



LUND
UNIVERSITY

Mjölksproteiners betydelse för icke-koagulerande mjölk och genomisk selektion mot icke-koagulerande mjölk för osttillverkning

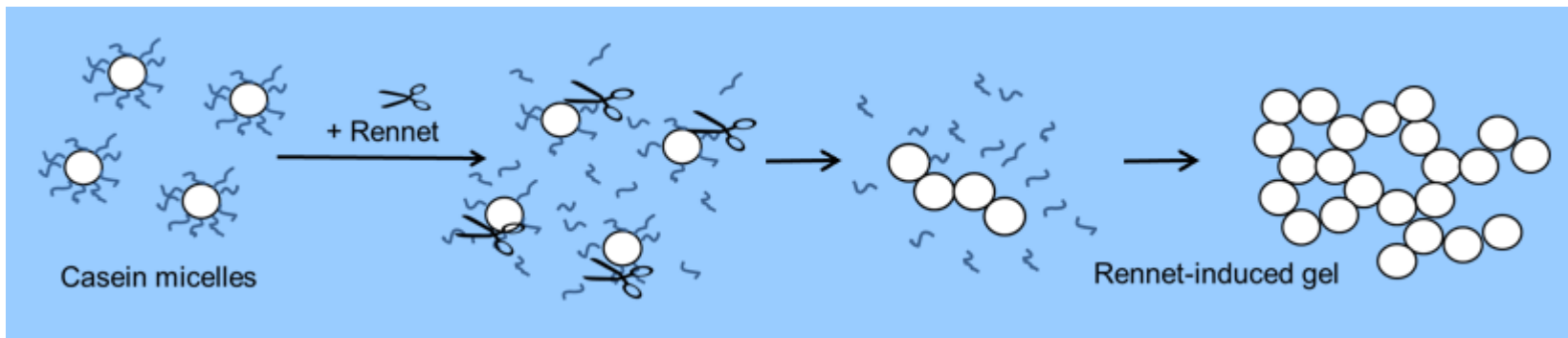
MARIA GLANTZ

PROCESSTEKNIK OCH TILLÄMPAD BIOVETENSKAP, LUNDS UNIVERSITET



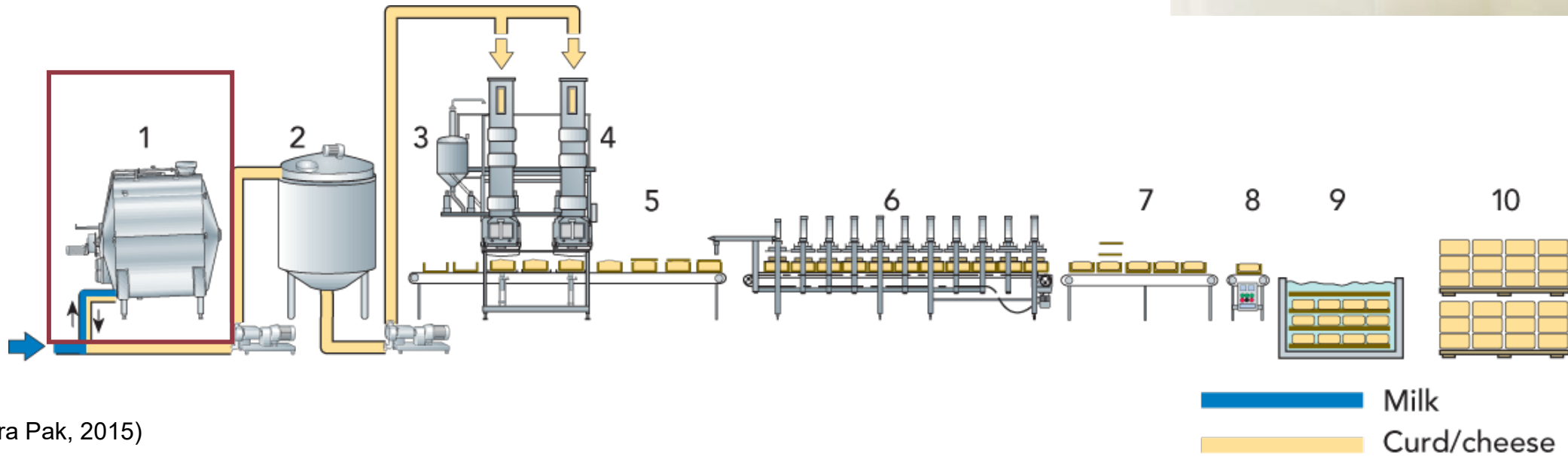
Ostillverkning i Sverige

- I Sverige levereras årligen ca 3 miljoner ton mjölk till de svenska mejerierna
 - 30 % av mjölken används för att producera ost
 - 80 000 ton ost produceras årligen i Sverige
- Vid oststillverkning tillsätts löpe/ystenzymmer till mjölken för att koagulera en av mjölkens proteiner, kaseiner
 - Löpe-inducerad koagulering



