

牦牛乳蛋白多态性对奶酪凝乳特性的影响

谈婷, 罗毅皓*, 孙万成, 孙祥祥

(青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016)

摘要: 为了检测青海部分地区 7 家不同牧场牦牛乳 κ -酪蛋白和 α_{s1} -酪蛋白基因多态性, 作者分析了基因多态性对奶酪凝乳特性的影响。通过提取牦牛乳体细胞, 采用限制性片段长度多态性聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 分析技术, 对提取的 DNA 进行 PCR 扩增及酶切, 对电泳条带进行基因分型; 提取牦牛乳蛋白, 采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析各样品与标准品色谱图, 对出峰时间和出峰形状进行基因分型。利用流变仪测定不同基因型牦牛乳凝乳过程中流变特性, 记录奶酪凝乳时间, 计算奶酪得率。牦牛乳 κ -酪蛋白基因有 AA 型、AB 型和 BB 型 3 种基因型, 3 种基因型与凝乳特性的分析表明, 在凝乳时间方面 A 等位基因为有利等位基因。牦牛乳 α_{s1} -酪蛋白存在 AA 型、AB 型和 BB 型 3 种类型, 3 种基因型与凝乳特性的分析表明, 在凝乳时间、奶酪得率、最大动力黏度和最大剪切速率方面 B 等位基因为有利等位基因。以上结果表明, 青海 7 家牧场牦牛乳 κ -酪蛋白和 α_{s1} -酪蛋白均存在基因多态性, κ -酪蛋白 A 等位基因和 α_{s1} -酪蛋白 B 等位基因是影响牦牛乳凝乳特性的主效基因。

关键词: 牦牛乳; 蛋白质多态性; 高效液相色谱法; 限制性片段长度多态性聚合酶链式反应; 凝乳特性
中图分类号: S 823.85; Q 78 文章编号: 1673-1689(2024)06-0040-10 DOI: 10.12441/spyswjs.20221107001

Effects of Yak Milk Protein Polymorphism on Cheese Coagulation Characteristics

TAN Ting, LUO Yihao*, SUN Wancheng, SUN Xiangxiang

(College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract: In order to detect the polymorphisms of κ -casein and α_{s1} -casein gene in yak milk from seven different pastures in certain areas of Qinghai province, the effect of gene polymorphisms on cheese coagulation characteristics was analyzed. Yak milk somatic cells were extracted, and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis technique was used to extract DNA for PCR amplification and enzymatic digestion, followed by gene typing based on electrophoresis bands. Yak milk proteins were also extracted and high-performance liquid chromatography (HPLC) was used to analyze the chromatographic profiles of various samples compared to the standard samples, with a focus on peak time and peak shape for gene typing. The

收稿日期: 2022-11-07 修回日期: 2023-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22167020)。

* 通信作者: 罗毅皓 (1976—), 女, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品营养与健康、食品分子生物学研究。

E-mail: 291649347@qq.com

rheological characteristics during coagulation for different genotypes of yak milk were determined by rheometer. Cheese coagulation time was recorded, and cheese yield was calculated. The results showed that there were three genotypes for the κ -casein gene in yak milk, i.e., type AA, AB and BB. The analysis of the three genotypes and coagulation characteristics showed that the A allele was favorable in terms of coagulation time. Similarly, for the α_{s1} -casein gene in yak milk, three genotypes (AA, AB, and BB) were also identified. The analysis of the coagulation time, cheese yield, maximum dynamic viscosity, and maximum shear rate revealed that the B allele was favorable. The above results suggest that both κ -casein and α_{s1} -casein of yak milk in seven Qinghai farms have gene polymorphisms. The A allele in κ -casein and B allele in α_{s1} -casein are the main effective genes affecting the coagulation characteristics of yak milk.

Keywords: yak milk, protein polymorphism, high-performance liquid chromatography, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, coagulation characteristics

牦牛(*Bos grunniens*)是青海特色资源物种,有“高原之舟”之称,牦牛乳营养价值极高^[1],被称为天然浓缩乳^[2]。目前,牦牛乳产品的开发较为基础,主要由牧民自己食用或制成酥油,极少用于制作牦牛奶酪。奶酪(cheese)作为浓缩的奶制品有“奶黄金”之称,其蛋白质含量较高,且含有极其丰富的钙、磷、脂肪和维生素等营养成分。牦牛乳品质优良,是加工各种高档乳制品尤其是奶酪的良好原料。

乳蛋白基因多态性与乳蛋白含量和组成相关,可影响牛乳的凝乳性能等加工特性^[3],从而影响奶酪品质。凝乳效果直接影响奶酪的产率、流变学特性及功能特性^[4],因此改进凝乳工艺能够提高奶酪产率和奶酪品质。近年,乳蛋白多态性的研究取得了一定的进展,但基于牦牛乳蛋白多态性分析其对奶酪凝乳特性影响的研究较少。研究发现,酪蛋白含量越高,干酪的产量越大。干酪的品质(如乳凝结时间和凝乳硬度)与酪蛋白的组成相关^[5], κ -酪蛋白与牛乳产量及凝乳特性有关^[6],牛乳的凝乳特性和干酪的品质与 κ -酪蛋白上的B等位基因有关^[7]。牛乳在凝乳酶作用下会形成 β -酪蛋白,其可影响酪蛋白胶束的表面特性,进一步影响乳制品的品质^[8]。郑思凡等研究发现,荷斯坦牛乳 β -酪蛋白的AA型基因(30.97%)的原料乳凝乳效果较好, κ -酪蛋白的BB基因型(12.00%)的原料乳凝乳效果较好,比AA基因型好20%~50%^[9],凝乳性能好的样品中酪蛋白及胶体钙含量较高,pH值较凝乳性能差和不凝乳样品低,凝乳时间与 κ -酪蛋白含量成反比。同时等位基因变体对奶酪凝乳特性有不同影响,A2等位基

