

# Polimorfizm $\alpha_{s1}$ kazeiny w mleku kóz

KRYSTYNA KRÓLIKOWSKA\*, ANNA NIEDZIELSKA\*, MAREK KWINKOWSKI\*, WIESŁAW KACA\*\*

\*Zakład Mikrobiologii Instytutu Biologii Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Akademii Świętokrzyskiej, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce

\*\*Pracownia Struktur Komórkowych Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN, ul. Lodowa 106, 92-232 Łódź

Królikowska K., Niedzielska A., Kwinkowski M., Kaca W.

## Goat milk $\alpha_{s1}$ casein polymorphism

### Summary

Genetic polymorphism of casein  $\alpha_{s1}$  present in goat milk is essential for its application in industry, mainly for cheese production. There are 14 alleles which synthesize seven variants of casein  $\alpha_{s1}$ . These variants are designated as A, B, C, D, E, F and O. Variants A, B and C are defined as "strong" (high level of casein synthesis), E as "medium", and variants D and F as "weak". Variant O means no synthesis of casein  $\alpha_{s1}$  in heterozygotic animals. Casein micelle diameter and the amount of protein, fat and calcium in the milk from goats with different gene variants differ. The best variant for the cheese production is type AA. Firmness-texture of cheese produced from milk from goats with AA genotype is better then from others. The cheese from AA milk also has a weak "goat" flavor.

The aim of the paper was to determine distribution of  $\alpha_{s1}$  casein allotypes in the milk from Polish "white" bred goats. Casein isolated from 100 samples of milk obtained from goats at a goat farm in Oblęgorek near Kielce (Poland) was analyzed by means of polyacrylamide urinal gel electrophoresis. Casein variants were assigned to samples by comparing their electrophoregrams with electrophoregrams of standard caseins. It was discovered that in the 86 analyzed samples, most of them had "strong" variants (30% BB, 30% CC and 25% of AA). The "medium" variant E was present in 5% of the samples. These data are consistent with casein polymorphism analysis performed in other Polish and European laboratories. The positive effect of raising and selecting of Polish "white" bred goats was demonstrated.

**Keywords:** casein, genetic polymorphism, and goat

Obecność licznych wariantów genetycznych kazeiny  $\alpha_{s1}$  w mleku kozim jest efektem mutacji genu kodującego to białko. Podstawienie, delecja i insercja par nukleotydów w egzonach genu kodującego kazeinę  $\alpha_{s1}$  powoduje różnorodność alleli odpowiedzialnych za jej polimorfizm.

W końcu lat osiemdziesiątych Brignon i wsp. (3, 4) ustalili sekwencję aminokwasów w białku kazeiny  $\alpha_{s1}$ . Strukturę genu kodującego tę kazeinę opisał w 1992 r. Leroux i wsp. (8). Brignon i wsp. (3, 4) uważają, że w rozwoju filogenetycznym był obecny hipotetyczny allel  $B_1$  (x), z którego w wyniku mutacji powstały allele  $B_2$ ,  $B_3$ , A, C. Różnią się one od  $B_1$  (x) delecją lub podstawieniem pojedynczych nukleotydów. Allele D, F, G są wynikiem delecji kilkunastu par nukleotydów. Natomiast allel E jest skutkiem insercji 458 par nukleotydów w egzonie 19 genu kodującego kazeinę  $\alpha_{s1}$ .

W locus kazeiny  $\alpha_{s1}$  występuje 14 alleli odpowiedzialnych za syntezę siedmiu wariantów kazeiny: A, B, C, D, E, F i O. Allele „mocne”: A, B, C powodują wysoki poziom syntezy kazeiny  $\alpha_{s1}$  (3,6 g/l), allel E odpowiada za średni poziom syntezy (1,6 g/l), allele D, F związane są z zawartością około 0,6 g/l, obecność allelu O – to brak kazeiny w homozygotach (5). Analiza fizykochemiczna mleka pochodzącego od kóz z różnymi allotypami kazeiny  $\alpha_{s1}$  wykazała ponadto zróżnicowanie poziomu syntezy kazeiny, zawartości tłuszczu,

