

IDENTYFIKACJA I WŁAŚCIWOŚCI PROZDROWOTNE MLEKA ZAWIERAJĄCEGO β -KAZEINĘ TYPU A2

Iwona Radkowska

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Hodowli Bydła, 32-083 Balice k. Krakowa
e-mail: iwona.radkowska@izoo.krakow.pl, tel.: 666 081 249
ORCID: 0000-0002-8780-1585

Najnowsze odkrycia naukowe dotyczące diety, a także nowe trendy żywieniowe wskazują na potrzebę głębszego spojrzenia na produkty pochodzenia zwierzęcego. Coraz częściej podnoszona jest kwestia tego, iż spożywanie produktów mlecznych, które przyczyniają się do zwiększonego uwalniania opioidowych peptydów może mieć niekorzystne konsekwencje zdrowotne. Dotyczy to głównie osób cierpiących na alergię pokarmową i problemy trawienne oraz dzieci dotkniętych zaburzeniami autystycznymi. W ostatnim czasie duże zainteresowanie ze względów zdrowotnych wzbudza zawarta w mleku β -kazeina, której najczęściej występującymi wariantami genetycznymi są kazeina A1 i A2. Badania wykazują, iż powstająca w wyniku trawienia kazeiny typu A1 beta-kazomorfina-7 (BCM-7) może wpływać na rozwój poważnych chorób u ludzi, takich jak: miażdżyca, zespół nagłej śmierci niemowląt oraz choroby układu krążenia. Ponadto liczne badania wykazały związki między BCM-7 a problemami neurologicznymi takimi jak autyzm i schizofrenia. Mleko zawierające β -kazeinę typu A2 nie wykazuje takich właściwości. Obecność danego wariantu β -kazeiny w mleku krowim uwarunkowana jest genetycznie, a uznanie wariantu A1 jako niepożądanego doprowadziło do podjęcia próby selekcji krów mlecznych w zależności od ich polimorfizmu. Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie aktualnych wyników badań dotyczących identyfikacji krów pod względem wariantu beta-kazeiny oraz jej wpływu na zdrowie ludzi.

Słowa kluczowe: mleko, β -kazeina, kazeina typu A2

Produkty mleczne, zwłaszcza wytworzone z mleka krowiego, są jednym z głównych składników diety ludzi na całym świecie, a ich spożycie stale rośnie. Mleko posiada korzystne właściwości odżywcze, jest źródłem białek, lipidów, witamin i minerałów oraz związków biologicznie aktywnych, oddziałujących wielokierunkowo na organizm człowieka (Kuczyńska i in., 2011). Do bioaktywnych składników mleka zaliczamy: immunoglobuliny, hormony, cytokiny, poliamidy, enzymy, nukleotydy, jedno- i wielonienasycone kwasy tłuszczowe, witaminy rozpuszczane w tłuszczach, karotenoidy, fosfolipidy (Séverin i Wenshui, 2005), które stymulują odpowiedź immunologiczną lub oddziałują na poziomie fizjologicznym organizmu. Produkty spo-

żywcze zawierające składniki „bioaktywne”, określane bywają jako żywność funkcjonalna. Niestety wiele badań sugeruje, iż rosnące spożycie produktów mlecznych może przyczyniać się do wzrostu ryzyka lub nasilenia objawów niektórych zaburzeń, w tym chorób przewodu pokarmowego (Barnett i in., 2014; Haq i in., 2014) oraz związanych z układem odpornościowym i stanami zapalnymi (Holmer-Jensen i in., 2011; Haq i in., 2014). Szczególną rolę w tym zakresie odgrywają białka mleka krowiego, które są powszechnym źródłem bioaktywnych peptydów uwalnianych w wyniku trawienia kazeiny i białek serwatkowych. Biopeptydy zostały zdefiniowane jako specyficzne fragmenty białek, które mają pozytywny wpływ na funkcje lub stan organizmu i mogą ostatecznie wpływać na zdrowie (Kitts i Weiler, 2003). Zwłaszcza kazeiny stanowią rezerwuuar bioaktywnych peptydów, związków regulatorowych o działaniu podobnym do hormonów, które mogą wpływać na wartość odżywcza mleka (Lorenzini i in., 2007).

Białka mleka krowiego

Zawartość białek w mleku krowim wynosi 2,5–4,2%. Największy udział mają kazeiny, które stanowią około 80% białek mleka. Kazeina występuje w 4 formach: α S1-kazeina (CSN1S1), α S2-kazeina (CSN1S2), β -kazeina (CSN2), κ -kazeina (CSN3). Frakcje te, kodowane przez pojedyncze geny (odpowiednio *CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2*, *CSN3*), zlokalizowane są w obrębie chromosomu 6 (Rijnkels, 2002). Białka serwatkowe stanowią około 20% ogółu białek, są to: β -laktoglobulina (β -LG), α -laktoalbumina (α -LA) i albumina surowicy bydlęcej (BSA) (El-Agamy, 2007; Barłowska i in., 2011). W badaniach wykazano zmienną w zależności od rasy zawartość w mleku β -laktoglobuliny, α -laktoalbuminy oraz laktoferyny. Najwyższy poziom tych związków stwierdzono w mleku krów rasy polskiej czerwonej w porównaniu z rasami jersey, simental, polską holsztyńsko-fryzyjską oraz białogrzbietą (Król i in., 2013). Badania naukowe wykazują, iż białka serwatkowe zaliczane są do związków aktywnych biologicznie, posiadających właściwości antyoksydacyjne, immunoaktywne, antybakteryjne, antywirusowe oraz antynowotworowe. Bioaktywne działania białek serwatkowych α -laktoglobuliny i β -laktoglobuliny mogą być wykorzystane w szerokiej grupie produktów spożywczych spełniających funkcję żywności funkcjonalnej. Niestety w wyniku hydrolizy enzymatycznej z białek mogą powstawać także peptydy będące przyczyną nadwrażliwości lub alergii (Szwajkowska i in., 2011). Są to aktywne peptydy, tzw. opioidy, czyli substancje chemiczne, które w organizmie wykazują działanie podobne do morfiny. Łączą się one z receptorami opioidowymi μ znajdującymi się w ośrodkowym układzie nerwowym i przewodzie pokarmowym (Teschemacher, 2003), przez co mogą np. łagodzić ból. Są one nieaktywne w sekwencji białka macierzystego, jednak mogą być uwalniane podczas trawienia żołądkowo-jelitowego lub przetwarzania pokarmu (Kamiński i in., 2007).

