

Utjecaj genetskih varijanti kapa kazeina na koagulacijska svojstva mlijeka*

SNOJ, A., apsolvent, MEĐUGORAC, I., dipl. inž., mr. ROGELJ Irena, dr. DOVČ, P. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, GRAML, R., dipl. inž., München

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper
Prispjelo: 20. 11. 1991.

UDK: 637.047/636.237.1

Sažetak

Elektroforetskim razdvajanjem bjelančevina mlijeka u alkalnom škrobnom gelu identificirali smo genotip kapa kazeina za 117 krava sivosmede pasmine. Osim genetskih varijanata A i B, na kapa kazeinskom lokusu našli smo i varijantu C. Proučavali smo utjecaj genotipa kapa kazeina na koagulacijska svojstva mlijeka, postotak bjelančevina u mlijeku i postotak mlječne masti. Utjecaj genotipa kapa kazeina bio je visoko signifikantan na čvrstoću grušā (a_{30}). Izračunali smo regresione koeficijente koagulacionih svojstava r , K_{20} i a_{30} za postotak proteina u mlijeku i postotak mlječne masti.

Uvod

Proteini mlijeka su zbog svoga gospodarskog značaja već dulje vrijeme predmet intenzivnih istraživanja, koja se bave ne samo njihovim kemijskim sastavom nego i genetskim mehanizmima koji upravljaju njihovom sintezom. Mlijeko je značajan izvor proteina animalnog porijekla u ljudskoj prehrani. Potrošnji konzumnog mlijeka postavljene su određene granice i u većini evropskih država ne može se računati sa znatnim povećanjem potrošnje. Sasvim je drugačija situacija s mlječnim proizvodima, prije svega s potrošnjom sira. Stoga se sve češće postavljaju zahtjevi za prosuđivanje kvalitete, i to ne samo količine proteina u mlijeku nego i njihovih tehnoloških svojstava. Za sirsarsku industriju posebni značaj ima koagulacijska sposobnost proteina mlijeka, koja može bitno utjecati na gospodarski učinak proizvodnje sira. Iz literature su poznate tvrdnje da je utjecaj genetskih varijanti pojedinih laktoproteina na koagulacijska svojstva signifikantan, pa uz primjenu nekih tehnologija, prije svega pri proizvodnji tvrdih sireva, može iznositi čak 8—10% randmana sira.

Proteini mlijeka su, zbog malog broja lokusa, koji utječu na njihovu sintezu, često predmet genetskih istraživanja, pa spadaju gotovo među najbolje proučene genske komplekse domaćih životinja. Sinteza kazeina, koji sačinjavaju 80% proteinske frakcije u mlijeku goveda pod kontrolom gena, koji zauzima regiju vjerojatno veću od 100 kbp, što je, pri upotrebi današnje metodike u molekularnoj genetici razmjerno teško savladivo područje. Klasične studije vezanja gena (Grosclaude et al., 1978) i novija istraživanja uz upotrebu in situ hibridizacija ukazuju na pravilnost domišljaja da su sva četiri gena kazeinskih frakcija (α_{s1} —, α_{s2} , β — i kapa kazein) locirani na jednom kromosomu (Gupta, et al., 1982; Mercier, et al., 1985).

* Rad je iznesen na 9. jugoslavenskom Međunarodnom simpoziju "Suvremena proizvodnja i prerada mlijeka" u Potorožu, 1990.

Naslov originala na slovenskom: "Vpliv genetskih variant kapa kazeina na koagulacijske lastnosti mleka".
Prijevod sa slovenskog na hrvatski jezik: Matej Markeš, dipl. inž.

Nažalost, do sada još nije uspjelo pomoću molekularnog kloniranja dokazati povezanost između pojedinih kazeinskih lokusa, i na molekularnoj razini (Bonsing, et. al., 1987). Pored mozaične strukture eukariotskih gena (ekson/intron) dodatni je problem pri tom radu i opsežnost nekodogenih regija među pojedinim lokusima.

Za identifikaciju genetskih varijanata laktoproteina upotrebljavamo danas na proteinskom nivou prije svega različite varijante elektroforetskih tehnika (uključujući polimorfizam restriksijskih fragmenata genomične DNA).

