



IDENTIFIKACIJA GENETSKIH VARIJACIJA KOJE UTJEČU NA KOAGULACIJSKA SVOJSTVA MLIJEKA PAŠKE OVCE

Doktorand: Fabijan Oštarić

Mentori: doc.dr.sc. Nataša Mikulec, prof.dr.sc. Ino Čurik

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb
fostaric@agr.hr

Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet
Dan doktorata biotehničkog područja 2021.
16. i 17. rujna 2021.

UVOD

HIPOTEZE I CILJEVI

Mlijeko paške ovce se u cijelosti prerađuje u Paški sir zbog čega je potrebno razmotriti poboljšanje postojećih selekcijskih kriterija s genetskim karakteristikama koje izravno utječu na koagulacijska svojstva mlijeka, a indirektno na proizvodnju i kvalitetu sira.

Koagulacijska svojstva mlijeka (MCP) izražavaju se kroz: (i) vrijeme koje prođe od trenutka dodavanja sirila do početka koagulacije mlijeka (RCT, min), (ii) vrijeme koje je potrebno da gruša postigne odgovarajuću čvrstoću (CF, mm) od 20 mm (k_{20} , min) i (iii) čvrstoću gruša na kraju analize (A_{30} , mm).

U svrhu poboljšanja selekcije paške ovce potrebno je povezati genetsku varijabilnost sa koagulacijskim svojstvima (MCP).

Ovakav pristup doprinijeti će kvalitetnijoj selekciji paške ovce i povećanju randmana u proizvodnji Paškog sira.

Hipoteze:

- Unutar populacije paške ovce postoje genomske regije koje imaju značajan utjecaj na kvalitetu mlijeka za sirenje u proizvodnji ovčjeg sira.
- Unutar populacije paške ovce postoje jedinke čije mlijeko sporije koagulira.
- Koagulacijska svojstva su u visokoj korelaciji sa randmanom u proizvodnji ovčjeg sira.

Ciljevi:

- Analizirati pojedinačne uzorke mlijeka paške ovce na instrumentu *Formagraph* (*Foss Electric, Danska*) te odrediti varijabilnost koagulacijskih svojstava (MCP).
- Unutar populacije paške ovce identificirati genomske regije koje utječu na kvalitetu mlijeka za sirenje te izračunati njihovu korelaciju s istraživanim koagulacijskim svojstvima (MCP).
- Modelirati čvrstoću gruša (CF) kroz funkciju vremena (CFt) sa svrhom identifikacije jedinki čije mlijeko sporije koaguliraju (SC).

MATERIJALI I METODE

DIZAJN ISTRAŽIVANJA:

- FARMA-1 (O):**
 - 180 ovaca u laktaciji
- FARMA-2 (P):**
 - 350 ovaca u laktaciji
 - 235 ovaca u laktaciji

- Udaljenost između farme 1 (O) i farme 2 (P) < 2 km
- Identični okolišni i mikroklimatski uvjeti
- Identična hranidba (krmiva istog proizvođača)

DNA:

- Uzorkovanje** - tijekom mužnje pomoću aplikatora (*Tissue Sample Unit Applicator, Allflex*).

- Farma 1 (O) – 135 jedinki, (7 ovnova, 128 ovaca)
- Farma 2 (P) – 232 jedinke, (14 ovnova, 218 ovaca)

Mlijeko:

- AT metodom tijekom cijele laktacije
- 5 uzorkovanja
- 1500 pojedinačnih i 10 skupnih uzoraka na obje farme.

LABORATORIJSKE ANALIZE:

DNA:

- Izolacija** - *Dneasy Blood & Tissue Kit* (*Qiagen, Germany*) prema uputama proizvođača uz modifikacije ovisno o materijalu iz kojega se izolira DNA (tkivo, mlijeko).
- Provjera izolirane DNA** - (i) kvalitativno - gel elektroforeza, (ii) kvantitativno - *nanofotometar P330* (*Implen, Germany*).
- Evaporacija izolirane DNA** - *Savant DNA 120 SpeedVac* (*Thermo Scientific, USA*).
- Genotipiziranje** - GGP 50K (*Neogen, GB*)

Koagulacijska svojstva mlijeka:

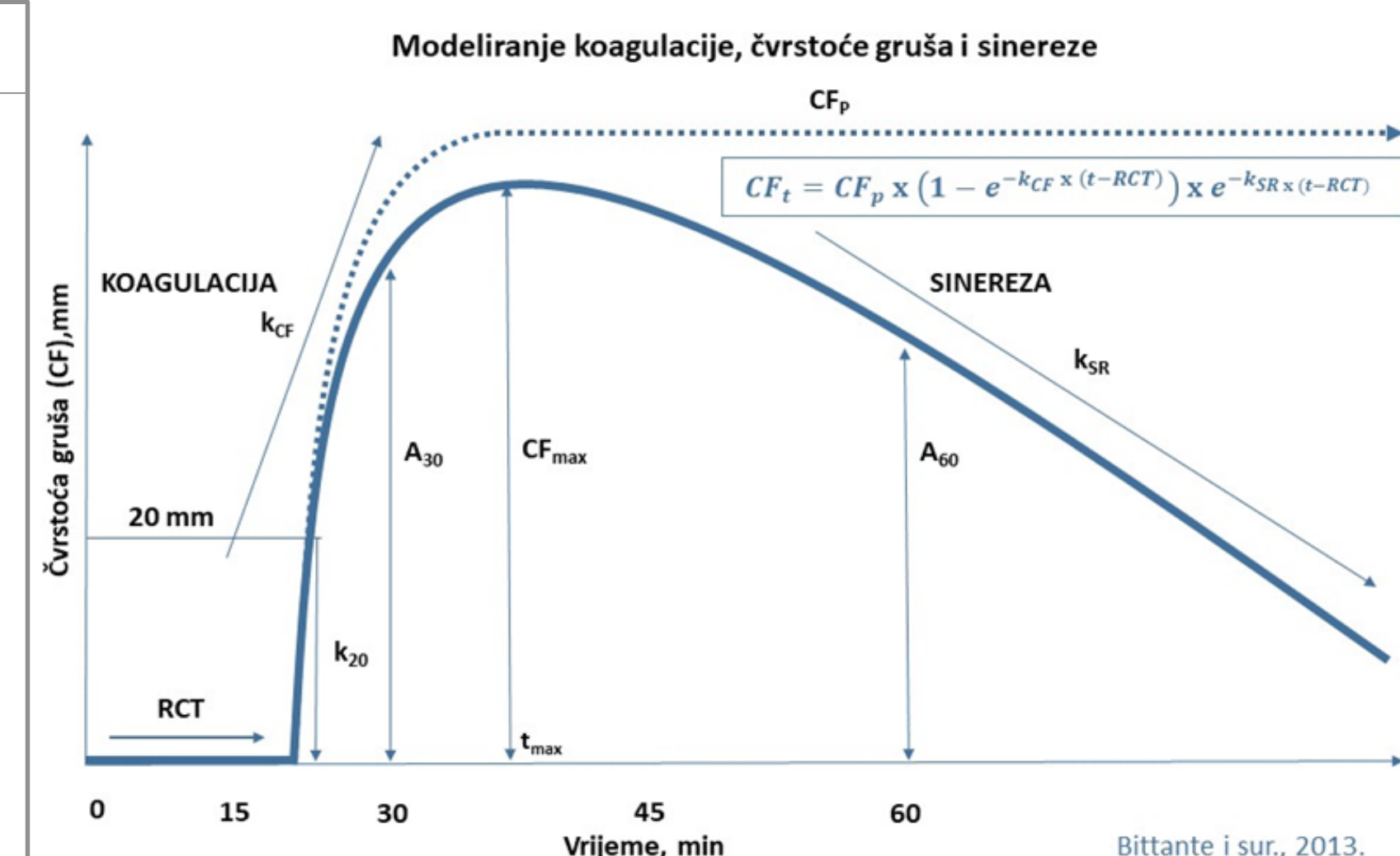
- RCT, k_{20} , A_{30}** - *Formagraph* (*Foss Electric, Danska*) trajanje analize 60 minuta.
- Sirilo** - *Bioren* (*Christian Hansen, Švedska*)
- Koncentracija sirila** - 0,051 IMCU/mL mlijeka, (Bittante i sur., 2013).
- Modeliranje čvrstoće gruša (CF)** - Bittante i sur., 2013. (slika 1)