Wśród przeżuwaczy dogłębnie zbadano geny białek mleka u bydła i kóz, co pozwoliło na zidentyfikowanie i scharakteryzowanie znacznej zmienności genetycznej. Konsekwencją tej zmienności genetycznej są różne warianty białek mleka, które wpływają na skład mleka i właściwości serowarskie (Martin i in., 2002). Jest to związane z funkcjonalnymi modyfikacjami białka, głównie wymianami lub delecjami alleli, które wpływają na właściwości biologiczne kodowanego białka. Zidentyfikowane

różne warianty białek mleka zostały wykorzystane w badaniach dotyczących charakterystyki ras (Ceriotti i in., 2004), bioróżnorodności (Mahé i in., 1999) oraz ewolucji zarówno na temat zasobów zwierzęcych, jak i genów białek mleka (Ibeagha-Awemu i in., 2007).

β -kazeina

W ostatnim czasie duże zainteresowanie, ze względów zdrowotnych wzbudza β -kazeina, zawierająca w swoim łańcuchu białkowym 209 reszt aminokwasowych (Farrell i in., 2004). Istnieje 12 genetycznych wariantów β -kazeiny: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G (tab. 1), jednak tylko siedem z nich (A1, A2, A3, B, C, I i E) wykryto u europejskich ras bydła (Massella i in., 2017). Najczęstszymi wariantami genetycznymi β -kazeiny (*CSN2*) są A1 i A2, wariant B jest mniej powszechny, a A3 i C są bardzo rzadkie (Farrell i in., 2004; Kamiński i in., 2007). Wariant I pochodzi z mutacji wariantu A2 i ma niską częstotliwość występowania. Jednak u niektórych ras, np. italian holstein friesland, italian red pied i dutch holstein friesland, częstość występowania tego wariantu może dochodzić do 0,120–0,190 (Jann i in., 2002). Natomiast wariant E został zidentyfikowany wyłącznie u włoskiej rasy piemontese (Voglino, 1972).

Wariant A2 wchodzący w skład mleka krowiego swoją budową przypomina β -kazeinę mleka kobiecego, dlatego mleko to może „naśladować” mleko matki, przyczyniając się do utrzymania optymalnego wzrostu i rozwoju dziecka (Sadler, 2013). Ponadto przypuszcza się, że spożywanie mleka, w którym obecny jest wariant A2 β -kazeiny może przyczynić się do złagodzenia objawów autyzmu i schizofrenii (Ganguly i in., 2013).

Tabela 1. Zmiany w sekwencji aminokwasów wariantów β -kazeiny (Sebastiani i in., 2020)
Table 1. The change in the amino acid sequence of β -casein variants (Sebastiani et al., 2020)

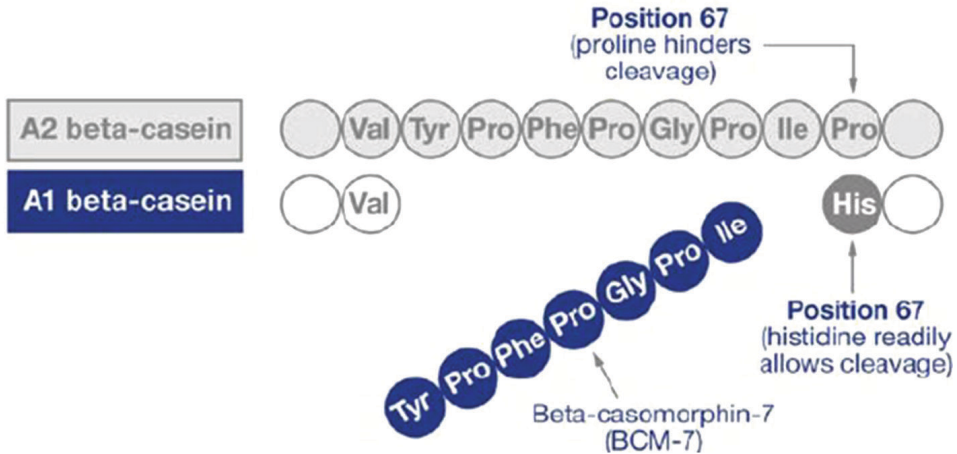
Wariant beta-kazeiny Beta-casein variant	Pozycje aminokwasów Amino acid position								
	36	37	67	72	88	93	106	122	138
A2	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	His	Ser	Pro
A1	Glu	Glu	His	Gln	Leu	Met	His	Ser	Pro
A3	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	Gln	Ser	Pro
B	Glu	Glu	His	Gln	Leu	Met	His	Arg	Pro
C	Glu	Lys	His	Gln	Leu	Met	His	Ser	Pro
D	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	His	Ser	Pro
E	Lys	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	His	Ser	Pro
F	Glu	Glu	His	Gln	Leu	Met	His	Ser	Leu
G	Glu	Glu	His	Gln	Leu	Met	His	Leu	Pro
H1	Glu	Glu	Pro	Gln	Ile	Met	His	Ser	Pro
H2	Glu	Glu	Pro	Glu	Leu	Leu	His	Ser	Glu
I	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Leu	His	Ser	Pro

Arg – arginina, Gln – glutamina, Glu – kwas glutaminowy, His – histydyna, Ile – izoleucyna, Leu – leucyna, Lys – lizyna, Met – metionina, Pro – prolina, Ser – seryna.

Arg – arginine, Gln – glutamine, Glu – glutamic acid, His – histidine, Ile – isoleucine, Leu – leucine, Lys – lysine, Met – methionine, Pro – proline, Ser – serine.