因频率的增加可能导致凝乳性状的恶化^[10],较高浓度的 β -酪蛋白变体A1和B对凝乳时间和凝乳硬度有显著影响^[11]。宗学醒等研究发现,再制干酪产品的硬度和黏度与酪蛋白比例有关^[12]。通过对中国水牛乳蛋白基因多态性的研究发现, κ -酪蛋白和 α_{s2} -酪蛋白的相对含量显著影响 κ - α_{s1} - β -复合酪蛋白的多态性^[13]。据报道,中国荷斯坦奶牛的 α_{s2} -酪蛋白有2种类型:A和B; β -酪蛋白有5种类型:A1、A2、B、C和F; κ -酪蛋白有2种类型:A/E和B; α_{s1} -酪蛋白仅有1种类型; β -乳球蛋白有3种类型:A、B和C;但未发现 α -乳白蛋白的多态性^[14]。王思伟等采用限制性片段长度多态性聚合酶链式反应(PCR-RFLP)分析技术对DGATI基因K232A位点进行遗传多态性分析^[15],发现3种基因型KK、KA和AA,且DGATI基因可用于泌乳性状分子遗传标记的辅助选择。有研究发现乳蛋白基因多态性与乳蛋白的绝对与相对含量相关,尤其是 κ -酪蛋白B型与其含量成正相关^[16]。李玲等采用反相高效液相色谱(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)发现 α_{s1} -酪蛋白BB型水牛乳更适于制作类蒙特利杰克半硬质干酪^[17]。研究者还发现, α_{s1} -酪蛋白基因多态性与水牛乳的乳成分相关,能显著影响水牛乳马苏里拉干酪的组成、质构和融合特性,其中AB型更适于制作马苏里拉干酪^[18]。乳蛋白的基因多态性实质是由于乳蛋白合成核苷酸链上发生基因突变(如碱基替换),从而使翻译过程出现该蛋白质的氨基酸序列的缺失或置换、糖基化、磷酸化位点的差异所引起^[19-20]。关于基因多态性的检

测大都是在蛋白质水平和DNA水平上进行^[21],如变性梯度凝胶电泳法(denaturing gradient electrophoresis, DGGE)、等电聚焦技术(isoelectric focusing, IEF)、HPLC、质谱(mass spectrometry, MS)以及聚合酶链式反应-单链构象多态性分析(polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP)和PCR-RFLP等。近年来上述单一方法间相互联合分析乳蛋白多态性的研究逐渐增多^[22]。目前,国内外有不少学者研究牛乳蛋白多态性与奶酪加工品质的关系,一般采用荷斯坦牛乳和山羊乳加工,少数采用水牛乳加工,但尚未见有关牦牛乳蛋白多态性与奶酪加工品质关系的报道。

作者以牦牛乳为原料,将牦牛乳蛋白多态性与奶酪凝乳特性相结合,分析牦牛乳蛋白多态性类型,比较其对奶酪凝乳效果的影响,探索牦牛乳蛋白多态性与奶酪凝乳效果之间的关系,最终揭示更适宜生产牦牛乳奶酪的基因型,为研究乳蛋白多态性对凝乳效果的作用机制及牦牛乳中蛋白质的生物活性物质的研究和开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牦牛乳:青海省河南蒙古族自治县、祁连县、兴海县、海西州、玉树州5个地区的7家牧场提供,分别记为牧场1~牧场7。

色谱级乙腈、三氟乙酸(TFA)、甲醇、BisTris、盐酸胍、二硫苏糖醇(DTT)、柠檬酸钠、引物:甘肃宝信生物科技有限公司; α -酪蛋白标准品:Sigma公司;SteadyPure通用型基因组DNA提取试剂盒、*Hind* III内切酶、10×缓冲液:上海生工生物工程股份有限公司;2×Taq Master Mix:兰州瑞真生物技术有限公司;琼脂糖、DL1000 DNA Marker、EB染色剂、DEPC水、50×TBE缓冲液:大连宝生工程有限公司;发酵剂、凝乳酶:深圳市富晟生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Waters Alliance e2695高效液相色谱仪:美国Waters公司;InertsilC₈ 5 μ m×4.6 mm×250 mm(UP)色谱柱:日本Inertsil公司;Gel Doc XR+凝胶成像系统:美国BIO-RAD公司;WD-9413A凝胶成像分析仪:北京市六一仪器厂;System 9700梯度PCR仪:美国ABI公司;2-16KL冷冻离心机:德国Sigma公司;HWS-26电热恒温水浴锅:上海一恒科技有限公

司;JY600电泳仪:北京君意东方电泳仪设备有限公司;SW-CJ-1D超净工作台:苏州净化设备有限公司;来美ETT CP5000流变仪:广州来美科技有限公司。

1.3 主要溶液配制

流动相A(质量分数0.1%的TFA水溶液):吸取0.5 mL的TFA,加入超纯水至500 mL,混匀,用溶剂过滤器抽滤,超声脱气后备用,现配现用。

流动相B(质量分数0.1%的TFA乙腈溶液):吸取0.5 mL的TFA,加入乙腈至500 mL,混匀,用溶剂过滤器抽滤,超声脱气后备用,现配现用。

工作液I:称取1.046 2 g BisTris, 28.659 0 g 盐酸胍, 0.084 3 g 柠檬酸钠, 0.150 4 g DTT,加超纯水约30 mL充分搅拌溶解,最后加超纯水定容到50 mL。

工作液II:称取42.988 5 g 盐酸胍,加流动相A约30 mL充分搅拌溶解,最后加超纯水定容至50 mL。

1.4 试验方法

1.4.1 乳样采集 采集乳样来自青海省7个牦牛合作社牧场,每个牧场分别采集泌乳中期的6个样品,每个样品200 mL,共采集奶样42份,采集时间为9月份。

1.4.2 PCR-RFLP技术检测 κ -酪蛋白的基因多态性

1)牦牛乳体细胞提取 取奶样200 mL,在4℃、3 500 r/min离心15 min,将脂肪层和脱脂乳层收集装入回收瓶中,用PBS移取底层固体物至新的10 mL离心管中,加入PBS至6 mL,在4℃、3 500 r/min离心5 min,吸取上清液弃去,重复2次,直至上层液体无脱脂乳,加入PBS至3 mL,-80℃保存备用。

