

PRILOG POZNAVANJU POLIMORFIZMA KAZEINA U KRAVLJEM MLEKU*

Dragoslava MIŠIĆ i Dušica PETROVIĆ
Poljoprivredni fakultet, Beograd—Zemun

Proteini mleka privlače veliku pažnju mnogih istraživača već više decenija. Rezultati ovih ispitivanja koriste potpunijem upoznavanju proteina ili su od interesa za rešavanje drugih istraživačkih problema. Sa stanovišta ispitivanja proteina mleka poseban značaj pripada kazeinu koji predstavlja specifičan protein koji je količinski najviše zastupljen u mleku.

Za kazein se dugo smatralo da je belančevina homogenog sastava. Međutim, otkrivanjem elektroforetskih metoda za ispitivanje proteina ustanovljeno je da se kazein sastoji iz više svojih komponenata. **Prve elektroforetske nalaze izvršio je Mellander (10) 1939. godine**, kome je uspelo da razdvoji kazein na tri frakcije koje je označio sa α -, β - i γ -kazein. Ovi simboli zadržani su do danas. Kasniji radovi, koji su nastali sa usavršavanjem metoda i tehnike elektroforeze, potvrdili su prve rezultate Mellander-a i pružili nova saznanja o strukturi kazeina i osobinama pojedinih njegovih konstituenata. Tako su Zweig i Block (10) prvi papirnom elektroforezom izdvojili α - i β -kazein 1953. godine, Larson (4) je izvršio frakcionisanje α - i β -kazeina pomoću pokretljive granične elektroforeze 1957. godine, Lhandov (10) odredio učešće α -, β - i γ -kazeina u ukupnom kazeinu i dr. U daljim radovima istraživača među kojima treba pomenuti Cherbouliez-a, Waugh-a, von Hippel-a, Mc Meekin-a (4) i druge obraćena je pažnja ispitivanju pojedinih frakcija kazeina. Na osnovu dobivenih rezultata ustanovljeno je da ni α -kazein nije homogena frakcija, već predstavlja komponentu kazeina koja je označena kao α -kazein kompleks. Složeni α -kazein kompleks kao deo ukupnog kazeina sadrži α_s -, K- i λ -kazeine. α_s -kazein, kao deo α -kazein kompleksa takođe je sastavljen od frakcija od kojih α_{s1} -kazeini čine najveći deo. Druge frakcije α_s -kazeina α_{s2} i α_{s3} -kazeini takođe su elektroforetski konstatovane, ali do danas malo proučavane.

Pojedine frakcije kompleksa α -kazeina ispoljavaju karakteristične osobine koje su od značaja za ponašanje kazeina i vrlo važne u obradi i preradi mleka. Sve frakcije α_s -kazeina, a posebno α_{s1} -kazein, jer je najveći po količini, preci-

* Referat s XI. seminara za mljekarsku industriju, Tehnološki fakultet, Zagreb, 6—8. II 1973.

pitiraju u prisustvu kalcijumovih jona. Najvažniju ulogu za stabilizaciju ovih kazeina ima K-kazein koji je neosjetljiv na delovanje kalcijuma. U širem smislu K-kazein je frakcija koja stabilizuje kazeinsku micelu, pa je otuda vrlo važna i njegova količina u mleku.

K-kazein je konstituent α - i ukupnog kazeina koji podleže delovanju himozina u primarnoj akciji. Biohemijskim delovanjem sirila na K-kazein oslobađa se jedan njegov deo koji je rastvorljiv u vodi i prema tome prelazi u surutku. Rastvorljivi deo K-kazeina po sastavu je gliko-makro-peptid koji sadrži sijalnu kiselinu. Nerastvorljivi peptidni deo K-kazeina zadržava se u grušu i nazivan je K-para kazein. Ova saznanja značila su veliki doprinos razjašnjavanju biohemijskog delovanja sirila, za koje su do tada pokušavale da daju tumačenja mnoge teorije, ali sa manje uspeha.

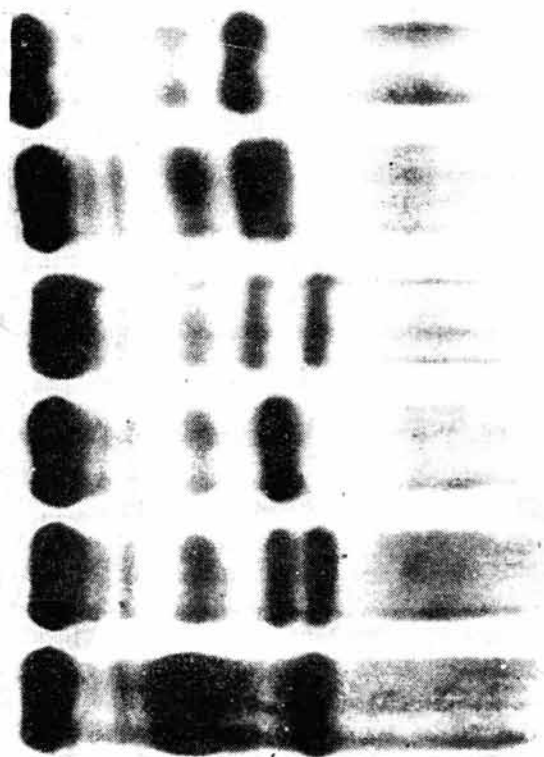
U literaturi još uvek nisu dovoljno definisani pojmovi **kazein-frakcija** pa se često koriste oba naziva za iste konstituente kazeina. Zbog toga bi bilo potrebno da se ovi pojmovi suštinski razgraniče.