W zależności od struktury genetycznej poszczególnych krów w mleku może być

obecny jeden lub obydwa typy β -kazeiny. Kazeina A1 i A2 różnią się budową białka, mutacja powodująca różnice w białku β -kazeiny jest wynikiem polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w kodonie 67 w eksonie 7 genu *CCT* (A2, prolina), na *CAT* (A1, histydyna), zatem kazeina A2 zawiera resztę proliny, podczas gdy kazeina A1 resztę histydyny, co pozwala na odcięcie poprzednich siedmiu reszt aminokwasowych i tworzenie β -kazomorfiny-7 (BCM-7) (Jinsmaa i Yoshikawa, 1999) (ryc. 1).



Ryc. 1. Uwalnianie beta-kazomorfiny-7 z wariantu β -kazeiny A1 w układzie pokarmowym człowieka (Woodford, 2009)

Ryc. 1. Release of beta-casomorphine-7 from β -casein A1 variant in the human digestive system (Woodford, 2009)

Badania wykazały, iż powstająca w wyniku trawienia kazeiny typu A1 β -kazomorfina-7, która jest ważnym bioaktywnym peptydem o silnej aktywności opioidowej, może wpływać na rozwój niektórych poważnych chorób u ludzi. Bardzo istotne jest to, iż nie zaobserwowano tego niekorzystnego działania w odniesieniu do kazeiny A2. Może to wynikać z faktu, iż w mleku z wariantem kazeiny A1 poziom BCM-7 jest 4-krotnie wyższy niż w mleku A2 (Kamiński i in., 2007). β -kazomorfina-7 (BCM-7: Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile), jako peptyd o aktywności podobnej do morfiny, wyodrębniono po raz pierwszy w 1979 r. (Brantl i in., 1979).

Wpływ β -kazomorfiny 7 (BCM-7) na zdrowie ludzi

W badaniach naukowych udowodniono, że BCM-7 może odgrywać znaczącą rolę w etiologii wielu chorób u ludzi. Wykazano, że BCM-7 może być czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia choroby niedokrwiennej serca, miażdżycy tętnic, cukrzycy typu 1 i zespołu nagłej śmierci niemowląt (Thorsdottir i in., 2000; McLachlan, 2001; Laugesen i Elliott, 2003; Sun i in., 2003; Tailford i in., 2003; Kamiński i in., 2007; Ganguly i in., 2013). β -kazomorfina-7 (BCM-7) może działać jako śro-

dek immunosupresyjny i osłabiać tolerancję na antygeny pokarmowe w układzie odpornościowym jelita, co z kolei może przyczyniać się do wystąpienia cukrzycy typu 1 T1D (Clemens, 2011). Populacje spożywające mleko zawierające wysoki poziom β -kazeiny A2 mają niższą zapadalność na choroby sercowo-naczyniowe i cukrzycę typu 1. Badania prowadzone *in vitro* potwierdziły zależność pomiędzy wysokim poziomem β -kazomorfiny-7 a zwiększeniem liczby limfocytów oraz innych markerów stanu zapalnego (Pal i in., 2015). Z kolei w badaniach, które przeprowadzili Jianqin i in. (2016), wykazano, iż spożycie mleka zawierającego kazeinę A1 daje objawy podobne do nietolerancji laktozy, powoduje stany zapalne żołądkowo-jelitowe, opóźniony tranzyt bodźców oraz zmniejszenie szybkości i dokładności przetwarzania pożywczego. Ponadto stwierdzono, iż eliminacja β -kazeiny A1 osłabiła te działania, dlatego niektóre objawy nietolerancji laktozy mogą wynikać z wywołanego przez nią stanu zapalnego i można ich uniknąć, spożywając mleko zawierające tylko kazeinę typu A2. Liczne badania wykazały również związki między β -kazeiną A1 (BCM-7) a problemami neurologicznymi takimi jak autyzm (Reichelt i Knivsberg, 2003; Kawashti i in., 2006; Jarmołowska i in., 2019) i schizofrenia (Niebuhr i in., 2011; Sevrance i in., 2011). W tym aspekcie warto zwrócić uwagę na fakt, że podwyższona immunoreaktywność BCM-7 może wpływać na opóźniony rozwój psychomotoryczny niemowląt (Kost i in., 2009). Niektóre wyniki sugerują, że β -kazeina A1 i jej pochodne peptydowe wpływają również na przetwarzanie informacji w mózgu. Wykazano, że peptydy opioidowe pochodzące z pożywienia wywierają różnorodny bezpośredni wpływ na komórki nerwowe, w tym ekspresję genów biorących udział w procesach redoks i metylacji oraz regulacji epigenetycznej. Zasugerowano, że peptydy pochodzące z mleka mogą wywoływać stany zapalne i ogólnoustrojowe utlenianie, w tym w ośrodkowym układzie nerwowym (Trivedi i in., 2014), a efekty te mogą także wpływać na rozwój lub przetwarzanie informacji.

Warto dodać, że w ostatnich 40 latach istotnie wzrosła na świecie liczba dzieci, u których diagnozuje się zaburzenia rozwojowe związane z autyzmem. Pomimo tego, że trwają intensywne badania nad przyczynami tego zjawiska, etiologia tej choroby nadal nie jest dobrze poznana (Skonieczna-Żydecka i in., 2017). Wśród czynników środowiskowych przyczyniających się do pogłębiania objawów związanych z tą chorobą coraz częściej wymienia się nieodpowiednią dietę, w tym właśnie stosowanie produktów mlecznych (Lange i in., 2015). Ostatnie badania Jarmołowskiej i in. (2019) przeprowadzone na grupie zdrowych i autystycznych dzieci spożywających powszechnie dostępne pasteryzowane mleko wskazały, że dzieci z zaburzeniami autystycznymi miały istotnie wyższy poziom β -kazomorfiny-7 we krwi oraz w moczu. Inne badania potwierdziły, że unikanie peptydów opioidowych zawartych w produktach mlecznych u dzieci z autyzmem skutkuje poprawą ich stanu emocjonalnego, zwiększoną łatwością budowania relacji społecznych, jak również wpływa na zmniejszenie objawów chorób autoimmunologicznych (Pennesi i Klein, 2012; Pedersen i in., 2014).