2)体细胞DNA提取 按照SteadyPure通用型基因组DNA提取试剂盒说明书提取DNA。

3)PCR引物设计 κ -酪蛋白基因*CSN3*上游引物为 κ -CNF 5'-CACGTCACCCACACCCACATTTA TC,下游引物为 κ -CNR 5'-TAATTAGCCCATTTTCG CCTTCTCTGT,扩增片段大小为356 bp。

4)PCR反应体系 根据引物建立一个50 μ L的PCR反应体系,依次加入25 μ L 2×Mix,1 μ L上游引物、1 μ L下游引物、2 μ L DNA模板、21 μ L去离子水。

5)PCR反应程序 95℃预变性2 min;98℃变性5 s,57℃退火30 s,72℃延伸30 s,共30个循环;72℃延伸5 min,于4℃保存。

6)PCR产物的电泳检测步骤 称取0.75 g的琼脂糖溶解在50 mL的50×TBE电泳缓冲液中,用

微波炉加热至完全融化,取出摇匀,制成质量分数为1.5%的琼脂糖溶液,待冷却到50℃时加入5μL的EB染色剂,摇匀,轻轻倒入电泳凝胶水平板中,制成琼脂糖凝胶。待胶完全凝固,拔出梳子,置于电泳槽中,加电泳缓冲液,将10μL的PCR扩增产物加入点样孔,同时点一个5μL的DNA Marker,100V电泳45min,再用凝胶成像系统观察结果,拍照保存。

7)PCR-RFLP分析 确定PCR扩增片段为目的的片段后,将κ-酪蛋白的PCR扩增产物用相应的限制性内切酶酶切,于37℃孵育16h。采用的酶切反应体系为21μL,PCR产物10μL,DEPC水7μL,10倍缓冲液2μL,Hind III内切酶2μL。

8)酶切产物检测 酶切产物在1.5g/dL的琼脂糖凝胶上电泳,100V电泳45min,再用凝胶成像系统观察结果,拍照保存。

1.4.3 HPLC法检测牦牛乳蛋白多态性

1)样品制备 以体积比1:1向分装的1mL冷冻奶样中加入工作液I,样品融化后用振荡器振荡10s,室温孵育1h。4℃于11350r/min离心5min,除去表层乳脂,取底层溶液300μL于新的离心管中,加入工作液II,按体积比1:3的比例稀释并混匀,在0.22μm的醋酸纤维素过滤器中去除不溶颗粒,滤液注入进样瓶中待测。最后稀释溶液中的乳蛋白质量浓度约为4mg/mL,而原始牛奶样品中的乳蛋白质量浓度在30~33mg/mL。

2)标准品制备 准确称取蛋白质标准品,配制成浓度为10mmol/L的溶液,-20℃冻存,之后的处理步骤同样品制备。

3)色谱条件 反向色谱柱:C₈柱(5μm×4.6mm×250mm),检测波长214nm,柱温45℃,进样量10μL,流量0.5mL/min,67%的流动相A提取5min,33%的流动相B线性梯度检测40min^[15]。

1.4.4 凝乳特性测定

1)样品预处理 将冷冻的牦牛乳经37℃水浴融化,取20mL奶样,加入凝乳酶0.012g,开始检测各项指标。

2)奶酪凝乳过程中流变特性测定 加入凝乳酶搅拌均匀后,迅速将奶样加入流变仪样品池中,奶样没过转子,点击开始按钮进行流变特性测定(转子为ET-27,样品体积16.6mL,剪切速率30s⁻¹,测定温度35℃,测定时长30min)。机器每

20s采集1次数据。

3)奶酪凝乳时间及奶酪得率的测定 将冷冻的牦牛乳经37℃水浴融化,取10mL奶样,称质量记为m₂,加入凝乳酶0.006g,混匀,置于35℃的水浴锅中,开始计时,肉眼观察,当奶样表面有光泽、摇晃时呈固态并有乳清析出时停止计时,得到奶酪凝乳时间;40min后当奶样完全凝固,切割排除乳清,用滤纸吸去乳清,称质量记为m₁,计算奶酪得率Y:

$$Y = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%$$

式中:Y为奶酪得率,%;m₁为奶酪质量,mg;m₂为奶样质量,mg。

1.5 数据处理与分析

利用IBM SPSS Statistics 25软件对数据进行方差分析,用Origin 2018软件作图。

2 结果与分析

2.1 κ-酪蛋白PCR产物扩增结果

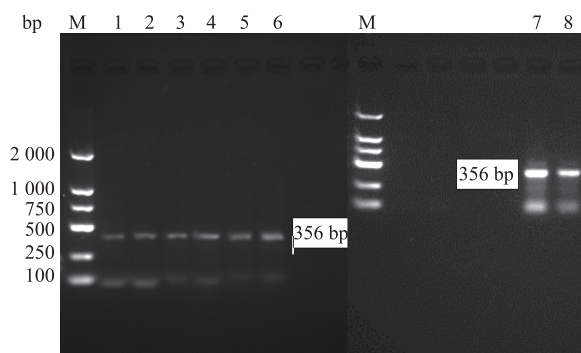
图1为牦牛乳κ-酪蛋白基因的PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图。可以看出,κ-酪蛋白基因PCR扩增产物长度356bp,明亮、整齐、无杂带。扩增产物的浓度较高,可以进行酶切。

2.2 κ-酪蛋白基因PCR扩增产物酶切结果

检测的κ-酪蛋白的基因长度为356bp,Hind III酶切电泳图见图2。可以看出,对PCR扩增产物进行限制性内切酶Hind III酶切后出现多态性,A等位基因表现为356bp,B等位基因表现为170bp+186bp。结果表明,牦牛乳κ-酪蛋白可以分为AA型、AB型和BB型3种类型。牧场1、牧场2、牧场3为AA型,牧场5为AB型,牧场4、牧场6、牧场7为BB型。