Za kazeinske komponente je poznato da ispoljavaju tendenciju da obrazuju agregate, međusobno reaguju i formiraju kazeinske čestice. Uvođenjem elektroforeze na skrobnom i poliakrilamidnom gelu omogućeno je potpunije razdvajanje kazeina, što je do tada bilo znatno otežano s obzirom na osobine kazeinskih komponenata. Ovim metodama je postignuto da se kazeinski kompleks razdvoji na oko dvadeset konstituenata. Zahvaljujući ovim metodama uspelo je da se utvrdi da pojedini kazeini pokazuju i genetski polimorfizam. Polimorfizam pojedinih kazeina ispoljava se u pojavljivanju njihovih varijanata koje predstavljaju alele autosomatskog gena. Ove alele jedne frakcije mogu da se javljaju pojedinačno što je karakteristično za homozigote ili u parovima karakterističnim za heterozigote. Ispitivanjima se pokazalo da pojedine frakcije kazeina pokazuju genetske karakteristike koje se mogu smatrati posebnim odlikama pojedinih rasa. Polimorfizam kazeina mleka ispitivan je do sada kod izvesnih rasa.

Ovakvi podaci se nalaze u literaturi za keru rasu, džerzej, gernerzej, ajrširsku, manje za sivo-smeđe, za zebu goveče i neke druge rase.

Genetska heterogenost prvo je zapažena kod β -kazeina. Otkrio ju je Aschafenburg (2) a zatim istražavao Thompson (6) koji je ustanovio da su genetske forme β -kazeina rasno specifične i da se genske frekvencije varijanata razlikuju široko prema rasama govedi. β -kazein se pojavljuje u tri varijante kao β -kazein A, β -kazein B i β -kazein C, koje se javljaju pojedinačno ili u parovima u sledećim kombinacijama: A/A, B/B, C/C, A/B, A/C i B/C.

Prema podacima koje navodi Aschafenburg (3) i Thompson et al. (8) karakteristično je za keru rasu i severno britanske rase (ajršir i šorthorn) da imaju samo u svome mleku varijantu β -kazeina A, što ukazuje da su ove rase u svome postanku zajedničkog porekla. Kod holštajnske i džerzijske rase nađena je pored varijante β -kazein A i varijanta β -kazein B, ali sa malim brojem frekvencija kao homozigotna (B/B), a više u parovima heterozigota (A/B). Sve tri varijante β -kazeina A, B i C nađene su kod gernerzeja i sivo-smeđeg govečeta.



Sl. 1 Elektroforetski modeli na skrobnom gelu šest mogućih fenotipova β -kazeina. Modeli 1—6 su β - A, AB, AC, B, BC i C

