

Analiza frekvenc genotipov za beta kazein in kapa kazein pri treh pasmah govedu v Sloveniji

Barbara Luštrek,
Marija Klopčič,
Danijela Bojkovski,
Klemen Potočnik,
Mojca Simčič,
Oddelek za zootehniko
Biotehniška fakulteta

Uvod

Kazeini so beljakovine, ki predstavljajo okrog 80 % vseh beljakovin v kravjem mleku in vplivajo na prehranske ter tehnološke lastnosti mleka (Petrova in sod., 2022; Fox in Mulvihill, 1982). Beta kazein (~40 %) in kapa kazein (~13 %) sta pomembni sestavini v kravjem mleku, genetsko pa sta opredeljeni kot monogeni lastnosti. Gen CSN2, ki kodira beta kazein, je pri govedu na kromosomu 6 (BTA6). Ta kromosom je pomemben pri selekciji mlečnih pasem govedu, saj vsebuje skupino genov za kazeine, vključno z geni za druge kazeine, kot sta α S1 kazein in kapa kazein (Fox in McSweeney, 2013). Gen na BTA6, ki kodira kapa kazein, je poznan pod imenom CSN3. Tesna povezanost skupine genov za kazeine, ki so na istem kromosomu, dela to regijo genoma izjemno pomembno za lastnosti, povezane s kakovostjo mleka (De Kruif in Holt, 2003).