wapnia i białka całkowitego, oraz średnicy micelli kazeinowych. W mleku kóz o genotypie A/A parametry te były korzystniejsze z punktu widzenia technologicznego (serowarstwo) w porównaniu do genotypów E/E i F/F. Znaczące różnice wykazano w szybkości wiązania skrzepu i jego jakości, która zmieniała się następująco: A/A > E/E > F/F. Czas koagulacji mleka od kóz z genotypem A/A był pośredni w stosunku do mleka genotypu E/E (dłuższy) i genotypu F/F (krótszy). Wydajność produkowanych serów była wyższa z mleka o genotypie A/A, średnia E/E, najniższa F/F. Sery A/A charakteryzowały się wyższą plastycznością, spoistością i sprężystością. Ponadto tzw. kozi zapach był mniej wyczuwalny w serze z mleka genotypu A/A niż w pozostałych serach (6, 10, 14). W efekcie mleko od kóz z różnymi allotypami kazeiny  $\alpha_{s1}$  różni się jakością i możliwościami wykorzystania w produkcji sera.

Najbardziej rozpowszechnione w Polsce i preferowane do hodowli są kozy polskie białe i barwne uszlachetnione. Kozy tzw. rasy polska uszlachetniona powstały w wyniku krzyżowania przed 1990 r. rodzimych kóz z rasą saaneńską i kolorowymi niemieckimi, sprowadzonymi głównie z byłej Czechosłowacji i NRD. Obecnie importuje się w celach hodowlanych głównie kozy rasy saaneńskiej i alpejskiej pochodzące z Francji, próbując doskonalić wydajność i właściwości technologiczne mleka rodzimych zwierząt (14).

Celem badań było określenie częstości występowania allotypów  $\alpha_{S1}$  kazeiny w mleku kóz rasy polska biała uszlachetniona.

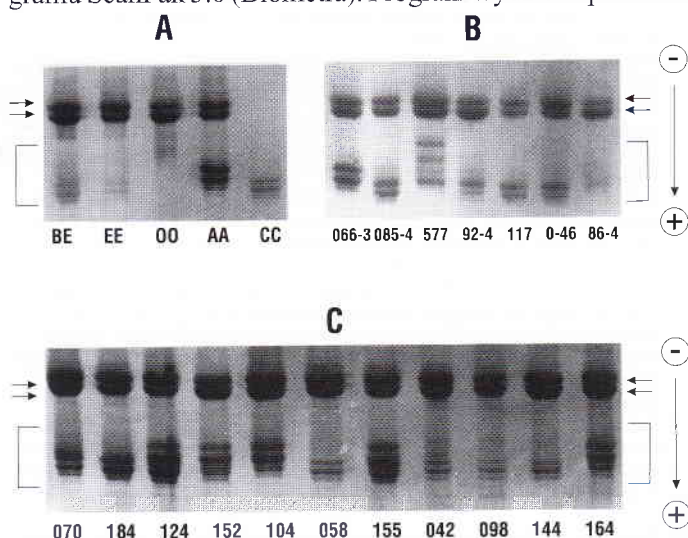
### Material i metody

Stosowane odczynniki: mocznik, akrylamid, N-N'-metyleno-bis-akrylamid, Tris, TEMED, merkaptioetanol (Serva); kwas solny, kwas octowy, kwas cytrynowy, kwas borowy, wodorotlenek sodu, izopropanol (POCh); Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma).

Badaniami objęto stado kóz rasy polska biała uszlachetniona hodowanych w farmie w Oblęgorku k. Kielc. Badane kozy były pod kontrolą Polskiego Związku Hodowców. Badano mleko od 100 kóz.

Mleko odtuszczone otrzymywano przez wirowanie mleka pełnego w 4°C, 20 minut przy 2000×g. Frakcje kazeiny z mleka odtuszczonego uzyskiwano wytrącając je 0,1 M roztworem Hcl (4 ml mleka z dodatkiem 3 ml 0,1 M Hcl wirowano 10 minut przy 1000×g); po dwukrotnym płukaniu wodą destylowaną kazeiny rozpuszczano w 7 M roztworze mocznika i zawieszano w roztworze Tris-cytrynian o pH 8,6. Elektroforezę wykonywano w poziomych żelach poliakrylamidowych z mocznikiem przy pH 8,6 wg Boulanger i wsp. (2) oraz Grosclaude i wsp. (5). Jako buforu elektrodowego używano buforu boranowego o pH 8,9. Elektroforezę przeprowadzano w temperaturze pokojowej, z chłodzeniem płyty wodą bieżącą, przez 3 godziny, przy natężeniu prądu 40 mA i napięciu 600 V. Po zakończeniu elektroforezy żełe barwiono (Coomassie Brilliant Blue: 0,05% roztwór przez 1 godzinę, a następnie 0,0035% roztwór przez 24 godziny), odbarwiano 10% wodnym roztworem kwasu octowego i fotografowano. Rozdziały próbek mleka i frakcji kazeiny powtarzano kilkakrotnie.