Rad Thompson-a

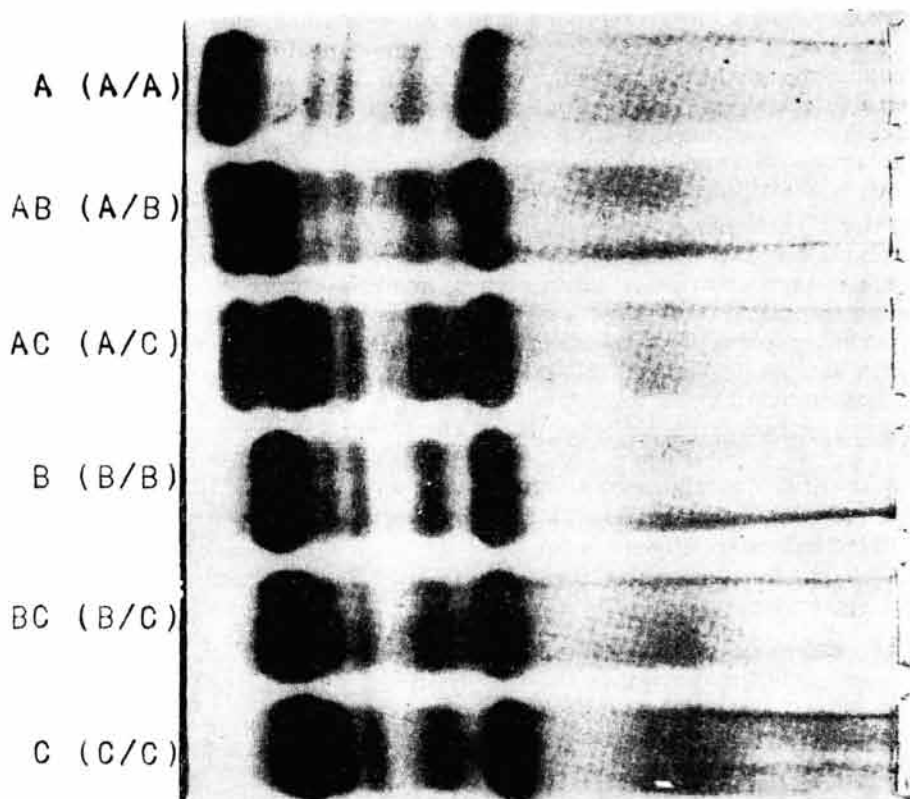
Kod izučavanja polimorfizma kazeina ustanovljeno je da varijante α_{s1} -kazeina pokazuju takođe genetske karakteristike i rasnu specifičnost. Ovaj kazein se pojavljuje takođe u tri varijante koje su kao i kod β -kazeina označene simbolima A, B i C. One mogu da budu pojedinačne ili u parovima (A/A, B/B, C/C, A/B, A/C i B/C). Na osnovu radova Aschaffenburg-a (3), Thompsona et al. (5 i 6) i drugih, zapaža se da je kod β -kazeina dominantna varijanta A i da se više javlja od ostalih varijanata, dok je kod α_{s1} -kazeina dominantna varijanta B jer se javlja sa najvećim brojem frekvencija. Varijanta α_{s1} -A je vrlo retka naročito u homozigotima kod većine rasa.

Prema podacima Aschaffenburg-a ajršir i šorthorn rase sadrže u svome mleku samo homozigotnu varijantu α_{s1} -kazeina α_{s1} -kazein B; gernerzej, džerzej i sivo-smeđe α_{s1} -kazein B i C; dok se kod holštajnske rase pored B i C, može naći mada vrlo retko i varijanta A.

Frakcije α_{s1} i α_{s2} nisu do sada genetski ispitivani. Neelin 1964 (8), a zatim Aschaffenburg (1) su pronašli da K-kazein može da se javlja takođe u dve i tri varijante koje su kao i kod prethodnih genetskih oblika kazeina označene simbolima A, B i C. Ispitivanjem pojedinih rasa nije ustanovljena određena pravil-

nost u pojavljivanju genetskih varijanata, ali se na osnovu podataka može zaključiti da kod holštajnske rase i gernzeja preovlađuje homozigotni tip A/A nad heterozigotima A/B. Tip B/B preovlađuje nad heterozigotima A/B kod džerzeja, a heterozigoti su najčešći kod sivo-smeđeg govečeta.

Na osnovu dobivenih rezultata pojedinih autora (3, 5, 8) može se zaključiti da se genetske varijante različitih kazeina u mleku pojedinih rasa ne pojavljuju:



Rad Thompson-a

Sl. 2 — Elektroforetski modeli kazeina izolovanog iz mleka od šest krava. Elektroforeza na skrobnom gelu. Svih šest mogućih tipova α_{s1} -kazeina su prikazani i nalaze se pored slovnih znakova. Jasno zatamljene trake na desnoj strani, slabije pokretljivosti su β -kazeini.

istim redom — što znači, npr. da homozigotna varijanta β -kazeina ne uslovljava istu varijantu α_{s1} -kazeina ili K-kazeina. Međutim, to ne znači da između varijanata ne postoji izvestan korelacioni odnos. Ovaj odnos između varijanata α_{s1} - i β -kazeina ustanovili su Thompson et al. (8) obradom brojnih podataka o genetskim tipovima različitih kazeina za više rasa, i predstavili sledećom raspodelom:

		β -kazein		
		A	AB	B
α_{s1} -kazein	B	47	45	19
	BC	25	33	—
	C	22	—	—

Otkrivanje varijanata pojedinih proteina vrši se prema njihovom položaju koji zauzimaju na elektroforetskom gelu i prema relativnoj pokretljivosti. Karakteristično je za sve genetske varijante jednog proteina, odnosno frakcije da se međusobno razlikuju prema pokretljivosti. Ispitivanjem varijanata jednog kazeina ustanovljeno je da su one veoma slične po svome sastavu, ali da male razlike kao što su zamena čak i jedne amino kiseline, drugačiji redosled vezivanja amino kiselina u lancu, prisustvo terminalne grupe imaju uticaja na njihovu pokretljivost kao i na osobine.