Kliniczne implikacje mleka z β -kazeiną A1 na zdrowie człowieka wciąż są przedmiotem dyskusji, dlatego należy zwrócić szczególną uwagę na polimorfizm białek i potrzebne są głębsze badania w celu zweryfikowania zasięgu i charakteru jego interakcji z ludzkim przewodem pokarmowym i całym organizmem (Kamiński i in.,

2007). Raport opublikowany przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności, ze względu na sprzeczne wyniki dotyczące potencjalnego wpływu β -kazomorfiny i pokrewnych peptydów na zdrowie oraz brak możliwości ustalenia związku przyczynowo-skutkowego między doustnym przyjmowaniem β -kazomorfiny-7 a etiologią sugerowanych chorób, nie zaleca formalnej oceny ryzyka tych peptydów (EFSA, 2009). Jednak według Caroli i in. (2009) nie wyklucza to, iż mleko pochodzące od krów posiadających określone genotypy może być polecane jako bardziej odpowiednie dla ludzi w niektórych problemach zdrowotnych.

Identyfikacja i występowanie wariantów genów β -kazeiny u różnych ras bydła

Głównymi czynnikami wpływającymi na obecność β -kazeiny typu A1 w mleku krowim są uwarunkowania genetyczne. Uznanie wariantu A1 jako niepożądanego doprowadziło do podjęcia próby selekcji krów mlecznych w zależności od ich polimorfizmu. Hodowla ukierunkowana na mleko A2 nie niesie ze sobą ryzyka, gdyż nie ma żadnej negatywnej korelacji pomiędzy występowaniem genu *A2A2* a innymi cechami. W badaniach wykazano, iż genotypowanie buhajów pod względem β -kazeiny i preferowanie allelu A2 może przynieść dwie korzyści: zwiększenie wartości hodowlanej w zakresie zawartości białka i zmniejszenie częstości występowania wariantu białka A1, uznanego za czynnik ryzyka dla zdrowia ludzi (Oleński i in., 2010). Oznacza to, że producenci mleka mogą wprowadzić to kryterium do swojego programu hodowlanego w pełni bezpiecznie i bez ryzyka. Znaczenie badań nad zdrowiem ludzkim i określenia polimorfizmu β -kazeiny u bydła mlecznego doprowadziło do opracowania wielu metod badawczych, opartych na mikromacierzy lub amplifikacji DNA (tj. polimorfizm długości fragmentu restrykcyjnego-PCR; dwukierunkowa PCR specyficzna dla allelu; multipleks-PCR) i sekwencjonowanie, koncentrujące się na mutacjach łańcucha nukleotydowego (Massella i in., 2017).

Na świecie prowadzone są liczne badania w celu identyfikacji krów i buhajów w kierunku β -kazeiny A2 (tab. 2). W badaniach Sebastiani i in. (2020), w których przebadano krowy włoskiej rasy holsztyńsko-fryzyskiej z 17 gospodarstw położonych w środkowych Włoszech, stwierdzono, iż allel A2 był najczęściej spotykany, a jego frekwencja wynosiła 60,65%, następnie allel A1 – 30,39%, allel B – 5,68%, allel I – 3,10%, allel A3 – 0,15%, oraz allel C – 0,03%. Podobnie wyniki badań, które przeprowadzili Massella i in. (2017) we Włoszech na 1226 krowach rasy holsztyńsko-fryzyskiej i 4 rasy braunvieh wykazały, iż pożądaný allel A2 wykazywał wyższą częstość występowania (0,546) niż allel A1 (0,371). Stwierdzono jednak więcej heterozygotycznych genotypów A1A2, których częstotliwość występowania wynosiła 0,403, natomiast homozygotycznego genotypu A2A2 – 0,301.

Miluchová i in. (2014), badając polimorfizm β -kazeiny u trzech ras bydła, stwierdzili: homozygotyczny genotyp A1A1, heterozygotyczny genotyp A1A2 i homozygotyczny genotyp A2A2 o frekwencji 0,1261, 0,3333 i 0,5405 dla rasy simentaliskiej; 0,1379, 0,4598 i 0,4023 dla rasy holsztyńskiej oraz 0,3034, 0,5168 i 0,1798 u rasy pinzgau. W populacji rasy simentaliskiej i holsztyńskiej częściej występował allel A2 (0,7072 i 0,6322), z kolei w populacji rasy pinzgau allel A1 (0,5618).

Wiele badań dotyczy także lokalnych ras bydła, u których frekwencja genotypu A2A2 jest znacznie wyższa niż w ras wysokoprodukcyjnych. Częstość występowania

allelu A1 u różnych ras waha się od 0,01–0,06 (guernsey), 0,12 (jersey), 0,31–0,66 (HF) do 0,720 (ayrshire) (Kamiński i in., 2007).