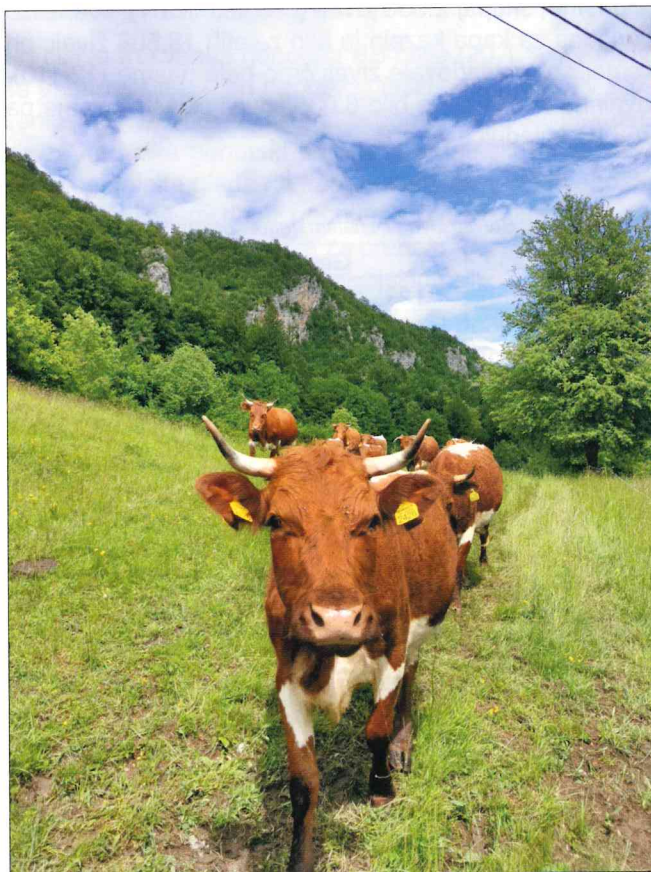
Beta kazein

Beta kazein je vzbudil pozornost zaradi svojih najpogostejših različic, A1 in A2, za katere je znano, da imajo različen vpliv na zdravje ljudi. A2 različica velja za prvotno različico, ki je prisotna pri starejših pasmah govedu, A1 različica pa je mutirana različica, ki se je pojavila pri nekaterih modernih pasmah govedu. Različici A1 in A2 sta že obsežno proučeni. Ugotovili so, da mleko, ki vsebuje le A2 beta kazein in ga poznamo pod imenom A2 mleko, zmanjšuje gastrointestinalne težave, še posebej pri občutljivih osebah (Küllenberg de Gaudry in sod., 2019). A1 beta kazein je povezan z gastrointestinalnimi težavami, ker se pri njegovi presnovi sprošča peptid, imenovan beta kazomorfina-7 (BCM-7), medtem ko pri presnovi A2 različice do tega ne pride. Za to je odgovorna razlika v molekularni sestavi med različicama A1 in A2 beta kazeina, ki izhaja iz zamenjave aminokislinske histidin v prolin na položaju 67 pri različici A2. Prisotnost histidina pri različici A1 omogoča sprostitvev BCM-7 med procesom prebave kot tudi pri procesu zorenja sira (Giribaldi in sod., 2022). A2 mleko, pri prebavi katerega se BCM-7 ne sprošča, je potencialna alternativa za ljudi, ki se po zaužitju mleka soočajo s prebavnimi težavami (Jianqin in sod., 2015). Iz tehnološkega vidika naj bi A2 mleko imelo nekoliko slabše koagulacijske lastnosti in sposobnost penjenja v primerjavi z A1 mlekom (Fernández-Rico in sod., 2022; Bisutti in sod., 2022; Ipsen in Otte, 2004), kar lahko vpliva na učinkovitost proizvodnje sira in izdelkov, ki zahtevajo stabilno peno, npr. stepena smetana, sladoled, kreme za peciva ipd.

Kapa kazein

Različice gena CSN3, ki kodira kapa kazein, so ključne pri določanju lastnosti koagulacije mleka in značilno vplivajo na količino in kakovost sira. Poznanih je več različic, med katerimi sta najpogostejši A in B (Lavon in sod., 2023). Različici A in B se na molekularnem nivoju razlikujeta po zamenjavi na poziciji 136, kjer se pri različici A nahaja treonin, pri različici B pa izolevcin, ter na poziciji 148, kjer se pri različici A nahaja asparagin, pri B pa alanin. Ta sprememba izboljša koagulacijske lastnosti pri različici B, kar je ugodnejše za izdelavo sira zaradi trših sirnih zrn in večjega izplena (Bijl in sod., 2014).

Različica B je povezana z manjšimi kazeinskimi micelami v mleku, kar povzroči hitrejše začetno zlepljanje micel v procesu koagulacije mleka in pozitivno vpliva na čas koagulacije (Pärna in sod., 2012; Deshwal in sod., 2023). Mleko krav z genotipom BB je, poleg hitrejše koagulacije in največje trdote sirnega zrna, povezano tudi z večjo vsebnostjo maščob in beljakovin v mleku, kar izboljša izplen in sestavo sira. Posledica teh lastnosti je, da dobimo do 10 % več sira v primerjavi z mlekom krav z genotipom AA, saj ima njihovo mleko nekoliko daljši



Naša mala četica (foto: Barbara Štimec)

čas koagulacije in mehkejša sirna zrna (Lavon in sod., 2023).

Bolj raziskana je še različica E, ki je povezana z večji-mi kazeinskimi micelami, daljšim časom koagulacije in mehkejšimi sirnimi zrni, zaradi česar je najmanj zažele-na pri predelavi mleka v sir (Dinc in sod., 2013). Različi-ca A je z vidika lastnosti koagulacije, sicer manj zaželena kot B, vendar ima boljši vpliv kot različica E. Mleko krav z genotipom AB ima zaradi prisotnosti različice B bolj-še lastnosti koagulacije kot mleko krav z genotipom AA, vendar slabše kot mleko krav z genotipom BB. Mleko krav z genotipom BE je primernejše za predelavo v sir kot mleko krav z genotipom AA ali AE, prav tako zaradi prisotnosti različice B. Mleko krav z genotipom AE ali EE pa je praviloma tehnološko neprimerno za predelavo v sir (Lavon in sod., 2023).

Informacijo o genotipu za beta ali kapa kazein pri posa-mezni živali je možno pridobiti z genotipizacijo. Namen te raziskave je bil prikazati frekvenco genotipov za beta kazein in kapa kazein pri genotipiziranih živalih v popu-laciji cikastega, rjavega in črno-belega goveda v Sloveniji.