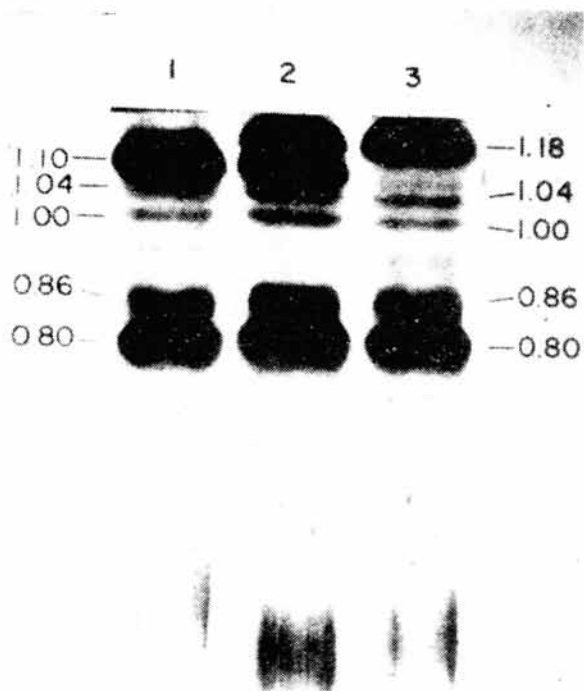
Prema pozicijama koje zauzimaju na elektroforetskom gelu na najvećoj udaljenosti od startne linije postavljenog uzorka, izdvaja se prvo, kao frakcija najveće pokretljivosti, α_{s1} -kazein sa svojim varijantama A, B i C, od kojih C zauzima najniže mesto. Izračunavanjem relativne pokretljivosti — udaljenosti s pomoću referense koja se određuje prema Baldwin-u (1) nalazi se da svaka od ovih varijanata zauzima uvek isto mesto i postiže istu vrednost pri određenom postupku elektroforeze. Ove vrednosti su utvrđene za elektroforezu na skrobnom i poliakrilamidnom gelu. Određivanje ovih vrednosti predstavlja veliku pomoć u identifikovanju pojedinih frakcija i njihovih varijanata.

β -kazeinske varijante migriraju sporije od α_{s1} -kazeina na elektroforetskom gelu i redaju se istim redom, varijanta C zauzima najniže mesto.

Relativna pokretljivost za α_{s1} - i β -kazeinske varijante data je u tabeli prema Aschaffenburg-u na skrobnom gelu (SGE) i prema Thompson-u na poliakrilamid elektroforezi (PAE).

Varijanta	SGE	PAE
α_{s1} -A	1,18	1,22
α_{s1} -B	1,10	1,13
α_{s1} -C	1,07	1,10
α_{s1} -?	1,04	1,03
Referensna zona	1,00	1,00
(?)	0,86	0,72
β -A	0,80	0,65
β -B	0,76	0,61
β -C	0,70	0,54

K-kazein migrira od svih kazeinskih frakcija najsporije i zauzima najbliže mesto startnoj liniji postavljenog uzorka. Njegova molekulska težina izračunata na osnovu monomera koji ulaze u njegovu makromolekulu u odnosu na sve kazeinske frakcije je najveća i iznosi prema Sweisgood-u oko 60.000.



Sl. 3 Elektroforetski modeli na skrobnom gelu sa numeričkim zonama prema sistemu Wake-a i Baldwin-a. Model 1 je α_{s1} -B, tipovan iz celog kazeina; 2, α_{s1} -AB; 3, α_{s1} -A.

Zaključak

Izučavanje genetskog polimorfizma kazeinskih frakcija značajno je sa genetskog i biohemijskog gledišta i od interesa za upoznavanje porekla i afiniteta rasa.

Postojanje kazeinskih varijanata ima uticaja na osobine mleka. Naročito varijante α_{s1} i K-kazeina mogu biti uzrok različitim osobinama mleka u pogledu sposobnosti zgrušavanja, formiranja gruša i kvaliteta dobijenog gruša. Za probleme ove vrste svakako su od interesa proučavanja genetskih varijanata pojedinih kazeina u smislu ocenjivanja tehnološke vrednosti mleka.

Literatura

1. Aschaffenburg, R. (1964): Phenotyping by direct polyacrylamidegel electrophoresis of whole milk. *Biochim. et Biophys. Acta* **82**: 188.
2. Aschaffenburg, R. & Thyman, M. (1965): Simultaneous phenotyping procedure for the principal proteins of cow's milk. *J. D. Sci.* **48**: 1524.
3. Aschaffenburg, R. (1960): Variants of milk proteins and their pattern of inheritance. *J. D. Sci.* **48**: 128.
4. Ernstrom, C. A., Hollis, R. A., Brunner, J. R. & Larson, B. (1960): Nomenclature of the proteins of bovine milk. First revision. *J. D. Sci.* **43**: 901.