Tabela 2. Występowanie wariantów genów β -kazeiny A1 i A2 u różnych ras bydła (na podstawie: Kamiński i in., 2007; Şahin i in., 2018; Cieślińska i in., 2019)

Table 2. Occurrence of β -casein A1 and A2 gene variants in various cattle breeds (adapted from Kamiński et al., 2007; Şahin et al., 2018; Cieślińska et al., 2019)

Rasa Breed	Kraj Country	N	Częstotliwość alleli Allele frequency		Literatura References
			A1	A2	
1	2	3	4	5	6
HF	Denmark	415	0,266	0,614	Gustavsson i in., 2014
	The Netherlands	1929	0,28	0,50	Visker i in., 2010
	The Netherlands	1629	0,029	0,69	Heck i in., 2009
	Poland	177	0,32	0,68	Cieślińska i in., 2012
	Poland	650	0,35	0,65	Oleński i in., 2012
	Italy	1226	0,371	0,546	Massella i in., 2017
	Poland	143	0,40	0,60	Kamiński i in., 2006
	China	133	0,432	0,459	Dai i in., 2016
	Iran	119	0,50	0,50	Gholami i in., 2016
Simmental	Slovakia	111	0,292	0,707	Miluchová i in., 2014
	Croatia	621	0,190	0,630	Curik i in., 1997
	Germany	229	0,343	0,566	Ehrmann i in., 1997
Jersey	Germany	43	0,093	0,721	Ehrmann i in., 1997
	Denmark	157	0,070	0,580–0,650	Bech i Kristiansen, 1990
	New Zealand	1328	0,123	0,591	Winkelman i Wickham, 1997
Red	Sweden	392	0,48	0,51	Gustavsson i in., 2014
	Denmark	169	0,71	0,23	Bech i Kristiansen, 1990
	Poland	201	0,53	0,47	Cieślińska i in., 2019
Brown Swedish	Germany	232	0,108	0,705	Ehmann i in., 1997
	USA	259	0,140–0,180	0,660–0,720	Eenennaam i Medrano, 1991
Guernsey	USA	3861	0,010–0,060	0,880–0,970	Eenennaam i Medrano, 1991
Black-and-White	Denmark	223	0,550	0,390	Bech i Kristiansen, 1990
Red-and-White	Sweden	394	0,460	0,531	Lunden i in., 1997
Ayrshire	New Zealand	37	0,432	0,527	Winkelman i Wickham, 1997
	Finland	686	0,509	0,490	Ikonen i in., 1997
	USA	45	0,720	0,280	Swaissgood, 1992

cd. tabeli 2 – Table 2 contd.

1	2	3	4	5	6
Pinzgau	Slovakia	89	0,562	0,438	Miluchová i in., 2014
Turkish Grey	Turkey	34	0,426	0,544	Dinc i in., 2013
Eastern Anatolian Red		34	0,118	0,824	
Anatolian Black		34	0,132	0,765	
Southern Anatolian Red		30	0,485	0,456	

Badania przeprowadzone u mieszańców rasy dangi (indian zebru) i holsztyńsko-fryzyskiej (HF) wykazały, iż, u krzyżówek – 75% HF frekwencja alleli wynosiła 0,13 (A1) i 0,86 (A2), dla genotypów odpowiednio 0,06 (A1A1), 0,13 (A1A2) i 0,81 (A2A2), natomiast w przypadku mieszańców 62,5% HF wynosiły 0,03 (A1) i 0,97 (A2) i 0,00 (A1A1), 0,06 (A1A2) i 0,94 (A2A2). U bydła rasy zebru zaobserwowano tylko homozygotyczny genotyp A2A2. Stąd częstotliwość genu allelu A1 wynosiła zero, co wskazuje na występowanie allelu (A2) u naturalnie wyewoluowanej rodzimej rasy bydła (Jawane i in., 2018). Podobnie badania na krowach lokalnej rasy gir oraz guzerá wykazały, iż częstość występowania allelu A2 wynosiła odpowiednio 0,98 i 0,97, a frekwencja genotypu A2A2 0,96 i 0,93 (Rangel i in., 2017).

W Polsce tego typu badania prowadzone były na rasie holsztyńsko-fryzyskiej (Kamiński i in., 2006) oraz rasie zachowawczej polskiej czerwonej (Cieślińska i in., 2019). W badaniach Kamińskiego i in. (2006) przeprowadzonych na buhajach rasy PHF zidentyfikowano trzy genotypy (A1/A1, A2/A2, A1/A2), a częstotliwość występowania A1 i A2 wynosi odpowiednio 0,402 i 0,598. Natomiast Oleński i in. (2012) badając 650 buhajów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej (HF) urodzonych pomiędzy 1997 i 2003, stwierdzili, iż frekwencja allelu A1 wynosi 0,33, natomiast A2 – 0,67 oraz frekwencja genotypu A1A1 0,122, a A2A2 – 0,452. W badaniach prowadzonych przez Cieślińską i in. (2019) na 24 buhajach i 177 krowach rasy polskiej czerwonej stwierdzono, iż częstość występowania β -kazeiny A2 w populacji polskiej czerwonej wynosiła 0,47. Natomiast częstość występowania β -kazeiny A2 u buhajów i krów wynosiła odpowiednio 0,58 i 0,37. Ze względu na właściwości prozdrowotne mleka ras zachowawczych celowe jest także przebadanie buhajów reprodukcyjnych tych ras pod kątem częstotliwości występowania obydwu jej wariantów, a wysoka frekwencja allelu A2 β -kazeiny (0,58) wśród buhajów tej rasy może zwiększyć jego frekwencję wśród całej populacji (Cieślińska i in., 2019).

„Mleko A2”

Intensywna hodowla bydła mlecznego mogła przyczynić się do uwydatnienia genetycznego wariantu mleka, który ma niekorzystne skutki dla zdrowia ludzkiego, dlatego też konieczne są dalsze badania na zwierzętach oraz testy kliniczne na ludziach, aby porównać ryzyko zachorowań w przypadku mleka wolnego od A1 – czyli mleka A2 i „zwykłego” mleka. Tak zwane „mleko A2” przede wszystkim dedykowane jest dla osób autystycznych oraz alergików. Jest to potencjalna grupa odbiorców, stanowiąca niszę sprzedażową dla mleczarni, które część lub całość swojej produkcji chciałaby w przyszłości skierować na rynek dla tej grupy konsumentów. Ze wzglę-

