dodatak amonijum-sulfata.

Lambda-kazein je do sada nedovoljno definirana frakcija kompleksa alfa-kazeina koja je rastvorljiva u 0,40 Ca pri 7,0 na 0—4°C. To je heterogena frakcija s visokim sadržajem fosfora (1,2%) koja ne stabilizira alfa_s-kazein protiv precipitacije s kalcijem.

Tabela 1

Frakcije belančevina mleka i neke njihove osobine

Klasična nomenklatura frakcije	Savremena nomenklatura frakcija (1960/65)	Procenat od ukupnih proteina obranog mleka	Molekularna težina	Izo-električna tačka (pH)	Poreklo po mestu biosinteze
Kazein (precipitiran zakiseljavanjem na pH 4,6)		76—86	15 000— 33 600		
	alfa-kazein	45—63	27 000	4,1	mlečna
	beta-kazein	19—28	24 100	4,5	žlezda
	gama-kazein	3—7	30 000	5,8—6,0	krv
Nekazeinski proteini (proteini surutke)		14—24			
Laktoalbumini (rastvorljiv u zasićenom rastvoru MgSO ₄)	beta-laktoglobulin	7—12	36 000	5,2—5,3	mlečna žlezda
	alfa-laktalbumin	2—15	16 500	5,1	mlečna žlezda
	Albumin krvnog seruma	0,7—1,3	69 000	4,7	krv
	Euglobulin	0,8—1,7	180 000— 252 000	6,0	
Laktoglobulin (nerastvorljiv u zasićenom rastvoru MgSO ₄)	Pseudoglobulin	0,6—1,4	180 000— 289 000	5,6	krv
		2—3	4 900— 24 900		još ne- utvrđeno, izuzev serumske komponente koja potiče iz krvi

Proteini surutke sastoje se u prvom redu od beta-laktoglobulina. Alfa-albumin je drugi protein po količini u ovoj grupi. Zatim, u ovu grupu spadaju albumini seruma (krvnog) euglobulin, pseudoglobulin i grupa slabo poznatih proteoza i peptona.

Pored ovoga treba napomenuti da se u mleku nalazi niz proteina u veoma malim količinama kao što su enzimi, tzv. »crveni protein« (laktolin) i proteini (lipoproteini) adsorpcione membrane masnih kapljica.

Genetski polimorfizam proteina mleka

Značaj

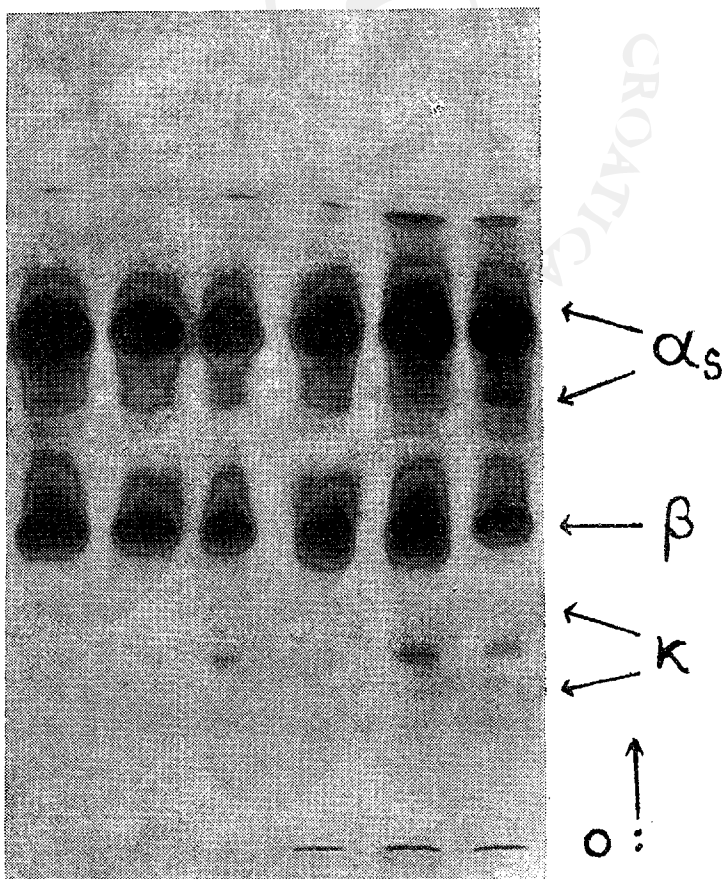
Polimorfizam proteina ili pojava multitipnih molekularnih forma jednog istog proteina ima duboke veze s nasleđivanjem budući da je i sama biosinteza proteina kontrolisana osnovnim genetskim elementima (nukleinskim kiselinama). Genetske forme se javljaju kao posledica genetske kontrole biohemijskih procesa u organizmu, a posebno biosinteze proteina. Veza između gena i proteina se pokazuje u funkciji gena da kontrolira redosled (sekvencu) aminokiselina u polipeptidnom lancu proteina.