Material in metode

Z genotipizacijo z večjim številom genetskih označeval-cev na celotnem genomu (50K SNP čip) smo pridobili informacije o genotipu za beta ali kapa kazein pri posa-mezni živali. Večina vzorcev živali je bila genotipizirana v Weatherbys Scientific laboratoriju na Irskem. V anali-zo frekvenc genotipa smo vključili genotipizirane živali cikastega, rjavega in črno-belega goveda v Sloveniji. Poznan genotip za beta kazein je imelo 71 živali cikaste pasme, 1.648 živali rjave pasme in 631 živali črno-be-le pasme; skupaj 2.350 živali (Preglednica 1). V analizo genotipa za kapa kazein je bilo zajetih 18.508 živali, pri čemer so prevladovale živali črno-bele pasme (12.110), živali rjave pasme je bilo 6.035, živali cikaste pasme pa 363 (Preglednica 2).

Preglednica 1: Število živali z znanim genotipom za beta kazein

Pasma	Genotip			Skupaj
	A1A1	A1A2	A2A2	
Cikasto govedo	28	25	18	71
Rjavo govedo	32	384	1.232	1.648
Črno-belo govedo	84	323	224	631
Skupaj	144	732	1.474	2.350

Preglednica 2: Število živali z znanim genotipom za kapa kazein

Pasma	Genotip						Skupaj
	AA	AB	AE	BB	BE	EE	
Cikasto govedo	100	157	12	73	19	2	363
Rjavo govedo	428	2.076	2	3.528	1	0	6.035
Črno-belo govedo	4.659	4.352	1.292	1.165	568	74	12.110
Skupaj	5.187	6.585	1.306	4.766	588	76	18.508

Z uporabo procedure FREQ statističnega programa SAS/STAT (verzija 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, ZDA) smo izračunali frekvence genotipov za obe last-nosti (beta kazein in kapa kazein) po pasmi. Statistično značilnost povezave med genotipom in pasmo smo pre-verili z uporabo χ^2 testa.

Rezultati

Najvišjo frekvenco genotipa A2A2 smo ugotovili pri rjavi pasmi, kjer je ta genotip prisoten pri 74,8 % živalih, sledi črno-bela pasma s 35,5 % in cikasta pasma s 25,4 %. Pri cikasti pasmi prevladuje genotip A1A1 (39,4 %), med-tem ko je 35,2 % živali z genotipom A1A2. Pri črno-beli pasmi prevladuje genotip A1A2 (51,2 %). Največji delež genotipa A2A2 pri rjavi pasmi je rezultat selekcije na A2 različico oz. A2A2 genotip v zadnjih letih in deloma tudi ciljne genotipizacije (Preglednica 3).

Preglednica 3: Frekvence genotipov za beta kazein

Pasma	Delež genotipa (%)		
	A1A1	A1A2	A2A2
Cikasto govedo	39,4	35,2	25,4
Rjavo govedo	1,9	23,3	74,8
Črno-belo govedo	13,3	51,2	35,5

Genotip BB, ki je povezan z zaželenimi lastnostmi mle-ka, prevladuje pri rjavi pasmi, kjer je prisoten pri 58,5 % živali. Pri cikasti pasmi je ta genotip pri 20,1 % živali, medtem ko je pri črno-beli pasmi zastopan pri 9,6 % ge-notipiziranih živali. Pri ciki je najpogostejši genotip AB (43,3 %), sledi genotip AA (27,5 %). Pri črno-beli pasmi je najpogostejši genotip AA (38,5 %), sledi AB (35,9 %). Genotipi, ki vsebujejo E različico, so prisotni pri 10,7 % (AE), 4,7 % (BE) in 0,6 % (EE) genotipiziranih živali čr-no-bele pasme. Pri genotipiziranih živalih rjave pasme neželene E različice praktično ni in prav tako ni živali z genotipom EE. Tudi pri ciki je prisotnost E različice red-ka, saj ima 5,2 % genotipiziranih živali genotip BE, 3,3 % AE in 0,6 % EE (Preglednica 4).