dów zdrowotnych konsumenci coraz częściej wybierają zamienniki mleka krowiego, co może prowadzić do spadku jego spożycia, dlatego też mleko A2 może być ciekawą ofertą, jednak skierowaną do wąskiej grupy odbiorców i mającą ograniczony rynek zbytu. Duże znaczenie w tym zakresie ma właściwy marketing poparty rzetelnymi badaniami naukowymi. Obecnie już w niektórych krajach dostępne jest w sklepach mleko A1 i A2, a konsument może dokonać wyboru, nie rezygnując z picia mleka czy spożywania produktów mlecznych, tylko dlatego, że ma nietolerancję lub jest uczulony na białko mleka. Liderem w produkcji mleka A2 jest Nowa Zelandia, gdzie wdrożono programy badań przesiewowych i krzyżowania, aby propagować pożądaną wariant A2 wśród ras mlecznych. Doprowadziło to do wyboru stad krów produkujących mleko tylko z wariantem A2, a w 2003 r. do wprowadzenia na rynek mleka A2 (Kamiński i in., 2007). Mleko krowie A2 jest dostępne już w handlu w wielu krajach, w tym w Australii, Wielkiej Brytanii, Stanach Zjednoczonych, Nowej Zelandii i Holandii i jest polecane zwłaszcza dla osób z nietolerancją mleka. Mieszanka dla noworodków zawierająca wariant A2 β -kazeiny jest dostępna w Chinach oraz Australii i jest reklamowana w handlu jako łagodniejsza dla układu pokarmowego niemowlęcia (Brooke-Taylor i in., 2017).

Podsumowując, należy stwierdzić, że korzystne byłoby wprowadzenie mleka A2 także na polski rynek, pozwoliłoby to na zwiększenie asortymentu produktów mlecznych i zwiększenie możliwości wyboru dla konsumentów, szczególnie świadomie dokonujących zakupów. Propagowanie wiedzy na ten temat jest zatem bardzo potrzebne i ważne. Produkcja mleka A2 może być szansą na zwiększenie dochodu dla małych gospodarstw rodzinnych, gospodarstw utrzymujących rasy lokalne czy zachowawcze oraz gospodarstw ekologicznych. Nowy dedykowany produkt na rynku pozwala na uzyskanie wyższej ceny, co jest bardzo ważne z punktu ekonomicznego zarówno dla wytwórców, jak i przetwórców mleka.

Piśmiennictwo

- Barłowska J., Sz wajkowska M., Litwińczuk Z., Król J. (2011). Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 10: 291–302.
- Barnett M.P., McNabb W.C., Roy N.C., Woodford K.B., Clarke A.J. (2014). Dietary A1 beta-casein affects gastrointestinal transit time, dipeptidyl peptidase-4 activity, and inflammatory status relative to A2 beta-casein in Wistar rats. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 65 (6):720–727.
- Bech A.M., Kristiansen K.R. (1990). Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield. *J. Dairy Res.*, 57: 53–62.
- Brantl V., Teschemacher H., Henschen A., Lottspeich F. (1979). Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 360: 1211–1216.
- Brooke-Taylor S., Dwyer K., Woodford K., Kost N. (2017). Systematic review of the gastrointestinal effects of A1 compared with A2 β -casein. *Adv. Nutr.*, 15: 739–748.
- Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J. (2009). Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J. Dairy Sci.*, 92 (11): 5335–5352.
- Cerioti G., Chessa S., Bramante G., Bolla P., Pieragostini E., Caroli A. (2004). Un approccio molecolare alla tracciabilità dei prodotti lattiero-caseari caprini. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 55: 251–262.

- Cieślińska A., Kostyra E., Kostyra H., Oleński K., Fiedorowicz E., Kamiński S. (2012). Milk from cows of different β -casein genotypes as a source of β -casomorphin-7. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 63: 426–430.
- Cieślińska A., Fiedorowicz E., Zwierzchowski G., Kordulewska N., Jarmołowska B., Kostyra E. (2019). Genetic polymorphism of β -casein gene in Polish Red cattle – preliminary study of A1 and A2 frequency in genetic conservation herd. *Animals (Basel)*, 9 (6): 377.
- Clemens R.A. (2011). Milk A1 and A2 peptides and diabetes. *Nestle Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program.*, 67: 187–195.
- Curik I., Havranek J., Samarzija D. (1997). Milk protein polymorphism and genetic structure of Croatian Simmental cattle. In: *Milk protein polymorphism. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand. Int. Dairy Fed.*, pp. 93–99.
- Dai R., Fang Y., Zhao W., Liu S., Ding J., Xu K., Meng H. (2016). Identification of alleles and genotypes of beta-casein with DNA sequencing analysis in Chinese Holstein cow. *J. Dairy Res.*, 83: 312–316.
- Dinc H., Ozkan E., Koban E., Togan I. (2013). Beta-casein A1/A2, kappa-casein and beta-lactoglobulin polymorphisms in Turkish cattle breeds. *Archiv. Anim. Breed.*, 56 (1): 650–657.
- Eenennaam A.V., Medrano J.F. (1991). Milk protein polymorphism in California dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 74: 1730–1742.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009). Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. *EFSA Sci. Rep.*, 231: 1–107.
- Ehrmann S., Bartenschlager H., Geldermann H. (1997). Quantification of gene effects on single milk proteins in selected groups of dairy cows. *J. Anim. Breed. Genet.*, 114: 121–132.
- E1-Agamy E.I. (2007). The challenge of cow milk protein allergy. *Small Rumin. Res.*, 68: 64–72.
- Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Swaisgood H.E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk – Sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 87: 1641–1674.
- Ganguly I., Gaur G.K., Singh U., Kumar S., Mann S. (2013). Beta-casein (CSN2) polymorphism in Ongole (Indian zebu) and Frieswal (HF×Sahiwal crossbred) cattle. *Ind. J. Biotech.*, 12: 195–198.
- Gholami M., Hafezian S., Rahimi G., Farhadi A., Rahimi Z., Kahrizi D., Veisi F. (2016). Allele specific-PCR and melting curve analysis showed relatively high frequency of β -casein gene A1 allele in Iranian Holstein, Simmental and native cows. *Cell. Mol. Biol.*, 62: 138–143.
- Gustavsson F., Buitenhuis A.J., Johansson M., Bertelsen H.P., Glantz M., Poulsen N.A., Paulsson M. (2014). Effects of breed and casein genetic variants on protein profile in milk from Swedish Red, Danish Holstein, and Danish Jersey cows. *J. Dairy Sci.*, 97: 3866–3877.
- Haq M.R.U., Kapila R., Sharma R., Saliganti V., Kapila S. (2014). Comparative evaluation of cow beta-casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. *Eur. J. Nutr.*, 53: 1039–1049.
- Heck J.M.L., Schennink A., Van Valenberg H.J.F., Bovenhuis H., Visker M.H.P.W., Van Arendonk J.A.M., Van Hooijdonk A.C.M. (2009). Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 92: 1192–1202.
- Holmer-Jensen J., Karhu T., Mortensen L.S., Pedersen S.B., Herzig K.H., Hermansen K. (2011). Differential effects of dietary protein sources on postprandial low-grade inflammation after a single high fat meal in obese non-diabetic subjects. *Nutr. J.*, 10: 115.
- Ibeagha-Awemu E.M., Prinzenberg E.-M., Jann O.C., Lühken G., Ibeagha A.E., Zhao X., Erhardt G. (2007). Molecular characterization of bovine CSN1S2B and extensive distribution of zebu specific milk protein alleles in European cattle. *J. Dairy Sci.*, 90: 3522–3529.
- Ikonen T., Ojala M., Ruottinen O. (1997). Effects of beta- and kappa-casein genotypes on first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. In: *Milk protein polymorphism. Int. Dairy Fed.*, pp. 47–53.
- Jann O., Ceriotti G., Caroli A., Erhardt G. (2002). A new variant in exon VII of bovine β -casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds. *J. Anim. Breed. Genet.*, 119: 65–68.
- Jarmołowska B., Bukalo M., Fiedorowicz E., Cieślińska A., Kordulewska N.K., Moszyńska M., Świątecki A., Kostyra E. (2019). Role of milk-derived opioid peptides and proline dipeptidyl peptidase-4 in autism spectrum disorders. *Nutrients*, 11(1): 87.