Zdjęcia poddano analizie komputerowej: skanowano je do postaci pliku typu TIFF i przetwarzano za pomocą programu ScanPak 3.0 (Biometra). Program wydzielał poszczególne



Ryc. 1. Elektroforegramy preparatów wzorcowych kazein (A) oraz preparatów kazein z badanych próbek mleka (B, C) rozdzielanych w pH 8,6 w 16% żelu poliakrylamidowym z 7M mocznikiem. Oznaczenia: litery – typ wzorcowej kazeiny, liczby – numer próbki mleka, strzałki – położenie pasm kazeiny  $\beta$ , klamry – położenie pasm kazeiny  $\alpha_{S1}$ . Strzałką i symbolami „+” i „-” z boku elektroforegramów zaznaczono kierunek przepływu prądu w czasie elektroforezy.

gólne kanały i densytometrował je. Dalsza analiza densytogramów polegała na określeniu mobilności elektroforetycznej białek (jako odnośnik przyjęto położenie pasm kazeiny  $\beta$ ), oraz identyfikacji typu kazeiny dokonywanej przez porównanie intensywności pasm i ich mobilności z intensywnością i mobilnością pasm obecnych w elektroforegramach preparatów wzorcowych kazeiny  $\alpha_{S1}$  (AA, BE, CC, EE i OO) (ryc. 1A).

### Wyniki i omówienie

Analizie poddano 86 elektroforegramów, otrzymanych w wyniku elektroforezy próbek kazeiny wytrąconych z odtuszczonego mleka. Za podstawę analizy przyjęto własne rozdziały elektroforetyczne wariantów wzorcowych kazeiny (ryc. 1A). Stwierdzono, że we frakcji  $\alpha_{S1}$  kazeiny występuje polimorfizm (ryc. 1B, 1C). Zidentyfikowano allotyp kazeiny w 83 próbkach (68 w sposób pewny, 15 niepewny), w trzech próbkach allotypu nie udało się zidentyfikować. Zestawienie wyników przedstawiono w tab. 1, zaś podsumowanie w tab. 2.

Tab. 1. Zestawienie typów alleli kazeiny  $\alpha_{S1}$  w próbkach mleka kóz tzw. rasy polska biała, uszlachetniona

Nr próbki	Typ	Uwagi	Nr próbki	Typ	Uwagi	Nr próbki	Typ	Uwagi
004	XX	?	095	EX	?	142	BB	
013	BB		096	AB	?	145	CC	?
028	BB		096-4	BX	?	147	AA	
042	CC		098	CC		147-5	AA	
0-46	BB		099	CC		148	AA	
046-6-69	BB		099-4	CC		149	AA	
052	BB		099-4-69	BB	?	152	AA	
054	AX	?	101	CC		152-5-69	AA	
055	CC		102	CC		155	AA	
056	AA		104	AA		156	CC	
056-3	AA		105	CC	?	158	CC	
057	BB		109	CC		158-5	CC	
058	CC		110	CC		159-5	BX	?
065	AA		112	BB		160	BB	
066	AA		114	CC		160-5	CC	
066-3	AA		114-4	CC		162	AA	
068	CC		117	BB		164	AA	
070	BB		120	CC	?	169	BB	
074	CC		120-4	AA		169-5	CC	
074-3	CX	?	121	OO	?	169-5-69	CC	
075	BB		121-16	BB		170	EX	?
084	BB		124	AA		176-5-69	AA	
085	BB		125	EX	?	178-5	BB	
085-4	BB		127	BB		182	AA	
086-4	EX	?	127-16	BB		184	BB	
090	CC		128	BB		188	BB	
092	AA		129	BB		577	XX	?
092-4	AX	?	140	AA		586	CC	
094	BB		141	XX	?			