Genetski polimorfizam je odraz genetske kontrole razlika između individua u jednoj vrsti.

Poznavanje i izučavanje genetskih forma proteina mleka interesantno je za genetiku općenito a posebno za genetiku populacija. Zatim, za izučavanje porekla i strukture pojedinih rasa, razlika između rasa kao i za praktičnu primenu u traženju mogućih veza između genetskog polimorfizma proteina i produktivnih osobina individua. Izučavanje genetskih forma proteina je takođe interesantno općenito za biohemiju proteina tako da predstoje ponovna celokupna preispitivanja osobina proteina na bazi njihovih genetskih forma. Najzad, ova pojava je interesantna i s gledišta tehnologije. Npr. može se pretpostaviti da bi genetske forme alfa_{s1}- i kapa-kazeina mogle imati veze s do sada neobjašnjenim razlikama u brzini koagulacije mleka sa sirilom.

Postupak fenotipizacije proteina mleka

Fenotipizacije proteina mleka se danas obavljaju isključivo elektroforezom, i to na dva načina: na skrobnom i na poliakrilamidnom gelu. Oba postupka



Sl. 2 — Pozicije pojedinih frakcija kazeina koje su dobijene elektroforezom na 7% poliakrilamidnom gelu pri upotrebi pufera TRIS-borat- Na_2EDTA sa 4,5 M ureom, pH 9,2 $\mu = 0,8$, 240 V u toku 20 sati na 5°C. (Iz laboratorije za mlekarstvo Poljoprivrednog fakulteta, Novi Sad, 1967)

(Rad: Vujičić)

daju odlično razvijanje pojedinih frakcija kazeina i njegovih genetskih forma. Primena poliakrilamidnog gela ima tehničke prednosti. Primenom baznog pufera TRIS-urea (pH 9,2; $\mu = 0,80$) postiže se razdvajanje svih genetskih forma kazeina i proteina surutke izuzev forma beta-kazeina [A] (A^1 , A^2 , A^3) koje se mogu odrediti samo primenom kiselog pufera (pH 3,0).

Na slici 2 prikazane su pozicije zone pojedinih genetskih forma kazeina koje se dobijaju elektroforezom na skrobnom ili poliakrilamidnom gelu. Genetske forme imaju osobinu da se različitom brzinom kreću u elektroforeskom polju. Forma jednog istog proteina koja ima najveću pokretljivost označava se s A, a ostale s manjom pokretljivošću redosledom B, C itd. Pojedini lokusi za pojedine sisteme označavaju se kao za alfa-laktoalbumin (L_a), beta-laktoglobulin (L_g), alfa_{s1}-kazein ($\alpha_{s1}Cn$), beta-kazein (βCn), kapa-kazein (KCn), a za pojedine alele kojima odgovaraju određene genetske forme označavaju se kao L_a^A , L_a^B , L_g^A , L_g^B , $\alpha_{s1}Cn^A$, $\alpha_{s1}Cn^B$ itd.