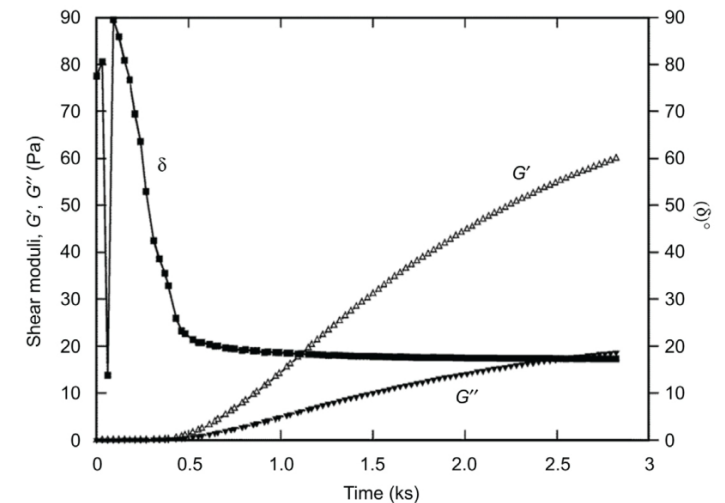
Löpe-inducerad koagulering

- Löpe-inducerad koagulering
 - Viktigt steg vid ostproduktion
 - Tidsbegränsande steget
- Påverkar ostutbytet (mängd producerad ost)
 - Vill ha en stark ostgel/koagel på kort tid
 - Koaglet bryts efter ca 30-40 min vid industriell ostproduktion



Icke-koagulerande mjölk

- Icke-koagulerande mjölk har rapporterats från olika raser och länder, t.ex.
 - Svensk Röd och Vit boskap (SRB)
 - Italiensk, Dansk och Finsk Holstein-Friesian boskap
 - Finsk Ayrshire boskap
 - Italiensk Brown Swiss boskap
- Mjölakens förmåga att koagulera kan analyseras med olika metoder, men alla ger ett värde för
 - Tiden innan mjölken börjar koagulera (koagulerings-tid)
 - Styrkan av gelen/koaglet vid en viss tid
- Icke-koagulerande mjölk
 - Mjölk som inte koagulerar alls eller inom en viss tid
 - Gelstyrka = 0
 - Vanligtvis en koagulerings-tid > 30 - 40 min



(Horne and Lucey, 2017)