- Jawane V.B., Ali S.S., Kuralkar S.V., Bankar P.S. (2018). Genetic polymorphism of β -casein (CSN2) in Indian Zebu and HF crossbreds. *Indian J. Dairy Sci.*, 71 (5): 530–533.
- Jianqin S., Leiming X., Lu X., Yelland G.W., Ni J., Clarke A.J. (2016). 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. *Nutr. J.*, 15: 35.
- Jinsmaa Y., Yoshikawa M. (1999). Enzymatic release of neocasomorphin and beta-casomorphin from bovine beta-casein. *Peptides*, 20: 957–962.
- Kamiński S., Ruśc A., Cieślińska A. (2006). A note on frequency of A1 and A2 variants of bovine beta casein locus in Polish Holstein bulls. *J. Anim. Feed Sci.*, 15: 195–198.
- Kamiński S., Cieślińska A., Kostyra E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J. Appl. Genet.*, 48: 189–198.
- Kawashti M.I., Amin O.R., Rowhey N.G. (2006). Possible immunological disorders in autism: concomitant autoimmunity and immune tolerance. *Egypt J. Immunol.*, 13: 99–104.
- Kitts D.D., Weiler K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources: Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm.*, 9: 1309–1323.
- Kost N.V., Sokolov O.Y., Kurasova O.B., Dmitriev A.D., Tarakanova J.N., Gabueva M.V., et al. (2009). Beta-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides*, 30: 1854–1860.
- Król J., Brodziak A., Litwińczuk Z., Litwińczuk A. (2013). Effect of age and stage of lactation on whey protein content in milk of cows of different breeds. *Polish J. Veter. Sci.*, 16 (2): 395–397.
- Kuczyńska B., Nałęcz-Tarwacka T., Puppel K., Gołębiwski M., Grodzki H., Słószarz J. (2011). Zawartość bioaktywnych składników mleka w zależności od modelu żywienia krów w certyfikowanych gospodarstwach ekologicznych. *J. Res. Applic. Agricult. Eng.*, 56 (4): 7–13.
- Lange K.W., Hauser J., Reissmann A. (2015). Gluten-free and casein-free diets in the therapy of autism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab.*, 18: 572–575.
- Laugesen M., Elliott R. (2003). Ischaemic heart disease, type 1 diabetes, and cow milk A1 beta-casein. *N. Z. Med. J.*, 116: 1–19.
- Lorenzini E.C., Chessa S., Chiatti F., Caroli A., Pagnacco G. (2007). Peptidi bioattivi di latte e derivati. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 58: 113–156.
- Mahé M.F., Miranda G., Queval R., Bado A., Zafindrajona P.S., Grosclaude F. (1999). Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations: Characterization of variants α 1-Cn H and κ -Cn. *J. Genet. Sel. Evol.*, 31: 239–253.
- Martin P., Szymanowska M., Zwierzchowski L., Leroux C. (2002). The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminants milks. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42: 433–459.
- Massella E., Piva S., Giacometti F., Liuzzo G., Zambrini A.V., Serraino A. (2017). Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in northern Italy. *Ital. J. Food Saf.*, 6 (3): 6904.
- McLachlan C.N. (2001). Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med Hypotheses*, 56: 262–272.
- Miluchová M., Gábor M., Trakovičká A. (2014). Analysis of beta-casein gene (CSN2) polymorphism in different breeds of cattle. *Anim. Sci. Biotechn.*, 47 (2): 56–59.
- Niebuhr D.W., Li Y., Cowan D.N., Weber N.S., Fisher J.A., Ford G.M., et al. (2011). Association between bovine casein antibody and new onset schizophrenia among US military personnel. *Schizophr. Res.*, 128: 51–55.
- Oleński K., Cieślińska A., Suchocki T., Szyda J., Kamiński S. (2012). Polymorphism in coding and regulatory sequences of beta-casein gene is associated with milk production traits in Holstein-Friesian cattle. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 30 (1): 5–12.
- Oleński K., Kamiński S., Szyda J., Cieślińska A. (2010). Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein-Friesian bulls. *Livest. Sci.*, 131 (1): 137–140.
- Pal S., Woodford K., Kukuljan S., Ho S. (2015). Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients*, 7 (9): 7285–7297.
- Pedersen L., Parlar S., Kvist K., Whiteley P., Shattock P. (2014). Data mining the Scan-