Materijal i metode

U ispitivanje je bilo uključeno 117 krava sivosmede pasmine, pri čemu smo nastojali izabrati uzorak životinje što bolje izjednačen, s obzirom na starost, fazu laktacije i sezonski utjecaj.

Uzorke mlijeka smo prikupljali tijekom dva mjeseca za jutarnje mužnje na osam pogona. Uzorke smo čuvali (4°C) i najkasnije u toku četiri sata u njima odredili količinu proteina, količinu masti i pH vrijednost. Elektroforetku analizu uzoraka obavili smo slijedećeg dana, a do tada smo uzorke čuvali (20°C).

Analitičke metode

Količinu proteina i mlječne masti u uzorcima odredili smo pomoću infracrvene spektroskopije aparatom Milko-Scan 104. Mjerenje pH obavili smo digitalnim elektronskim pH-metrom sa staklenom elektrodom uz točnost ± 0,01 jedinice. Koagulacijska svojstva mlijeka odredili smo Formografom (Foss Electric & Co. 1980.). Neposredno prije analize zagrijali smo 10 ml uzorka do 35°C i dodali 200 µl 2,5 postotne otopine Hansenovog enzima. Pratili smo slijedeće koagulacijske parametre:

- trajanje koagulacije (r);
- brzina nastajanja gruš (K₂₀);
- konzistencija gruš (a₃₀).

Elektroforetsko izdvajanje laktoproteina izveli smo na horizontalnoj elektroforetskoj aparaturi vlastite izrade u alkalnom škrobnom gelu (Aschaffenburg et. al., 1968). Upotrebljavali smo boratni elektrodni pufer (0,3 M H₂BO₄, 0,1 M NaOH). Uzorcima obranog mlijeka dodali smo 1,5% merkaptotetanol. Elektroforeza je trajala 22 sata pri 200 V, 24 A i 4°C. Gel smo bojili 2—2,5 sata bojom Amido Black 10 B i Nigrozinom u 84% metanolu i 16% octenoj kiselini, a odbojili u etanolu, octenoj kiselini i vodi u odnosu 5 : 1 : 5.

Računska obrada podataka bila je obavljena programskim paketom za miješani model najmanjih kvadrata (LSMLMW). Upotrijebili smo dva statistička modela:

$$I Y_{nk} = u_n + F_i - G_j + b_1(pH_k - pH) + b_2(P_k - P) + b_3(P_k - P)^2 + c$$

gdje su:

Y_{nk} = ovisne varijable r, K₂₀ i a₃₀ (n = 1, 2, 3)

u_n = srednja vrijednost varijabli r, K₂₀ i a₃₀ (n = 1, 2, 3)

F_i = utjecaj i-toga pogona na r, K₂₀ i a₃₀ (i = 1, 2...8)

G_j = utjecaj j-toga genotipa na r, K₂₀ i a₃₀ (j = 1, 2, 3, 4)

- b_1 = linearni parcijalni regresijski koeficijent utjecaja pH vrijednosti na r , K_{20} i a_{30}
 b_2 = linearni regresijski koeficijent utjecaja % proteina na r , K_{20} i a_{30}
 b_3 = kvadratni parcijalni regresijski koeficijent utjecaja % proteina na r , K_{20} i a_{30}
 C = suma u modelu neobjašnjenih utjecaja

$$II Y_n = u_n + F_i + G_j + c$$

gdje su:

- Y_n = zavisne varijable: % proteina i % masti ($n = 1, 2$)
 u_n = prosječne vrijednosti % proteina i % masti ($n = 1, 2$)
 F_i = utjecaj i-toga pogona na % proteina i % mlječne masti ($i = 1, 2, \dots, 8$)
 G_j = utjecaj j-toga genotipa na % proteina i % masti ($j = 1, 2, 3, 4$)
 C = suma u modelu neobjašnjenih utjecaja

Signifikantnost LSQ konstanti pojedinih genetskih varijanata kapa kazeina bila je testirana. Signifikantnost utjecaja konstanti i regresija testirane su F-testom