Osnovni podaci koji se dobijaju fenotipiziranjem izražavaju se vrednostima **frekvencije gena** za pojedine genetske forme. Na taj način se dobijaju neposrednije informacije nego ako se vrše poređenja sirovih procenata frekvencije fenotipa (procentualne zastupljenosti pojedinih forma jednog proteina koja je nađena kod populacije).

Genetske forme proteina mleka

U tabeli 2 prikazane su do sada otkrivene genetske forme pojedinih proteina mleka.

Alfa_{s1}-kazein se javlja u četiri genetske forme. Forma A i D se veoma retko susreću. Kod svih rasa se redovno nalaze forme B i C. Forma B u odnosu na C dominira kod zapadnoevropskih rasa, dok je obrnuti slučaj kod zebu. Neke hemijske razlike između ovih forma date su u tabeli 3 i 4. Forma D se razlikuje od forme B po tome što je u njoj jedna aminokiselina serin zamenjena s prolinom.

Beta-kazein se pojavljuje u 7 forma. Forma A se pojavljuje u svih rasa i to redovno A^1 . Nešto manje je zastupljena forma B. Izvesne razlike između pojedinih forma prikazane su u tabeli 3 i 4. Forma D se razlikuje od forme B po sadržaju lizina, histidina i arginina.

Kapa kazein se pojavljuje u dvije forme. Kod većine rasa pretežno je zastupljena po frekvenciji forma A. Aminokiselinski sastav ovih forma je veoma sličan. U odnosu na B forma A sadrži više jedan ostatak asparaginske kiseline i treonina, dok forma B ima više jedan ostatak alanina i izoleucina.

Beta-laktoglobulin se javlja u 4 forme od kojih A i B u svih rasa, a ostale dve forme su do sada ređe utvrđivane. Beta-laktoglobulin se sastoji od 162 aminokiseline u proteinskom lancu. Neke utvrđene razlike u sadržaju pojedinih aminokiseline u pojedinih forma date su u tabeli 4. Razlika u redosledu aminokiseline kod A i B forme utvrđena je na poziciji 68 (valin u A, a alanin u B), i na poziciji 120—122 (asparaginska kiselina u A, a glicin u B).

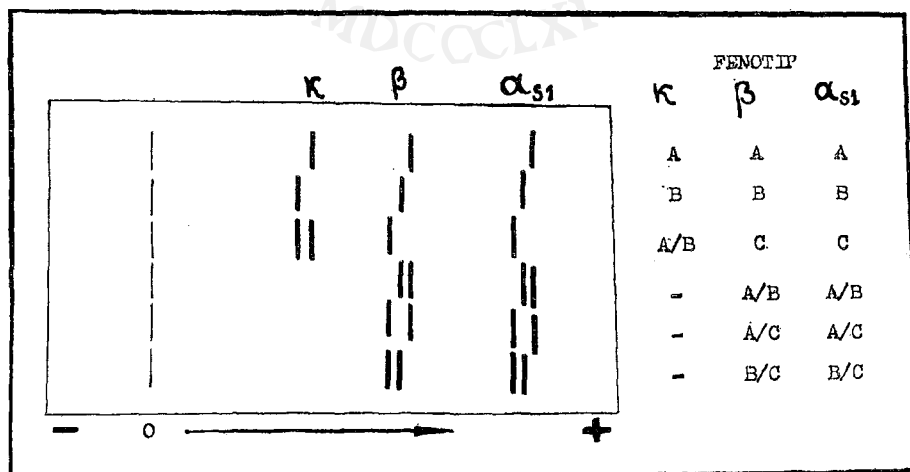
Alfa-laktoalbumin se pojavljuje u dve forme od kojih forma A u svih rasa, a forma B samo kod zebu govečeta. Molekul alfa-laktoglobulin se sastoji od 123 aminokiseline u nizu. Obe forme su identične izuzev što je jedino arginin u B zamenjen glutaminskom kiselinom u A formi.

Gama-kazein se pojavljuje u dve forme čija zastupljenost i osobine su veoma malo ispitivane.