Podmladek (foto: Mateja Čerin)

Preglednica 4: Frekvence genotipov za kapa kazein

Pasma	Delež genotipa (%)					
	AA	AB	AE	BB	BE	EE
Cikasto govedo	27,5	43,3	3,3	20,1	5,2	0,6
Rjavo govedo	7,1	34,4	<0,1	58,5	<0,1	-
Črno-belo govedo	38,5	35,9	10,7	9,6	4,7	0,6

Rezultati χ^2 testa so pokazali statistično značilno po-vezavo med genotipom za beta kazein in pasmo (χ^2 = 471,6; df = 4; p < 0,0001) ter genotipom za kapa kazein in pasmo (χ^2 = 6131,1; df = 10; p < 0,0001), kar naka-zuje, da se frekvence genotipov med pasmami dejansko razlikuje.

Razprava

Rezultati proučevanja frekvenc genotipov beta in kapa kazeinov pri treh različnih pasmah govedi v Sloveniji v primerjavi z literaturo kažejo tako skladnosti kot tudi pomembne razlike, kar poudarja pomen genomske se-lekcije (selekcije z upoštevanjem genomske informacije živali) in rejskih praks na nacionalni ravni.

Beta kazein

Objavljene raziskave evropskih, ameriških in avstralskih populacij mlečnega goveda kažejo, da je različica A2 pogostejša od različice A1, s frekvencami med 48 % do 76 % za genotip A2A2, odvisno od pasme (Ciešlirnska in sod., 2022; Miluchová in sod., 2023; Heins in sod., 2022). Rezultati te raziskave kažejo na precejšnje raz-like med tremi pasmami v Sloveniji. Najvišjo frekvenco genotipa A2A2 ima rjava pasma (74,8 %), kar presega celo nekatere rezultate v literaturi, npr. pri brown swiss populaciji iz Kanade je frekvenca 64,7 % oz. 62 % pri brown swiss populaciji v Švici (Eadie, 2022; Braunvieh Schweiz (dostopano 2024)). To nakazuje na selekcijo na A2 različico pri rjavi pasmi v Sloveniji. Pri populaciji čr-no-bele pasme v Sloveniji je frekvenca genotipa A2A2 (35,5 %) precej nižja v primerjavi z literaturo, kjer so fre-kvence za različne holstein populacije med 48,1 % in 57,6 % (Heins in sod., 2022; Miluchová in sod., 2023).

V literaturi rezultatov o beta kazeinu pri cikastem govedu še ni, saj smo takšno raziskavo naredili prvič. Ugotovili smo, da pri genotipiziranih živalih te pasme prevladuje genotip A1A1 (39,4 %). V objavljenih študijah pri evrop-skih avtohtonih pasmah so poročali, da običajno prevla-duje različica A2, saj velja za evlucijsko starejšo (Eadie, 2022). Populacija cikastega goveda je v preteklosti šla skozi ozko grlo, saj je bila komaj rešena pred izumrtjem, kar bi lahko imelo za posledico tudi večji delež različice A1. Prav tako je potrebno poudariti, da je vzorec genoti-piziranih živali pri ciki zelo majhen (71 živali) in ne odra-ža nujno dejanskega stanja v celotni populaciji.

Kapa kazein

Pri kapa kazeinu se rezultati te raziskave ujemajo z ugo-tovitvami drugih študij (Ünal in Kopuzlu, 2022; Albazi in sod., 2023). Genotip BB, ki je povezan z boljšo kako-



Radovednost (foto: Mateja Čerin)

vostjo mleka in z večjim izplenom sira, je najpogostejše prisoten pri rjavem govedu v Sloveniji (58,5 %), kar je skladno z ugotovitvami za populacijo brown swiss go-vedi v Kanadi, kjer genotip BB dosega podobno visoko frekvenco (61,5 %; Eadie, 2022).