Rezultati

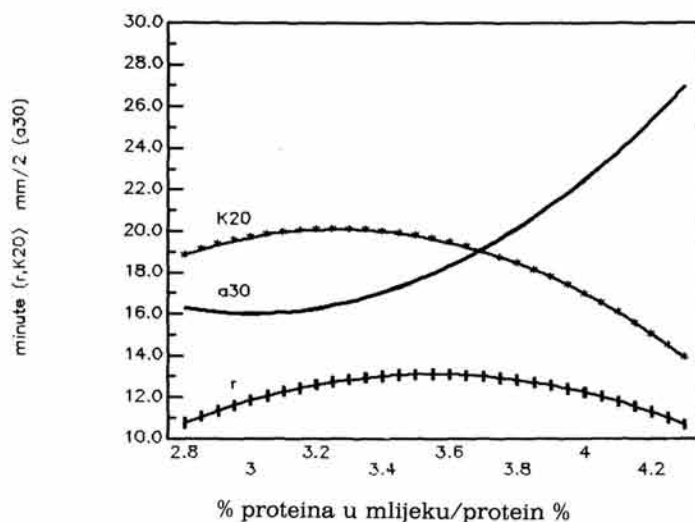
Uzorke mlijeka po genotipu kapa kazeina razdijelili smo u četiri skupine i usporedili ih s obzirom na koagulacijska svojstva, % proteina i % mlječne masti. Rezultati su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. Utjecaj genotipova kapa kazeina na koagulacijska svojstva, količinu proteina i postotak mlječne masti u uzorku

Table 1. Influence of kappa casein genotypes on coagulation properties, protein and fat percentage in sample

N	AA		AB		AC		CC		F	P
	82		9		16		10			
	x	s	x	s	x	s	x	s		
r (min)	12,66 ±	0,39	12,79 ±	1,10	13,58 ±	0,86	13,12 ±	1,09	0,42	0,74
K_{20} (min)	18,43 ±	0,65	20,40 ±	1,84	21,07 ±	1,46	19,92 ±	1,69	1,54	0,21
a_{30} (mm)	40,90 ±	1,23	27,23 ±	3,46	31,81 ±	2,76	37,14 ±	3,19	8,37	0,0001
% prot.	3,40 ±	0,04	3,39 ±	0,12	3,31 ±	0,08	3,26 ±	0,11	0,60	0,62
% masti	2,61 ±	0,41	2,98 ±	0,43	2,91 ±	0,23	2,66 ±	0,38	0,48	0,70

Za svojstva r , K_{20} i a_{30} izračunali smo regresije prema postotku kazeina u mlijeku. Regresione krivulje prikazane su na Slici 1.



Slika 1. Regresijske krivulje za svojstva r , K_{20} i a_{30} u ovisnosti o % proteina u mlijeku P za pojedina svojstva je: $P_r = 0,0410$, $P_{K_{20}} = 0,0918$, $P_{a_{30}} = 0,0431$

Fig. 1. Regression curves for r , K_{20} and a_{30} depending on milk protein percentage. P values for r , K_{20} and a_{30} are 0.0410, 0.0918 and 0.0431 respectively

Diskusija

Osim genetskih varijanti A i B na kapa kazeinskom lokusu u našem eksperimentu našli smo i genetsku varijantu C za koju je karakteristična veća elektroforetska mobilnost, nego za varijantu A. Osim tih triju varijanata u nekim su populacijama prisutne i varijanta D, koja bi mogla biti identična s varijantom C, te varijanta E (Seibert, et. al., et. al., 1987; Erhardt, 1989.). Zanimljivo je da se varijante C i E međusobno isključuju i do sada još nisu bile dokazane u istoj populaciji. Na osnovi toga, u literaturi je bila predlagana podjela goveda u dvije skupine: pasmine koje imaju kapa kazein tipa A, B, C i pasmine koje imaju kapa kazein tipa A, B, E. Prisustvo varijante C potvrđeno je i u talijanskim populacijama sivosmedeg i tirolskog sivog goveda (Distasio et. al., 1979), te u njemačkim populacijama smeđeg i svijetlo šarenog goveda. (Seibert, et. al., 1987; Erhardt, 1989.). U našem eksperimentu je frekvencija genotipa kapa kazeina CC iznenađujuće visoka (0,085), a također i frekvencija genotipa kapa kazeina AA (0,0701), koja se približava ocjenama frekvencije toga genotipa u populacijama crno-bijelog goveda, navedenima u literaturi (Erhardt, 1989). Na osnovi identifikacijskih genotipova kapa kazeina možemo uvrstiti proučavanu populaciju smeđeg goveda u skupinu pasmina goveda s A, B, C tipom kapa kazeina.