Objaśnienia: X – niezidentyfikowany allel, ? – wynik niepewny

Uzyskane wyniki wskazują, że 80% kóz badanych posiadało wariant A, B lub C kazeiny. Najczęściej występowały warianty B (w ok. 30% całej badanej populacji), C (w ok. 30%) oraz A (w ok. 25%). Możliwość oznaczenia heterozygot była ograniczona, przy czym nie udało się określić drugiego allelu. Ogółem zidentyfikowano 8 próbek jako heterozygoty, lecz wyniki te uznano za niepewne. Obecności słabych wariantów D nie stwierdzono. Częstość występowania wariantów średnich E była niska (typ EX – gdzie X oznacza, że drugi allel był nieokreślony – stwierdzono w 4 próbkach). Być może część próbek, których wariant kazeiny zidentyfikowano jako B (najliczniej obecny w mleku badanych kóz) w rzeczywistości jest wariantem E, gdyż oba warianty tej kazeiny mają tę samą ruchliwość elektroforetyczną (4).

Po tym jak udowodniono na początku lat 90-tych, że genetyczne warianty kazeiny w zasadniczy sposób wpływają na skład chemiczny i właściwości mleka koziego zaczęto stosować metody wczesnego typowania zwierząt charakteryzujących się korzystniejszym genotypem, np. we Francji stwierdzono, że w populacji kóz saaneńskich i alpejskich odsetek takich zwierząt nie przekraczał 20-25% (12). Podobnie u kóz rasy saaneńskiej najliczniejsze były homozygoty EE – 36%, ale licznie występowały także heterozygoty EE, AF – powyżej 40% (9).

W Polsce wykazano, że w krajowym pogłowie kóz jest znaczący odsetek zwierząt mających „mocne” warianty kazeiny  $\alpha_{S1}$  (13). Ryniewicz i Krzyżewski przedstawili wyniki badań mleka pochodzącego od 100 polskich kóz uznanych za reprezentatywną grupę pogłowia krajowego. Wykazali oni, że u 69% badanego stada obecne są mocne warianty  $\alpha_{S1}$  kazeiny, głównie B lub C, wariantu A nie stwierdzono; u 21% kóz zidentyfikowano w mleku wariant E, pozostałe 10% kóz to prawdopodobnie zwierzęta z kazeiną typu D (14). Wyniki uzyskane przez wym. autorów i wyniki badań własnych są zbliżone. Liczba zwierząt z mocnymi wariantami kazeiny była, w porównaniu z badaniami tych autorów, wyższa o 15%, a odsetek próbek z wariantem A wynosił 25%. Należy przy tym uwzględnić fakt, że część próbek mleka z wariantem B kazeiny w istocie jest wariantem E kazeiny. Oddzielenie wariantu B od E nie było bowiem możliwe metodą zastosowaną w niniejszych badaniach, ze względu na taką

Tab. 2. Podsumowanie wyników analizy alleli kazeiny  $\alpha_{S1}$  w mleku kóz rasy polska biała uszlachetniona

Typ kazeiny	Liczba próbek	W tym niepewnych
AA	21	0
AB	1	1
AX	2	2
BB	26	1
BX	2	2
CC	25	3
CX	1	1
EX	4	4
OO	1	1
XX	3	3
Razem	86	18

Objaśnienie: X – niezidentyfikowany allel

samą ruchliwość elektroforetyczną obu tych wariantów kazeiny.

W badaniach polimorfizmu kazeiny  $\alpha_{S1}$  u kóz rasy białej krótkowłosej (1) wykazano, że najczęściej zwierząt spośród 115 badanych posiadało allel B, następnie E i A (odpowiednio 44, 20, 13 zwierząt). Niezidentyfikowanych (X) było 38 kóz. W tej grupie kóz nie stwierdzono występowania allelu C. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy i wyniki innych autorów (1, 12) wykazały, że odsetek mocnych alleli w rasie „białej” jest wyższy niż w rasach alpejskiej i saaneńskiej francuskiej. Dokładna analiza częstości występowania alleli kazeiny  $\alpha_{S1}$  u kóz tych ras w latach 1975-1994 wykazała wzrost obecności allelu A kosztem alleli E i F w rasie alpejskiej oraz wzrost dominacji allelu E kosztem allelu F w rasie kóz saaneńskich, co jest pozytywnym efektem krzyżowania polepszającego i selekcji w obrębie tych alleli (11). Techniki molekularne (PCR, RFLP) pozwalają obecnie na precyzyjne oznaczenie u kóz obu płci obecności alleli kodujących syntezę danego typu kazeiny  $\alpha_{S1}$  (7).