- Brit study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders: Behavioural and psychometric measures of dietary response. *Nutr. Neurosci.*, 17: 207–213.
- Pennesi C.M., Klein L.C. (2012). Effectiveness of the gluten-free, casein-free diet for children diagnosed with autism spectrum disorder: Based on parental report. *Nutr. Neurosci.*, 15: 85–91.
- Rangel A.H.N., Zaros L.G., Lima T.C., Borba L.H.F., Novaes L.P., Mota L.F.M., Silva M.S. (2017). Polymorphism in the beta casein gene and analysis of milk characteristics in Gir and Guzera dairy cattle. *Genet. Mol. Res.*, 16 (2): gmr16029592.
- Reichelt K.L., Knivsberg A.M. (2003). Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? *Nutr. Neurosci.*, 6: 19–28.
- Rijnkels M. (2002). Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.*, 7: 327–345.
- Sadler M. J. (2013). Beta-casein proteins and infant growth and development. *Infant.*, 9: 173–176.
- Şahin Ö., Boztepe S., Aytakin I. (2018). A1 and A2 bovine milk, the risk of beta-casomorphin-7 and its possible effects on human health: A1 and A2 milk and the risk of beta-casomorphin-7. *Selcuk J. Agr. Food. Sci.*, 32 (3): 632–639.
- Sebastiani C., Arcangeli C., Ciullo M., Torricelli M., Cinti G., Fisichella S., Biagetti M. (2020). Frequencies evaluation of β -casein gene polymorphisms in dairy cows reared in central Italy. *Animals*, 10 (2): 252.
- Severance E.G., Lin J., Sampson H.A., Gimenez G., Dickerson F.B., Halling M., et al. (2011). Dietary antigens, epitope recognition, and immune complex formation in recent onset psychosis and long-term schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 126: 43–50.
- Séverin S., Wenshui X. (2005). Milk biologically active components as nutraceuticals: Review. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 45 (7-8): 645–656.
- Skonieczna-Żydecka K., Gorzkowska I., Pierzak-Sominka J., Adler G. (2017). The prevalence of autism spectrum disorders in West Pomeranian and Pomeranian regions of Poland. *J. Appl. Res. Intellect. Disabil.*, 30: 283–289.
- Sun Z., Zhang Z., Wang X., Cade R., Elmer Z., Fregly M. (2003). Relation of beta-casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides*, 24: 937–943.
- Swaissgood H.E. (1992). Chemistry of the caseins. *Advanced dairy chemistry – 1: proteins*. Fox PF, Elsevier, London, ss. 63–77.
- Szwajkowska M., Wolanciuk A., Barłowska J., Król J., Litwińczuk Z. (2011). Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system – a review. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 29: 269–280.
- Tailford K.A., Berry C.L., Thomas A.C., Campbell J.H. (2003). A casein variant in cow's milk is atherogenic. *Atherosclerosis*, 1: 13–19.
- Teschmacher H. (2003). Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Curr. Pharm. Des.*, 9 (16): 1331–1344.
- Thorsdottir I., Birgisdottir B.E., Johannsdottir I.M., Harris P. (2000). Different (beta-casein) fractions in Icelandic versus Scandinavian cow's milk may influence diabetogenicity of cow's milk in infancy and explain low incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Iceland. *Pediatrics*, 106: 719–724.
- Trivedi M.S., Shah J.S., Al-Mughairy S., Hodgson N.W., Simms B., Trooskens G.A., et al. (2014). Food-derived opioid peptides inhibit cysteine uptake with redox and epigenetic consequences. *J. Nutr. Biochem.*, 25: 1011–1018.
- Visker M.H.P.W., Dibbitts B.W., Kinders S.M., Van Valenberg H.J.F., Van Arendonk J.A.M., Bovenhuis H. (2011). Association of bovine β -casein protein variant I with milk production and milk protein composition. *Anim. Genet.*, 42: 212–218.
- Voglino G.F. (1972). A new β -casein variant in Piedmont cattle. *Anim. Genet.*, 3: 61–62.
- Winkelman A.M., Wickham B.W. (1997). Associations between milk protein genetic variants and production traits in New Zealand dairy cattle. In: *Milk protein polymorphism. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand*. Int. Dairy Fed., 38–46.
- Woodford K. (2009). *Devil in the Milk: Illness, Health and the Politics of A1 and A2 Milk*. Chelsea Green Publishing, North American edit., 240 ss.

IWONA RADKOWSKA

Identification and health-promoting properties of milk containing A2 beta casein

SUMMARY

Recent scientific findings on nutrition as well as new nutritional trends show the need for a deeper understanding of animal products. It has been increasingly recognized that consumption of dairy products, which contribute to increased release of opioid peptides, may have adverse health effects. This concerns mainly food allergy sufferers, people with digestive problems, but also autistic children. The milk's beta casein, the most frequent CSN2 genetic variants of which are A1 and A2 casein, has recently aroused considerable attention for health reasons. Research shows that beta-casomorphin-7 (BCM-7), which is formed in the process of digestion of A1 casein, may contribute to some major human diseases such as atherosclerosis, sudden infant death syndrome, and cardiovascular diseases. Furthermore, numerous studies have demonstrated associations between BCM-7 and neurological problems such as autism and schizophrenia. Milk containing A2 beta casein does not have such properties. The main factors contributing to the presence of a specific beta casein variant in cow's milk are genetically determined. The role of A1 beta casein as an undesirable variant has resulted in an attempt to select dairy cows based on their beta casein polymorphism. The aim of this article is to present current research findings concerning the identification of cows for beta casein variant as well as its effects on human health.

Key words: milk, β -casein, A2 casein