Pri ciki je frekvenca genotipa BB nižja (20,1 %), vendar še vedno višja kot pri populaciji črno-bele govedi v Slo-veniji (9,6 %). Tudi ta rezultat je pomemben, saj nakazu-je, da ima cika genetski potencial za selekcijo na višjo kakovost mleka glede na kapa kazein. Kot omenjeno, je pri črno-beli pasmi delež genotipa BB nizek, kar kaže, da tehnološka kakovost mleka za predelavo v sir v preteklih letih ni bila med glavnimi selekcijskimi cilji.

Frekvenca E različice je v proučevani populaciji genoti-piziranih živali sicer majhna, vendar je njena prisotnost kljub temu pomembna, predvsem za majhne kmetije in mlekarne, ki se ukvarjajo s predelavo mleka. Zaradi do-kazano negativnega vpliva te različice na predelavo mle-ka, je smiselno na nacionalnem nivoju posvečati pozor-nost kontinuiranemu zmanjševanju frekvence različice E pri vseh treh pasmah.

Povezava med beta in kapa kazeinom

Gena, ki nadzorujeta sintezo beta in kapa kazeina, sta locirana na istem kromosomu, zato predvidevajo, da obstaja določena stopnja dedne povezave med njima (Eadie, 2022). Čeprav sta beta in kapa kazein pogos-to obravnavana kot neodvisna, raziskave haplotipov, ki vključujejo oba gena, kažejo, da lahko medsebojno vpli-vata na sestavo mleka (Ardicli in sod., 2024).

Sklepi

Rezultati te raziskave potrjujejo raznolikost frekvenc genotipov za beta in kapa kazein pri genotipiziranih živalih treh pasem govedi v Sloveniji. Pri rjavi pasmi smo potrdili selekcijo na A2A2 za beta kazein in BB za kapa kazein. Pri ciki in črno-beli pasmi je prav tako mogoča ciljno usmerjena selekcija na zelene genotipe, predvsem za kapa kazein. Pri obeh pasmah bi bilo potrebno sistematsko zmanjševanje različice E in izločanje genotipa EE, ker negativno vplivajo na predelavo mleka v sir, kar je najbolj očitno, kjer predelujejo mleko v manjših sirarnah, kot dopolnilna dejavnost na kmetiji. Na ta način bi lahko povečali dodano vrednost pri predelavi mleka. Zaradi možnosti pojava težav pri predelavi A2 mleka je smiselno v populacijah goveda ohranjati tudi različico A1, npr. v obliki genotipa A1A2, ki ima fenotipske prednosti obeh različic. Pri ciki je izjemnega pomena tudi sočasna skrb za ohranjanje genetske variabilnosti in preprečevanje parjenja v sorodstvu.