Tabela 2

Genetske forme proteina mleka

Protein	Forma	Godina otkrića	Pojava
Alfa _{s1} -kazein	A		retko
	B	1962	u svih rasa
	C		u svih rasa
	D	1966	retko
Beta-kazein	[A]	1961	u svih rasa
	A ¹		u većine rasa
	A ²	1966	u svih rasa
	A ³		retko
	B	1961	u većine rasa
	Bz	1968	izuzev zebu
Gamma-kazein	C	1961	samo u zebu
	D	1968	retko
	A		u svih rasa (?)
	B	1967	u većine rasa (?)
Kapa-kazein	A		u svih rasa
	B	1964	u svih rasa
Beta-laktoglobulin	A	1955	u svih rasa
	B		u svih rasa
	C	1962	retko
	D	1966	retko
Alfa-laktoalbumin	A		samo u zebu
	B	1958	u svih rasa



Sl. 3 — Pozicije pojedinih genetskih forma kazeina koje se dobijaju elektroforezom na poliakrilamidnom ili skrobnom gelu

(Rad: Vujičić)

Izvesni radovi, ali ne i svi, pokazali su da postoji veza između pojave pojedinih genetskih forma kod raznih sistema kazeina. Naročito je čvrsta veza utvrđena između gama- i beta-kazeina. Takođe, se pokazuje da postoji veza između alfa_{s1}-kazeina i beta-kazeina. Za sada se samo pretpostavlja da su genetski sistemi kazeina međusobno vezani i da su locirani na istom hromosomu. Može

Tabela 3

**Količina azota i fosfora u pojedinim genetskim formama
alfa_{s1}- i beta-kazeina**

Kazein		P	N	P/N	Atoma
		(%)	(%)	odnos	P/mol
Alfa _{s1}	A	1,01	15,10	0,0668	9,0
	B	1,01	15,34	0,0658	9,0
	C	1,01	15,18	0,0655	9,0
Beta	A	0,59	15,18	0,0389	4,8
	B	0,57	15,33	0,0372	4,6
	C	0,50	15,45	0,0324	4,0

(prema Thompson-u i Pepper-u, 1964)

Tabela 4

**Razlika u sadržaju nekih aminokiselina kod genetskih forma
proteina mleka (broj aminokiselina u molu proteina)**

Aminokiselina	alfa _{s1} -kazein ⁽¹⁾			beta-kazein ⁽²⁾					beta-lakto- globulin ⁽³⁾			
	A	B	C	A	A ¹	A ²	A ³	B	C	A	B	C
Asparaginska	17	18	18	9	10	10	9	11	12	32	30	30
Glutaminska	47	46	45	40	39	38	38	40	38	50	50	48
Glicin	11	11	12	5	5	5	5	5	5	6	8	8
Alanin	10	11	11	5	6	5	5	5	5	28	30	30
Valin	12	13	14	19	19	18	18	19	18	20	18	18
Histidin	6	6	6	6	5	5	5	6	6	4	4	6
Leucin	17	20	20	21	21	21	21	21	21	—	—	—
Prolin	21	20	20	34	35	34	36	33 (35)	34	—	—	—
Lizin	18	17	17	11	11	11	11	11	12	—	—	—
Fosfor	—	—	—	4,6	4,8	4,8	4,6	4,95	4,8	—	—	—
Molekulska težina	—	—	—	23,836	24,006	23,471	23,635	—	23,602	—	—	—
C-terminalna	Triptofan					Valin			Izoleucin			
N-terminalna	Arginin					Arginin			Leucin			

(1) Gordon i sar. (4); (2) Peterson i sar. (5); (3) Kalan i sar. (6).

se očekivati da će buduća ispitivanja uz zaista velike napore moći dati više svetla o tim vezama, a naročito o međusobnim vezama polimorfizma proteina mleka s drugim polimorfnim sistemima kao što su transferini seruma (krvnog) i krvne grupe.