2.3 κ-酪蛋白基因Hind III-RFLP位点的基因型、基因频率和基因型频率

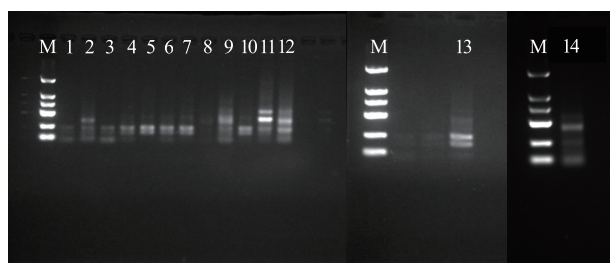
κ-酪蛋白基因经内切酶Hind III酶切后,表现出多态现象,检测到2个等位基因A和B,基因型有AA型、AB型和BB型3种。在牦牛乳Hind III的RFLP酶切位点,等位基因A的频率为0.3846,等位基因B的频率为0.6154,AA型、AB型和BB型3种基因型频率分别为0.3077、0.0769、0.6154。κ-酪蛋白BB型频率最高,AB型频率最低。



M. DNA marker; 1~2. 牧场 1 样品; 3. 牧场 2 样品; 4. 牧场 3 样品; 5. 牧场 4 样品; 6. 牧场 5 样品; 7. 牧场 6 样品; 8. 牧场 7 样品。

图 1 牦牛乳 κ -酪蛋白基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of κ -casein gene PCR amplified products from yak milk



M. DNA marker; 1. 牧场 4 样品, BB 型; 2. 牧场 1 样品, AA 型; 3. 牧场 4 样品, BB 型; 4. 牧场 6 样品, BB 型; 5. 牧场 7 样品, BB 型; 6. 牧场 6 样品, BB 型; 7. 牧场 7 样品, BB 型; 9. 牧场 2 样品, AA 型; 10. 牧场 7 样品, BB 型; 12. 牧场 3 样品, AA 型; 13. 牧场 7 样品, BB 型; 14. 牧场 5 样品, AB 型。

图 2 牦牛乳 κ -酪蛋白基因 PCR 扩增产物 *Hind* III 酶切电泳图

Fig. 2 *Hind* III enzymatic digestion electrophoresis diagram of κ -casein gene PCR amplified products from yak milk

2.4 标准品和样品液相色谱分析

图 3 为 HPLC 色谱图,可以看出, α_{s1} -酪蛋白标准品出峰时间大约为 14.5 min,且只有一个峰;牧场 1、牧场 2 出峰时间大约为 15 min,且只有 1 个峰;牧场 3、牧场 4、牧场 5 和牧场 7 在 14.5 min 和 15 min 都出峰,有 2 个峰;牧场 6 在 14.5 min 出峰,且只有 1 个峰。因此,可将样品分为 3 类:AA、AB 和 BB,其中 AA 型在 14.5 min 出峰,AB 型在 14.5 min 和 15 min 出峰,BB 型在 15 min 出峰。因此可以判断,牧场 6 为 AA 型,牧场 3、牧场 4、牧场 5 和牧场 7 为 AB 型,牧场 1、牧场 2 为 BB 型。

2.5 α_{s1} -酪蛋白多态性分析

将 α_{s1} -酪蛋白标准品出峰时间和出峰形状与各样品的出峰时间和出峰形状进行对比,结果发现 α_{s1} -酪蛋白表现出明显的多态性, α_{s1} -酪蛋白有 AA 型、AB 型和 BB 型 3 种基因型,AB 杂合型最为常见,占总数的 57.143%;AA 型占 14.286%;BB 型占 28.571%。

2.6 样品流变学特性检测

2.6.1 凝乳过程中动力黏度的变化 7 家牦牛乳加入凝乳酶后在 30 s^{-1} 的剪切速率下牦牛乳的动力黏度随时间变化见图 4。可以看出,牦牛乳在加入凝乳酶后的一段时间内动力黏度基本保持不变,之后出现明显上升,说明此时开始凝乳,其后快速上升,达到最大,随之下降,此时牦牛乳已经完全凝结,由于转子的转动破坏乳酪结构,乳清排出,其动力黏度下降。

由表 1 可以看出,未开始凝乳时的初始动力黏度为:牧场 3<牧场 4<牧场 5<牧场 2<牧场 6<牧场 1<牧场 7;凝乳后的最大动力黏度为:牧场 1<牧场 4<牧场 6<牧场 7<牧场 3<牧场 5<牧场 2。

2.6.2 凝乳过程中剪切应力的变化 7 家牦牛乳加入凝乳酶后在 30 s^{-1} 的剪切速率下牦牛乳的剪切应力随时间变化曲线见图 5。可以看出,凝乳过程剪切应力与动力黏度的变化趋势几乎相同,牦牛乳在加入凝乳酶后一段时间内剪切应力无明显变化,之后出现明显上升,此时已开始凝乳,其后快速上升,达到最大,然后下降,此时牦牛乳已经充分凝结,由于转子的转动破坏凝乳的整体状态,乳清排出,因此其剪切应力出现下降。

由表 2 可以看出,未开始凝乳时的初始剪切应力为:牧场 3<牧场 4<牧场 5<牧场 2<牧场 6<牧场 1<牧场 7;凝乳后的最大剪切应力为:牧场 4<牧场 1<牧场 7<牧场 6<牧场 3<牧场 5<牧场 2。

2.7 样品凝乳时间与奶酪得率

由表 3 可以看出,对于凝乳时间而言,牧场 5<牧场 7<牧场 1<牧场 4<牧场 3<牧场 2<牧场 6;对于奶酪得率而言,牧场 6<牧场 1<牧场 5<牧场 3<牧场 7<牧场 4<牧场 2。