Wyniki otrzymane w niniejszych badaniach są zbieżne z badaniami polimorfizmu kazeiny  $\alpha_{S1}$  prowadzonymi w innych laboratoriach polskich i europejskich. Wskazują one na pozytywny efekt krzyżowania polepszającego i selekcji uszlachetnionych odmian polskiej kozy białej.

## Piśmiennictwo

1. Banyko J.: Polymorphism of alpha s-casein in white short-haired polled goats. Vet. Med. Czech, 1994, 39, 263-269.
2. Boulanger A., Grosclaude F., Mahé M.F.: Polymorphism of  $\alpha_{S1}$  and  $\alpha_{S2}$  casein in the goat. Genet. Sel. Evol. 1984, 16, 157-176.
3. Brignon G., Mahé M.F., Grosclaude F., Ribadeau-Dumas B.: Sequence of caprine  $\alpha_{S1}$  - casein and characterization of those of its genetics variants which are synthesized at a high level  $\alpha_{S1}$  - CnA. Band C. Protein Seq. Data Anal. 1989, 2, 181-188.
4. Brignon G., Mahé M.F., Ribadeau-Dumas B., Mercier J.C., Grosclaude F.: Two of the three genetic variants of goat  $\alpha_{S1}$  - casein which are synthesized at a reduced level have an internal deletion possibly due to altered RNA splicing. Eur. J. Biochem. 1990, 193, 237-241.
5. Grosclaude F., Mahé M.F., Brignon G., Di Stasio L., Jeunet R.: A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat  $\alpha_{S1}$  - casein. Genet. Sel. Evol. 1987, 19, 399-412.
6. Grosclaude F., Ricordeau G., Martin P., Remeuf F., Vassal L., Bouillon J.: Du gene au fromage: le polymorphisme de la caseine  $\alpha_{S1}$  caprine, see effets, son evolution. INRA Prod. Anim. 1994, 7, 3-19.
7. Leroux C., Martin P., Mahé M.F., Leveziel M., Mercier J.C.: Restriction fragment length polymorphism identification of goat alpha S<sub>1</sub>-casein alleles: a potential tool in selection of individuals carrying alleles associated with a high level protein synthesis. Anim. Genet. 1990, 21, 341-351.
8. Leroux C., Mazure N., Martin P.: Mutations away from splice site recognition sequences might cis-modulate alternative splicing of goat  $\alpha_{S1}$  - casein transcripts. Structural organization of the relevant gene. J. Biol. Chem. 1992, 267, 6147-6157.
9. Manfredi E., Ricordeau G., Barbieri M.E., Amiques Y., Bibe B.: Genotype at the alpha S<sub>1</sub>-casein locus and selection of bucks on progeny test in the Alpine and Saanen breeds. Genet. Sel. Evol. 1995, 27, 451-458.
10. Remeuf F.: Influence of genetic polymorphism of caprine alpha S<sub>1</sub>-casein on the physio-chemical and technological properties of goat milk. Lait 1993, 73, 549-557.
11. Ricordeau G., Piacere A., Manfredi E., Amiques Y.: Allele frequencies for alpha S<sub>1</sub>-casein in Alpine and Saanen AI bucks in 1975-94. Productions Animales. 1995, 8, 259-264.
12. Ryniewicz Z., Krzyżewski J.: Aktualna sytuacja w chowie kóz w Polsce i kierunki ich doskonalenia. Przgl. Hod. 1995, 1, 18-19.
13. Ryniewicz Z., Krzyżewski J., Galka E., Grądziel N.: Ekonomiczne aspekty produkcji mleka koziego. Przgl. Hod. 1996, 8, 16-19.
14. Ryniewicz Z., Krzyżewski J.: Aktualne problemy w hodowli kóz w Polsce, w: Niznikowski R. (red.) „Aktualny stan hodowli oraz kierunki użytkowania kóz w Polsce”. Zeszyt Naukowy 1/97 Zakład Hodowli Owiec i Kóz SGGW. Wydawnictwo Fundacji „Rozwój SGGW” Warszawa 1997, 9-28.

Adres autora: dr Krystyna Królikowska, ul. Kalcytowa 3/55, 25-705 Kielce; e-mail: krystyna@pu.kielce.pl