Viri

- Albazi W. J., Al-Thuwaini T. M., Alamely M., Jeddoa Z. M., Mousa R., Al-Dawmy F., ... Al-Himaery N. 2023. Association of Kappa casein gene polymorphism with milk production traits in crossbred dairy cows. *Ciência Animal Brasileira*, 24: e-74079E.
- Ardici S., Aldevir Ö., Aksu E., Kucuk K., Gümen A. 2024. Associations of bovine beta-casein and kappa-casein genotypes with genomic merit in Holstein Friesian cattle. *Archives Animal Breeding*, 67, 1: 61–71.
- Bijl E., de Vries R., van Valenberg H., Huppertz T., Van Hooijdonk T. 2014. Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: Genetic variants and glycosylation of κ -casein. *International Dairy Journal*, 34, 1: 135–141.
- Bisutti V., Pegolo S., Giannuzzi D., Mota L.F.M., Vanzin A., Toscano A., Trevisi E., Ajmone Marsan P., Brasca M., Cecchinato A. 2022. The β -casein (CSN2) A2 allelic variant alters milk protein profile and slightly worsens coagulation properties in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 105, 3794–3809.
- Braunvieh Schweiz. Brown Swiss – More Than Milk. *Braunvieh Schweiz*, <https://homepage.braunvieh.ch/en/brown-swiss/> (dostopano 20. sept. 2024).
- Cieślińska A., Fiedorowicz E., Rozmus D., Sienkiewicz-Szłapka E., Jarmołowska B., Kamiński S. 2022. Does a little difference make a big difference? Bovine β -casein A1 and A2 variants and human health—an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 24: 15637.
- De Kruij C. G., Holt C. 2003. Casein Micelle Structure, Functions and Interactions. V: Fox P. F., McSweeney P. L. H. (ur.). *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*. Boston, Springer: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_5.
- Deshwal G. K., Gómez-Mascaraque L. G., Fenelon M., Huppertz T. 2023. A review on the effect of calcium sequestering salts on casein micelles: From model milk protein systems to processed cheese. *Molecules*, 28, 5: 2085.
- Dinc H., Ozkan E., Koban E., Togan I. 2013. Beta-casein A1/A2, kappa-casein and beta-lactoglobulin polymorphisms in Turkish cattle breeds. *Archives Animal Breeding*, 56, 1: 650–657.
- Eadie T. 2022. Selection for Milk Caseins: Beta and Kappa. *Dairyproducer*, <https://www.dairyproducer.com/selection-for-milk-caseins-beta-and-kappa/> (dostopano 13. sept. 2024).
- Fernández-Rico S., Mondragón AdC., López-Santamarina A., Cardelle-Cobas A., Regal P., Lamas A., Ibarra I.S., Cepeda A., Miranda J.M. 2022. A2 Milk: New Perspectives for Food Technology and Human Health. *Foods*, 11(16):2387. <https://doi.org/10.3390/foods11162387>
- Fox P. F., McSweeney P. L. H. (ur.). 2013. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*. Springer Science & Business Media.
- Fox P. F., Mulvihill D. M. 1982. Milk proteins: molecular, colloidal and functional properties. *Journal of Dairy Research*, 49: 679–693.
- Giribaldi M., Lamberti C., Cirrincione S., Giuffrida M. G., Cavallarin L. 2022. A2 milk and BCM-7 peptide as emerging parameters of milk quality. *Frontiers in Nutrition*, 9: 842375.
- Heins B., Pereira G., Armstrong J. 2022. A2 milk and A2 genetics. University of Minnesota Extension, <https://extension.umn.edu/dairy-milking-cows/a2-milk-and-a2-genetics> (dostopano 10. sept. 2024).
- Ipsen R., Otte J. 2004. The Relation between protein structure, interfacial rheology and foam formation for various milk proteins. *Annu. Trans. Nord. Rheol. Soc.*, 21, 143–178.
- Jianqin S., Leiming X., Lu X., Yelland G. W., Ni J., Clarke A. J. 2015. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. *Nutrition Journal*, 15, 1. Erratum in: *Nutrition Journal*, 15, 1.
- Küllenberg de Gaudry D., Lohner S., Schmucker C., Kapp P., Motschall E., Hörlein S., Röger C., Meerpohl J. J. 2019. Milk A1 beta casein and health-related outcomes in humans: a systematic review. *Nutrition Reviews*, 77, 5: 278–306.
- Lavon Y., Weller J. I., Zeron Y., Ezra E. 2023. Estimating the Effect of the Kappa Casein Genotype on Milk Coagulation Properties in Israeli Holstein Cows. *Animals*, 14, 1: 54.
- Miluchová M., Gábor M., Candrák J. 2023. The effect of the genotypes of the CSN2 gene on test-day milk yields in the Slovak Holstein cow. *Agriculture*, 13, 1: 154.
- Pärna E., Kaart T., Kiiman H., Bulitko T., Viinalass H. 2012. Milk protein genotype association with milk coagulation and quality traits. V: *Milk production - advanced genetic traits, cellular mechanism, animal management and health*. Rijeka, Croatia, InTech: 155–172.
- Petrova S. Y., Khlgatian S. V., Emelyanova O. Y., Pishulina L. A., Berzhets V. M. 2022. Structure and biological functions of milk caseins. *Russian Open Medical Journal*, 11, 2: 209.
- Ünal H., Kopuzlu S. 2022. The relationships between κ -casein (CSN3) gene polymorphism and some performance traits in Simmental cattle. *Archives Animal Breeding*, 65, 1: 129–134.



Poletni dan (foto: Mateja Čerin)