2.8 乳蛋白多态性对牦牛乳凝乳特性的影响

2.8.1 κ -酪蛋白基因多态性与牦牛乳凝乳特性的分析 表 4 为 κ -酪蛋白不同基因型对牦牛乳凝乳特性的影响。可以看出,就凝乳时间而言,AA 型的

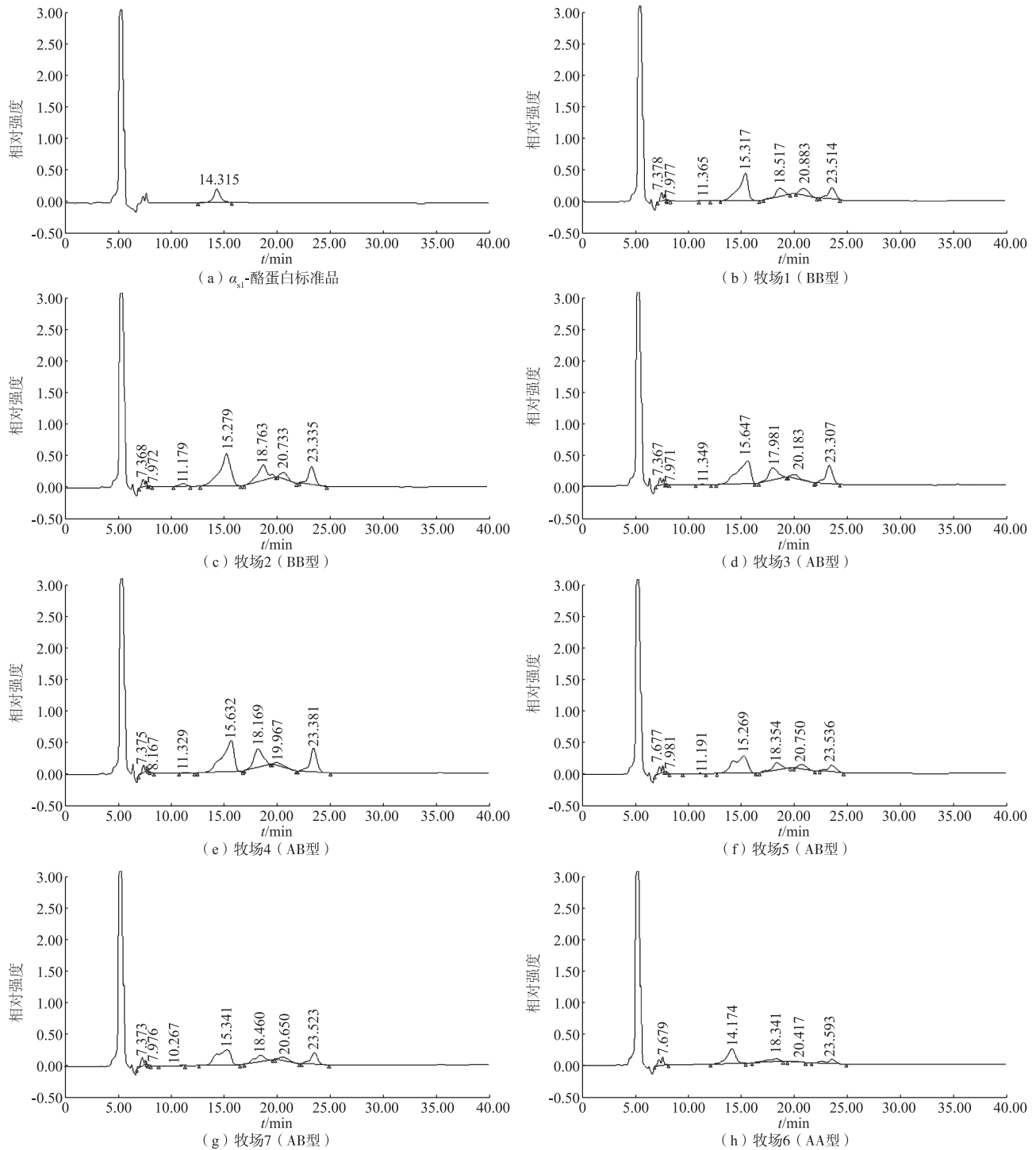


图3 乳蛋白标准品及不同牧场样品的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of milk protein standards and samples from different pastures

凝乳时间显著大于 AB 型($P<0.05$)和 BB 型($P>0.05$), 表明 A 等位基因对牦牛乳凝乳时间有显著影响。但各基因型个体间初始动力黏度、最大动力黏度、初始剪切应力、最大剪切应力和奶酪得率差异不显著

($P>0.05$)。对于凝乳时间而言, $AB<BB<AA$ 基因型; 对于最大动力黏度和最大剪切速率而言, $AA>AB>BB$ 基因型; 对于奶酪得率而言, $AA>BB>AB$ 基因型。

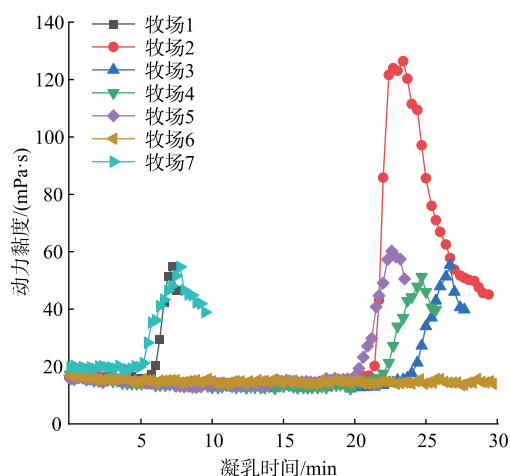


图 4 凝乳过程中动力黏度的变化

Fig. 4 Dynamic viscosity changes during the coagulation process

表 1 动力黏度物性参数

Table 1 Dynamic viscosity physical property parameters

牧场	初始动力黏度/ (mPa·s)	最大动力黏度/ (mPa·s)
牧场 1	16.3	46.0
牧场 2	14.7	126.4
牧场 3	13.8	55.4
牧场 4	13.9	51.3
牧场 5	14.5	60.2
牧场 6	14.8	53.7
牧场 7	19.7	54.7

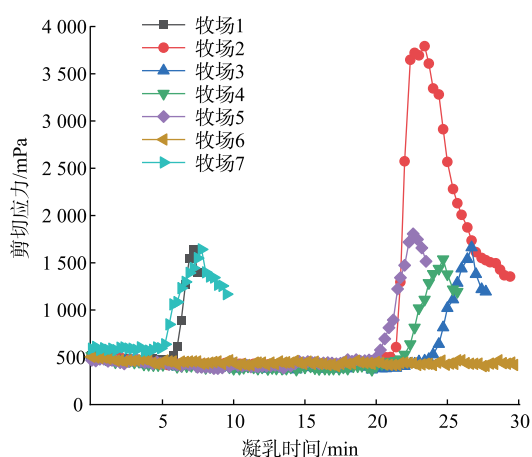


图 5 凝乳过程中剪切应力的变化

Fig. 5 Changes of shear stress during coagulation

2.8.2 α_{s1} -酪蛋白多态性与牦牛乳凝乳特性的分析
表 5 为 α_{s1} -酪蛋白不同基因型对牦牛乳凝乳特性的影响。可以看出,对于凝乳时间而言,AB<BB<AA 基