Tehnološki aspekti heterogenosti i polimorfizma proteina mleka

Mada ima malo direktnih ispitivanja ipak dosadašnje poznavanje frekvencije pojedinih genetskih forma i njihovih razlika u hemijskim osobinama dopušta nam da pretpostavimo da bi te razlike mogle uticati na neke tehnološke osobine mleka kao sirovine. Danas već možemo da govorimo o fenotipu-

mleka kao jednom novom kvalitativnom pokazatelju mleka. Izvesna ispitivanja koja su izveli Schmidt i Koops (7) pokazala su da toplotna stabilnost može da bude pod uticajem kombinacije nekih genetskih forma proteina.

Ispitivanja su pokazala da je elektroforetska pokretljivost različita kod istih frakcija proteina mleka od raznih vrsta. Ta osobina je praktično primenjena za identifikaciju vrste mleka kao što je mleko žene, krave, ovce i koze. Već 1% dodatog kravljeg mleka kozijem, ili 2% istog dodatog ovčijem može se sa sigurnošću da utvrdi, Aschaffenburg (8), Assenat (9). Takođe, čak i u zreлом siru može se utvrditi vrsta mleka od kojeg je isti izrađen.

Literatura

1. International action to avert the impending protein crisis OUN, New York 1968, No. E. 68. XIII. 2
2. Thompson, M. P., Tarssuk, N. P., Jenness, R., Lillevik, H. A., Ashworth, U. S., & Rose, D.: Nomenclature of the proteins of cow's milk — second revision. *J. Dairy Sci.* **48** 159 1965.
3. Thompson, M. P. & Pepper, L.: *J. Dairy Sci.* **47** (3) 293 1964.
4. Gordon, W. G. Basch, J. J. & Thompson, M. P.: *J. Dairy Sci.* **48** 1010 1965.
5. Peterson, R. F., Nauman, L. W. & Hamilton, D. F.: *J. Dairy Sci.* **49** (6) 601 1966.
6. Kalan, E. B., Greenberg, R., Walter, M. & Gordon, W.: *Biochem. Biophys. Research Communications* **16** 199 1964.
7. Schmidt, D. G. & Koops, J.: *Neth. Milk Dairy J.* **19** 63 1965 i XVII Intern. Dairy Congress E. 3 109 1966.
8. Aschaffenburg, R. & Dance, J.: *J. Dairy Res.* **35** 383 1968.
9. Assenat, L.: *Le lait* No. 467. 468 1967.

Dipl. inž. Marija Crnobori,
dipl. inž. Jelisava Gluvaković i
dipl. inž. Nevenka Pesić, Županja
»Pionir«, tvornica mlječnog praška

KEMIJSKO-FIZIČKA I BAKTERIOLOŠKA SVOJSTVA* MLIJEKA U PRAHU KAO POKAZATELJI NJEGOVE KVALITETE

Kvaliteta mlijeka u prahu određena je njezinim kemijskim, fizičkim i bakteriološkim svojstvima. U našoj zemlji, mlijeko u prahu koje se stavlja u promet mora ispunjavati u pogledu kvalitete uvjete koje propisuje Pravilnik o kvaliteti i Pravilnik o bakteriološkim uvjetima živežnih namirnica u prometu. Pored ovoga, zahtevi na kvalitetu mlijeka u prahu su veoma različiti i zavise o tome u koju svrhu je ono namijenjeno. Tako, mlijeko u prahu namijenjeno rekonstituciji mora imati gotovo idealnu topljivost, ono namijenjeno za preradu sladoleda pored topljivosti mora imati i dobru sposobnost bubrenja, za izradu jogurta mora imati dobru sposobnost koagulacije itd. Svi ovi zahtevi rezultat su kemijsko-fizičkih i bakterioloških svojstava mlijeka u prahu.

Imajući na umu navedene zahtjeve tržišta, naš laboratorij pratio je pored redovne kontrole procesa proizvodnje i neke kemijsko-fizičke i bakteriološke pokazatelje, koji također utiču na kvalitetu proizvoda. Kemijska ispitivanja

* Referat sa VII Seminara za mljekarsku industriju, 13—14. 2. 1969, Tehnološki fakultet, Zagreb.