Signifikantne razlike smo ustanovili za svojstva a_{30} među genotipovima AA i AB, AA i Ac te Ac i CC. Ti podaci predstavljaju početnu informaciju o utjecaju genetske varijante kapa kazeina C na koagulacijska svojstva mlijeka. Zanimljiv je i utjecaj količine proteina na čvrstoću gruš (a₃₀). Značajan je bio utjecaj pogona na sva ispitivana svojstva, kojega možemo razlučiti na utjecaj prehrane (prije svega utjecaj na količinu citrata, Ca i P te posredno na proučavana svojstva) i zdravstveno stanje (latentni mastitis) i s njim povezanom ravnotežom minerala i degradacijom proteina. Utjecaj pH vrijednosti na koagulacijska svojstva je već dulje vremena poznat i bio je očekivan. Slabiji rezultati za koagulacijska svojstva genotipa AB, koji su po literaturnim podacima morali biti povoljniji od genetskog tipa AA, vjerojatno su posljedica djelovanja drugih laktoproteinskih lokusa, koje u ovom eksperimentu nismo identificirali, pa njihov utjecaj ne možemo ocijeniti. Na osnovi analize možemo zaključiti da je utjecaj kapa kazeinskog lokusa na koagulacijska svojstva prisutan, ali nije tako velik da bi prekrrio sve ostale genetske ambijetalne utjecaje na ta svojstva.

INFLUENCE OF GENETIC VARIANTS OF KAPPA CASEIN ON RHEOLOGICAL MILK PROPERTIES

Summary

Kappa casein genotypes were identified for 117 Brown cows using alkaline starch gel electrophoresis. In addition to genetic variants A and B the third variant C was found on the kappa casein locus. The influence of kappa casein genotype on coagulation properties of milk, and protein and fat percentage was studied. The influence of kappa casein genotype on curd firmness (a_{30}) was highly significant. The regression coefficients for the properties r , K_{20} and a_{30} on protein and fat percentage in milk were calculated.

Literatura

- ACHAFFENBURG, R. i W. MICHALAK (1968): *J. Dairy Sci.* **51**, 1849.
 BONSING, J., A. G. MACKINI LAY (1987): *J. of Dairy Res.* **54**, 447.
 DISTASIO, L., P. MERLIN (1979): *Rivista di Zootecnica e Veterinaria* **7**, 64.
 ERHARDT, G. (1989): *J. Anim. Breed. Genet.* **106**, 225.
 GRAMI, R., J. BUCHBERGER i F. PIRCHNER (1988): *Zeuchungskunde* **60** (1), 11.
 GROSCLAUDE, F., P. JOURDIER, i M. F. MAHE (1978): *Ann. Genet. Sel. Anim.* **10** (3), 313.
 GUPTA, P., J. M. ROSEN, P. D'EUSTACHIO, i F. H. RUDDLE (1982): *J. Cell Biol.* **93**, 199.
 LOSI, G. G. B. CASTANGETTI, D. MORINI, P. RESMINI, G. VOLONTERIO i P. MARIANI (1982): *L'industria del latte* **18** (1), 13.
 MERCIER, J. C., P. GAYE, S. SOULIER, D. HUE-DELAHAIE, J. L. VILOTTE (1985): *Biochimie* **67**, 959.
 MORINI, D., G. LOSI, G. B. CASTAGNETI i P. MARIANI (1979): *Sci. Teen. Latt.* **30**, 243.
 SEIBERT, B. G. ERHARDT, i B. SENFT (1987): *Anim. Genet.* **18**, 269.