表 2 剪切应力物性参数

Table 2 Physical parameters of shear stress

牧场	初始剪切应力/ mPa	最大剪切应力/ mPa
牧场 1	490.0	1 641
牧场 2	440.1	3 792
牧场 3	412.8	1 662
牧场 4	416.8	1 538
牧场 5	432.9	1 806
牧场 6	444.2	1 654
牧场 7	591.7	1 642

表 3 样品凝乳时间与奶酪得率

Table 3 Coagulation time and cheese yield of samples

牧场	凝乳时间/min	奶酪质量/g	奶酪得率/%
牧场 1	14.33	6.721 3	67.21
牧场 2	19.63	8.386 7	83.87
牧场 3	19.07	7.424 5	74.25
牧场 4	18.08	7.510 9	75.11
牧场 5	10.77	6.630 7	66.31
牧场 6	21.02	6.623 7	66.24
牧场 7	10.83	7.433 4	74.33

因型;对于最大动力黏度和最大剪切速率而言,BB>AB>AA 基因型;对于奶酪得率而言,BB>AB>AA 基因型;就最大动力黏度、最大剪切应力、凝乳时间和奶酪得率而言,BB 型显著大于 AB 型 ($P<0.05$),但各类型间初始动力黏度和初始剪切应力差异不显著 ($P>0.05$)。

2.9 讨论

目前,乳蛋白多态性的检测大都是在蛋白质水平和 DNA 水平上进行,主要依据不同蛋白质的相对分子质量、电荷、极性等理化特性的差异进行分离检测^[23],检测方法除电泳技术外,常用 HPLC、质谱以及 PCR-SSCP 和 PCR-RFLP 等方法检测乳蛋白多态性^[22]。与早期分析牛乳蛋白在蛋白质水平上的遗传多态性的研究方法相比,从 DNA 水平上对乳蛋白基因多态性的研究更加准确快捷,不受年龄和性别的影响^[23]。HPLC 法准确度高,重现性好且操作简便,是直观检测牛乳中乳蛋白多态性的好方法^[14]。因此,作者采用 PCR-RFLP 和 HPLC 对乳蛋白多态性进行检测。

表 4 牦牛乳 κ -酪蛋白基因不同基因型的凝乳特性

Table 4 Coagulation characteristics of different genotypes of κ -casein gene in yak milk

基因型	初始动力黏度/ (mPa·s)	最大动力黏度/ (mPa·s)	初始剪切应力/ mPa	最大剪切应力/ mPa	凝乳时间/ min	奶酪得率/ %
AA	14.933±1.367	75.933±29.933	447.633±38.833	2 365.000±724.000	17.677±1.393 ^a	75.277±8.067
AB	14.500±0.120	60.200±5.000	432.900±9.000	1 806.000±46.000	10.770±0.100 ^b	66.310±0.000
BB	16.800±2.900	53.000±1.700	504.250±87.450	1 590.000±52.000	14.455±3.625 ^b	74.720±0.390

注:字母 a 和 b 表示差异显著($P<0.05$)。

表 5 牦牛乳 α_{s1} -酪蛋白不同基因型的凝乳特性

Table 5 Coagulation characteristics of different genotypes of α_{s1} -casein in yak milk

基因型	初始动力黏度/ (mPa·s)	最大动力黏度/ (mPa·s)	初始剪切应力/ mPa	最大剪切应力/ mPa	凝乳时间/ min	奶酪得率/ %
AA	14.800±0.000	53.702±0.000 ^b	444.200±0.000	1 654.000±0.000 ^b	21.020±0.000 ^a	66.240±0.000 ^b
AB	15.475±1.675	55.400±4.100 ^b	463.550±50.750	1 662.000±124.000 ^b	14.688±3.917 ^b	69.540±3.230 ^b
BB	15.500±0.800	86.200±40.200 ^a	465.050±24.950	2 716.500±1 075.500 ^a	16.980±2.650 ^b	75.540±8.330 ^a

注:字母 a 和 b 表示差异显著($P<0.05$)。

家养反刍动物(山羊、绵羊和牛)乳中所含的大部分蛋白质由 6 个特征良好的基因编码:LALAB、BLG、CSN1S1、CSN1S2、CSN2 和 CSN3 (α -LA; β -LG; α_{s1} -CN、 α_{s2} -CN、 β -CN 和 κ -CN)^[24]。一些 κ -酪蛋白基因(CSN-3)的研究已经证明了多态性与等位基因和基因型会影响泌乳性能^[23]。这种多态性实质上是由于乳蛋白合成的核苷酸链上发生了基因突变(如碱基替换、插入或缺失),在翻译时其氨基酸序列发生替代、插入或缺失,最终导致乳蛋白多态性的出现。Caroli 等对 κ -酪蛋白基因的测序显示了 DNA 和蛋白质水平上的高度多样性,并已描述了几种变异^[25]。A/B 基团的分化与第 IV 外显子上从 A 向 G 的转变有关,该转变的产生与氨基酸取代 D111G 有关^[26]。目前的研究发现, κ -酪蛋白基因定位于 6q31-33,有 3 个等位基因 A、B、F。同时研究者发现中国荷斯坦牛乳 κ -酪蛋白 A 等位基因频率为 0.79/0.781 0, B 等位基因频率为 0.21/0.219 0^[23]。本试验中牦牛乳 κ -酪蛋白 A 等位基因的频率为 0.384 6, B 等位基因的频率为 0.615 4。与现有研究荷斯坦牛乳相比,牦牛乳 κ -酪蛋白 A 等位基因频率较低, B 等位基因频率较高。3 种基因型 AA、AB、BB 频率分别为 0.307 7、0.076 9、0.615 4。 κ -酪蛋白的 BB 基因型频率最高, κ -酪蛋白的 AB 基因型频率最低。