Kemijski i fizikalni sastav mlijeka:

- Metoda infracrvene spektrofotometrije - *Milkoscan FT3* (*Foss Electric, Danska*).
- Parametri** - mliječna mast, proteini, laktoza, suha tvar, suha tvar bez masti, kazein, gustoća, citrična kiselina, titracijska kiselost, točka leđišta, slobodne masne kiseline i urea
- pH mlijeka** - pH metar *Seven Multi* (*Mettler Toledo, Švicarska*)
- Broj somatskih stanica (BSS) i ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (CFU):**
 - BSS** - fluoro-opto-elektronska metoda, *Fossomatic 90* (*Foss Electric, Danska*)
 - CFU** - metoda protočne citometrije uz korištenje internog faktora korekcije IBC-a (eng. Individual bacterial count), *Bactoscan FC* (*Foss Electric, Danska*)

Statistička obrada podataka:

- Analiza glavnih komponenti (PCA)** - R software, package „*SNPRelate*”
- Cjelogenomska asocijacijska analiza (GWAS)** - *SAS 9.4* (*Cary, NC: SAS Institute Inc.*)
- Obrada rezultata analize mlijeka** - General Linear Model (GLM) procedura, *SAS 9.4* (*Cary, NC: SAS Institute Inc.*)

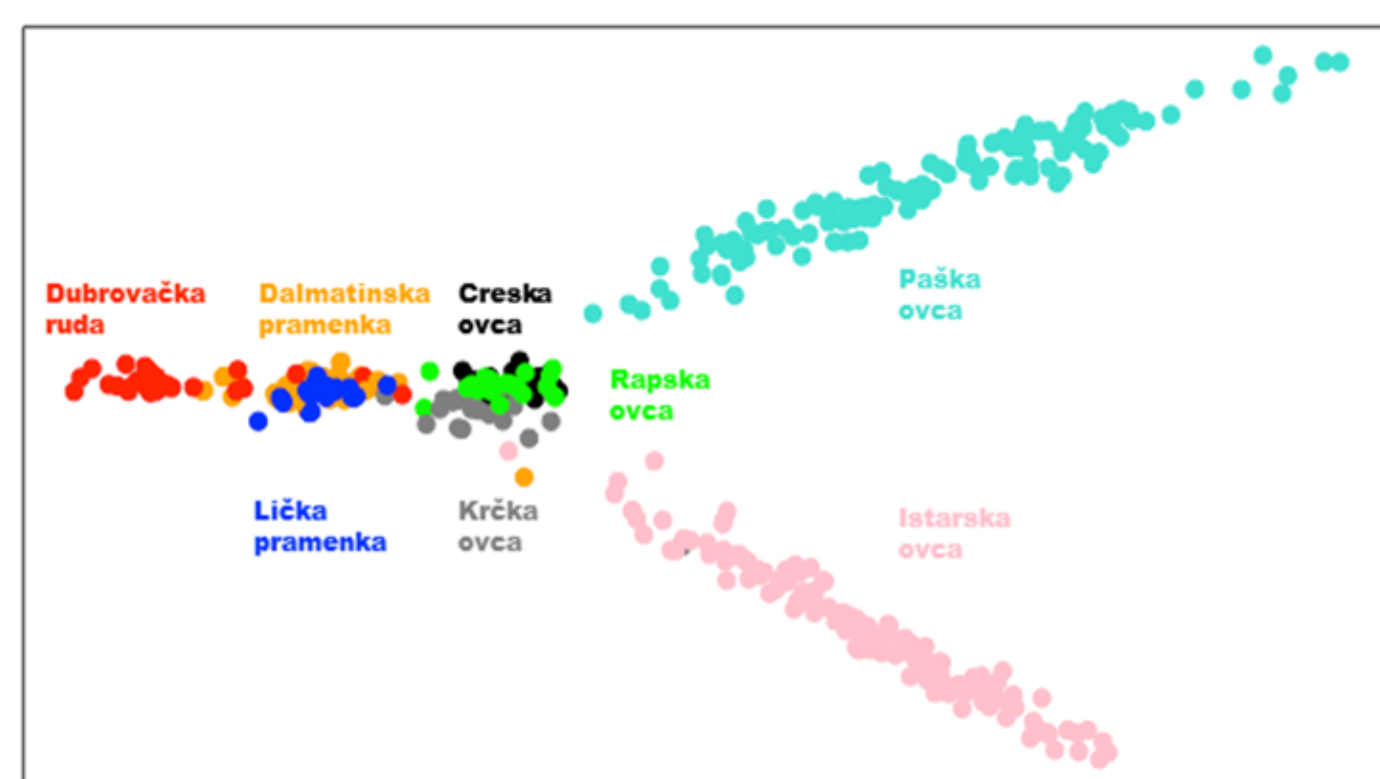


RCT_{eq}: početak koagulacije nakon dodavanja sirila (min)
 CF_p: potencijalna asimptotska čvrstoća gruša (CF) u odsutnosti sinereze (mm)
 k_{CF}: konstanta stope učvršćivanja gruša (% x min⁻²)
 k_{SR}: konstanta stope sinereze (% x min⁻¹)
 CF_{max}: maksimalna čvrstoća gruša (CF) (mm)
 t_{max}: vrijeme potrebno za postizanje maksimalne čvrstoće gruša CF_{max} (min)

Slika 1. Grafički prikaz modeliranja koagulacije, čvrstoće gruša i sinereze. Izvor: Bittante i sur., (2013)

DOSADAŠNJI REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Analiza glavnih komponenti (PCA)



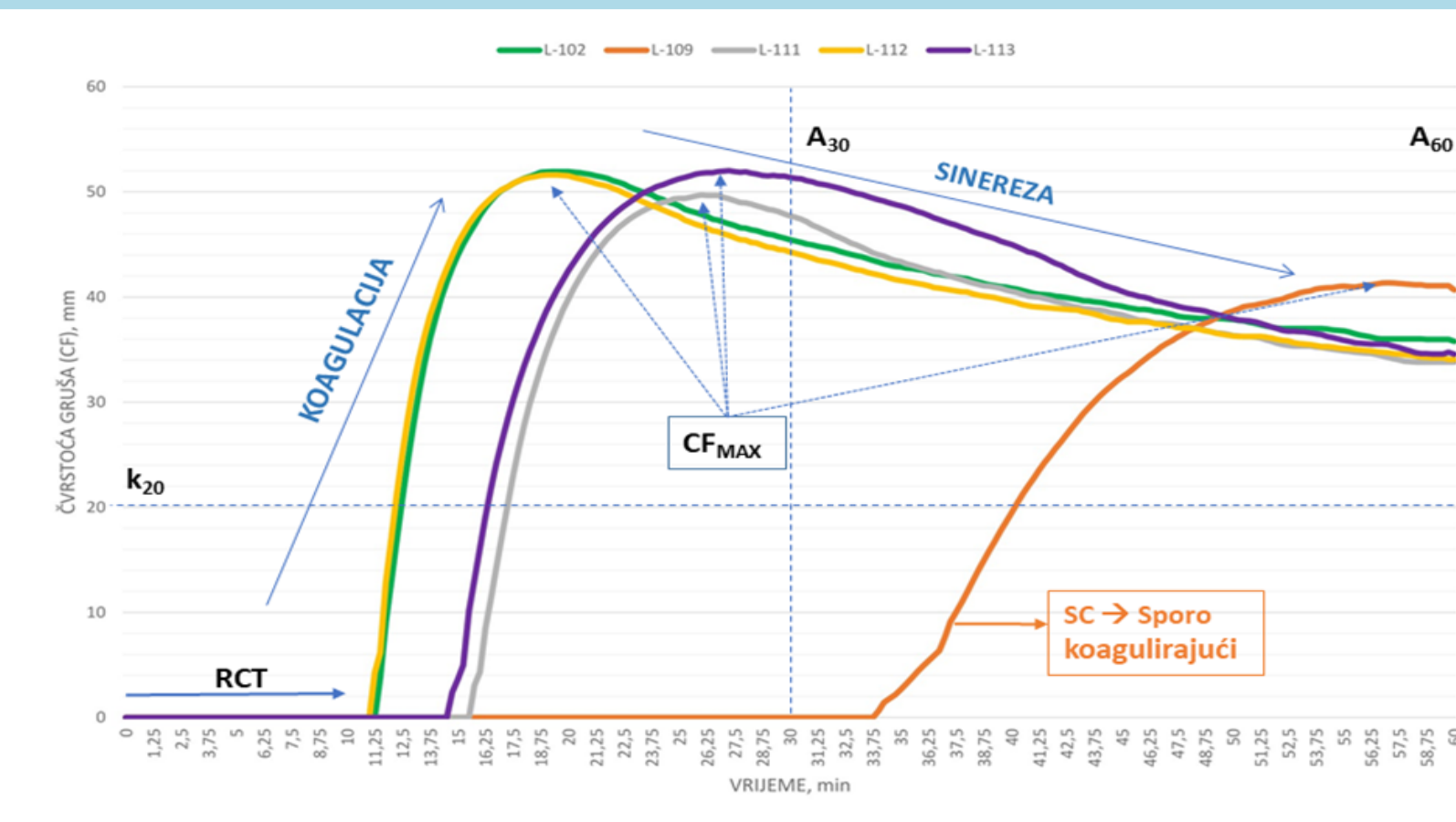
DNA:

- Analizom glavnih komponenti (PCA) utvrđena je homogenost pasmine (paška ovca) i nepostojanje preklapanja sa drugim hrvatskim izvornim pasminama.

Tablica 1. Srednje vrijednosti i standardna devijacija kemijskog sastava i fizikalnih svojstava mlijeka paških ovaca

Parametar:	FARMA 1 (O) (n=567)		FARMA 2 (P) (n=895)	
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
Mliječna mast (%)	6,74	0,86	6,86	1,27
Protein (%)	5,95	0,43	6,49	0,59
Suha tvar (%)	18,57	1,22	19,27	1,64
Suha tvar bez masti (%)	11,31	0,49	11,71	0,61
Laktoza (%)	4,47	0,17	4,39	0,30
Kazein (%)	4,66	0,32	5,06	0,44
Citrična kiselina (%)	0,16	0,02	0,17	0,03
Gustoća (g/L)	1034,79	1,49	1036,17	1,91
Slobodne masne kiseline (FFA) (meq)	0,54	0,07	0,51	0,10
Točka leđišta (°C)	- 0,558	0,02	- 0,562	0,02
Titracijska kiselost (TA) (°TH)	21,70	1,06	22,23	1,50
Urea (mg/100 mL)	37,35	7,25	34,35	10,30

\bar{X} - aritmetička srednja vrijednost, SD - standardna devijacija



RCT: početak koagulacije nakon dodavanja sirila (min)
 k₂₀: vrijeme potrebno da gruša postigne čvrstoću (CF) od 20 mm
 CF_{max}: maksimalna čvrstoća gruša (mm)
 A₃₀: čvrstoća gruša (CF) nakon 30 minuta
 A₆₀: čvrstoća gruša (CF) nakon 60 minuta
 Grafikon 1. Individualna mjerenja čvrstoće gruša (CF) kroz vrijeme (min). Prikazuje srednje vrijednosti od dva ponavljanja za 5 pojedinačnih uzoraka

OČEKIVANI ZNANSTVENI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

ZAHVALA

- Bolje razumijevanje koagulacijskih svojstava ovčjeg mlijeka i genetskih varijacija koje na njih utječu.
- Inovativan pristup razumijevanju svojstava koje utječu na kvalitetu mlijeka za sirenje u proizvodnji sira rezultirati će poboljšanjem selekcijskih kriterija u uzgoju ovaca čije se mlijeko prerađuje u sir.
- Rad će postaviti temelje za buduća znanstvena istraživanja koagulacijskih svojstava te randmana i kvalitete mlijeka u proizvodnji sira.

- Istraživanje se provodi u sklopu projekta „Potencijal mikroinkapsulacije u proizvodnji sireva” K.K.01.1.1.04.0058 koji je financiran iz programa EU - Konkurentnost i Kohezija 2014-2020.



Literatura:

- Bittante, G., Contiero, B., & Cecchinato, A. (2013). Prolonged observation and modelling of milk coagulation, curd firming, and syneresis. *International Dairy Journal*, 29(2), 115–123, doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.007.