有研究者检测北京 4 个牛场的 731 头荷斯坦奶牛发现, α_{s1} -酪蛋白有 4 种基因型 BB、AB、BC、

CC,且 BB 型个体最为常见^[27],对成都地区 40 头荷斯坦牛乳蛋白多态性进行检测发现, α_{s1} -酪蛋白只表现出 BB 一种基因型^[28]。据统计,已发现的 α_{s1} -酪蛋白有 A、B、C、D、E、F、G、H、I 共 9 种,荷斯坦奶牛中以 B 型最为常见。利用 HPLC 对乳蛋白进行检测, α_{s1} -酪蛋白表现出明显的多态性, α_{s1} -酪蛋白有 3 种基因型 AA、AB 和 BB。关于 α_{s1} -酪蛋白基因多态性研究报道较多,但对牦牛乳 α_{s1} -酪蛋白的研究较少。作者发现,在 α_{s1} -酪蛋白的各基因型中,对于凝乳时间而言,AB<BB<AA 基因型;对于最大动力黏度和最大剪切速率而言,BB>AB>AA 基因型;对于奶酪得率而言,BB>AB>AA 基因型。这些结果表明,在青海牦牛群体中 B 等位基因在凝乳时间、奶酪得率、最大动力黏度和最大剪切速率等方面均为优势基因。该结果与祝梅香^[27]、毛永江^[28]等的研究结果一致,可以推测影响牦牛乳凝乳特性的主效基因可能是 α_{s1} -酪蛋白 B 等位基因。B 等位基因可以作为改良牦牛乳凝乳特性的分子遗传标记物^[29],即具有 B 等位基因的牦牛更可能繁殖出相应高凝乳特性的后代,将来在选育高凝乳特性新品种时可以选择相应的基因型标记进行辅助育种。但由于本研究对乳样的组成成分以及酪蛋白含量对乳蛋白基因多态性和凝乳效果的影响并没有进行深入探讨,还应该结合更多因素做深入研究。

3 结 语

在采集的青海 7 家牧场共 42 份牦牛乳样品中, 牦牛乳 κ -酪蛋白和 α_{s1} -酪蛋白均存在 3 种基因型: AA、AB 和 BB 型。其中 κ -酪蛋白 A 等位基因对牦牛乳凝乳时间有显著影响, 是影响牦牛乳凝乳特

性的主效基因; α_{s1} -酪蛋白 B 等位基因对牦牛乳凝乳时间、奶酪得率、最大动力黏度和最大剪切速率有显著影响, 是影响牦牛乳凝乳特性的主效基因, 在奶酪加工过程中, 可优先选育具有 B 等位基因的牦牛。该研究结果为深入研究牦牛乳蛋白基因型对凝乳特性的影响机制提供了依据。

参考文献:

- [1] LI H M, MA Y, LI Q M, et al. The chemical composition and nitrogen distribution of Chinese yak (*Maiwa*) milk[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2011, 12(8):4885-4895.
- [2] 任卫合, 徐轶飞, 罗龙龙, 等. 牦牛乳的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(24):219-224.
REN W H, XU Y F, LUO L L, et al. Research progress of yak milk[J]. **Food Research and Development**, 2020, 41(24):219-224. (in Chinese)
- [3] 任大喜, 陈有亮, 缪淑颖, 等. κ -酪蛋白基因多态性与牛乳加工性能的关联[J]. 中国食品学报, 2012, 12(6):66-70.
REN D X, CHEN Y L, MIAO S Y, et al. Associations of κ -casein genetic polymorphism with milk processing characteristics[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2012, 12(6):66-70. (in Chinese)
- [4] 孔学民, 李丽丽, 白文娟, 等. *Mozzarella* 干酪凝乳过程中理化特性及微观结构的变化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2009, 35(5):549-553.
KONG X M, LI L L, BAI W J, et al. Changes of physical-chemical properties and microstructure of *Mozzarella* cheese during coagulation[J]. **Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences)**, 2009, 35(5):549-553. (in Chinese)
- [5] NG-KWAI-HANG K F, HAYES J F, MOXLEY J E, et al. Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors[J]. **Journal of Dairy Science**, 1987, 70(3):563-570.
- [6] FAN X Y, ZHANG Z F, QIU L H, et al. Polymorphisms of the kappa casein (*CSN 3*) gene and inference of its variants in water buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. **Archives Animal Breeding**, 2019, 62(2):585-596.
- [7] REN D X, CHEN B, CHEN Y L, et al. The effects of κ -casein polymorphism on the texture and functional properties of *Mozzarella* cheese[J]. **International Dairy Journal**, 2013, 31(2):65-69.
- [8] KAMINSKI S, CIESLINSKA A, KOSTYRA E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health[J]. **Journal of Applied Genetics**, 2007, 48(3):189-198.
- [9] 郑思凡, 马长路, 张文远, 等. 乳蛋白多态性和盐分布对牛乳凝乳性能的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(24):32-39.
ZHENG S F, MA C L, ZHANG W Y, et al. Effects of milk protein polymorphism and salt distribution on milk coagulation properties[J]. **Food Science**, 2021, 42(24):32-39. (in Chinese)
- [10] BISUTTI V, PEGOLO S, GIANNUZZI D, et al. The β -casein (*CSN2*) A2 allelic variant alters milk protein profile and slightly worsens coagulation properties in Holstein cows[J]. **Journal of Dairy Science**, 2022, 105(5):3794-3809.
- [11] VIGOLO V, FRANZOI M, PENASA M, et al. β -Casein variants differently affect bulk milk mineral content, protein composition, and technological traits[J]. **International Dairy Journal**, 2022, 124:105221.
- [12] 宗学醒, 闫清泉, 李志国, 等. 不同酪蛋白对块状再制干酪品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(12):63-67.
ZONG X X, YAN Q Q, LI Z G, et al. Effect of different casein on quality of block processed cheese[J]. **Food Research and Development**, 2019, 40(12):63-67. (in Chinese)
- [13] 刘亚楠, 任大喜, 刘建新, 等. 中国水牛乳蛋白基因多态性与乳蛋白组成的关联研究[J]. 中国畜牧杂志, 2016, 52(5):8-12.
LIU Y N, REN D X, LIU J X, et al. Relationship between the genetic polymorphism and protein composition in Chinese buffalo [J]. **Chinese Journal of Animal Science**, 2016, 52(5):8-12. (in Chinese)
- [14] 缪淑颖, 任大喜, 王侃, 等. 高效液相色谱法分析中国荷斯坦奶牛乳蛋白多态性[J]. 中国食品学报, 2012, 12(10):197-202.
MIAO S Y, REN D X, WANG K, et al. Milk protein polymorphism in Chinese Holstein determined by high-performance liquid chromatography[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2012, 12(10):197-202. (in Chinese)
- [15] 王思伟, 王学清, 石少轻, 等. 河北地区中国荷斯坦牛 *DGAT1* 基因多态性与泌乳性状遗传效应分析[J]. 中国奶牛, 2019(4):

- 14-20.
- WANG S W, WANG X Q, SHI S Q, et al. Analysis of genetic effects of K232A locus of DGAT1 gene on milk production traits in Chinese Holstein in Hebei Province[J]. **China Dairy Cattle**, 2019(4): 14-20. (in Chinese)
- [16] HECK J M, SCHENNINK A, VAN VALENBERG H J, et al. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk[J]. **Journal of Dairy Science**, 2009, 92(3): 1192-1202.
- [17] 李玲, 唐艳, 黄丽, 等. 水牛乳 α_{s1} 酪蛋白多态性对类蒙特利杰克半硬质干酪品质的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(10): 3986-3991.
- LI L, TANG Y, HUANG L, et al. Effect of buffalo α_{s1} -casein polymorphism on the quality of semi-hard Monterey Jack-type cheese[J]. **Journal of Food Safety & Quality**, 2016, 7(10): 3986-3991. (in Chinese)
- [18] 黄丽, 李玲, 杨攀, 等. 水牛 α_{s1} -酪蛋白多态性对马苏里拉干酪品质的影响 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2129-2134.
- HUANG L, LI L, YANG P, et al. Effect of buffalo α_{s1} -casein polymorphism on quality of *Mozzarella* type cheese[J]. **Journal of Food Safety & Quality**, 2017, 8(6): 2129-2134. (in Chinese)
- [19] 黄路. 人偏肺病毒分离株蛋白质特性及融合蛋白糖基化磷酸化分析[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2007.
- [20] HEWA NADUGALA B, PAGEL C N, RAYNES J K, et al. The effect of casein genetic variants, glycosylation and phosphorylation on bovine milk protein structure, technological properties, nutrition and product manufacture[J]. **International Dairy Journal**, 2022, 133: 105440.
- [21] 赵焯影, 刘振民, 雍靖怡, 等. 牛乳酪蛋白基因多态性研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2021, 44(1): 44-50.
- ZHAO X Y, LIU Z M, YONG J Y, et al. Progress in the study of bovine milk casein gene polymorphism[J]. **Journal of Dairy Science and Technology**, 2021, 44(1): 44-50. (in Chinese)
- [22] 崔艳华, 马莺, 何胜华, 等. 牛乳酪蛋白遗传多态性研究[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(5): 32-37.
- CUI Y H, MA Y, HE S H, et al. Casein protein polymorphisms in cattle milk[J]. **China Dairy Industry**, 2010, 38(5): 32-37. (in Chinese)
- [23] 郑新宝, 吴琳娜, 徐世永, 等. 中国荷斯坦奶牛 κ -酪蛋白基因多态性与泌乳性能关联性分析[J]. 草食家畜, 2013(6): 40-44.
- ZHENG X B, WU L N, XU S Y, et al. Correlation analysis of κ -casein gene polymorphism and lactation performance in China hesitan cow[J]. **Grass-Feeding Livestock**, 2013(6): 40-44. (in Chinese)
- [24] KUMAR A, ROUT P K, ROY R. Polymorphism of beta-lactoglobulin gene in Indian goats and its effect on milk yield[J]. **Journal of Applied Genetics**, 2006, 47(1): 49-53.
- [25] YAHYA OUI M H, ANGIOLILLO A, PILLA F, et al. Characterization and genotyping of the caprine kappa-casein variants[J]. **Journal of Dairy Science**, 2003, 86(8): 2715-2720.
- [26] KUMAR A, ROUT P K, MANDAL A, et al. Kappa-casein gene polymorphism in Indian goats[J]. **Indian Journal of Biotechnology**, 2009, 8(2): 214-217.
- [27] 祝梅香, 张沅. 北京地区荷斯坦牛乳蛋白多态性与产奶性能的相关分析[J]. 中国畜牧杂志, 2000, 36(2): 3-6.
- ZHU M X, ZHANG Y. Analysis of correlation between milk protein polymorphisms and dairy performance of Chinese Holstein in Beijing[J]. **Chinese Journal of Animal Science**, 2000, 36(2): 3-6. (in Chinese)
- [28] 毛永江, 杨章平, 郑玉才, 等. 成都地区中国荷斯坦牛乳蛋白多态性的研究[J]. 四川畜牧兽医, 2001, 28(3): 23-24.
- MAO Y J, YANG Z P, ZHENG Y C, et al. Milk protein polymorphisms in Chinese holsteins from Chengdu region[J]. **Sichuan Animal and Veterin Sciences**, 2001, 28(3): 23-24. (in Chinese)
- [29] 鞠志花, 李秋玲, 王洪梅, 等. 中国荷斯坦奶牛 κ -酪蛋白基因第四外显子多态性与产奶性状的关联分析[J]. 遗传, 2008, 30(10): 1312-1318.
- JU Z H, LI Q L, WANG H M, et al. Genetic polymorphism of κ -casein gene exon 4 and its correlation with milk production traits in Chinese Holstein cows[J]. **Hereditas**, 2008, 30(10): 1312-1318. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)