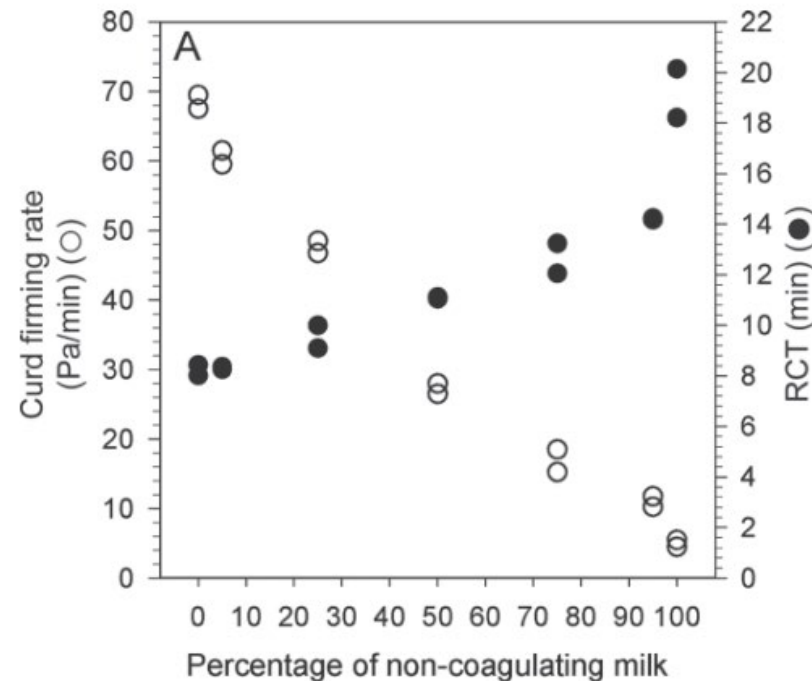


Photo: Aarhus University

➔ Konsekvens: Svinn och ekonomiska förluster

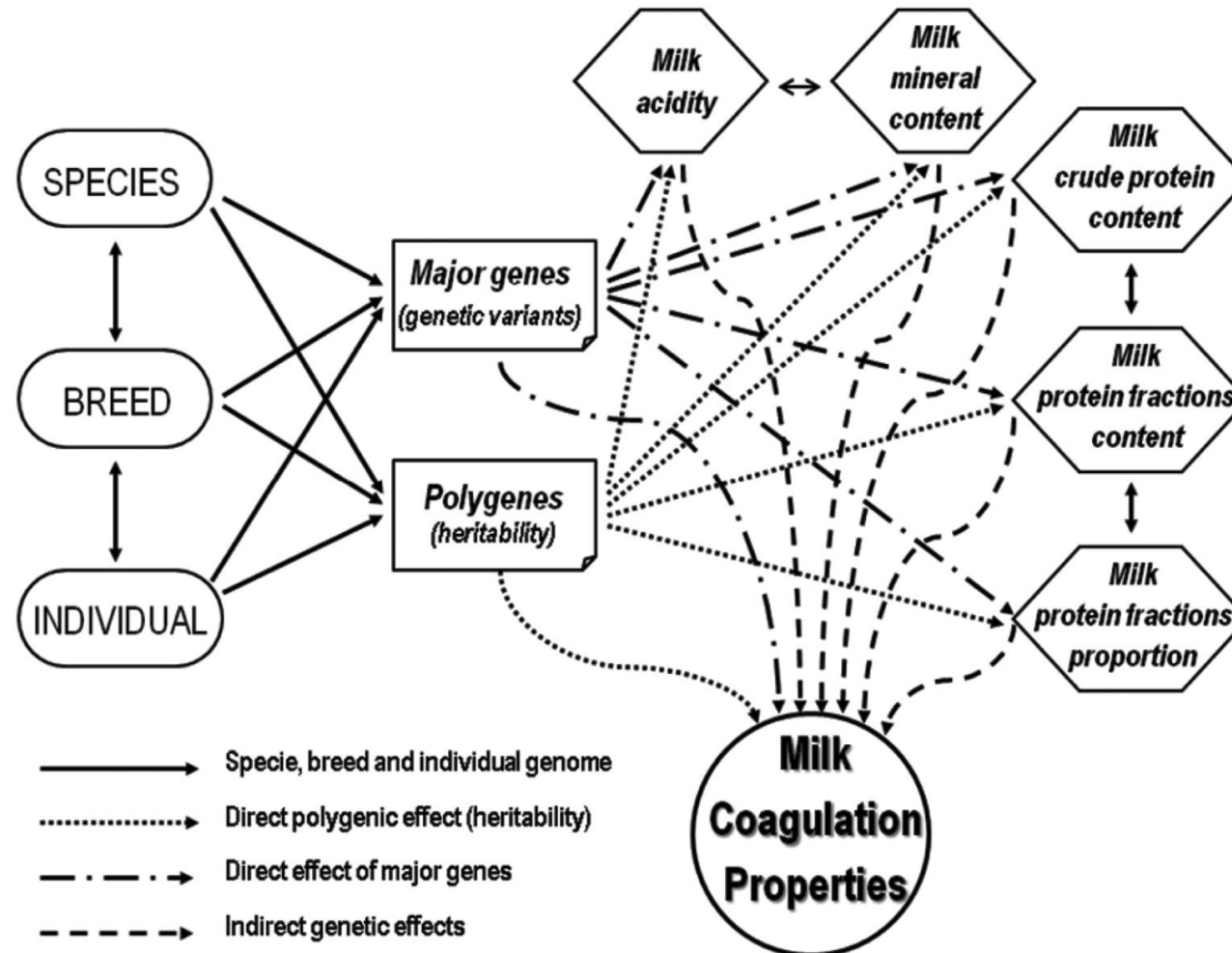
Icke-koagulerande mjölk

- Icke-koagulerande mjölk kan ha en negativ inverkan på mjölkens koaguleringssegenskaper när denna mjölk blandas med mjölk som koagulerar bra
 - 25% icke-koagulerande mjölk var tillräckligt för att förlänga koaguleringstiden och minska hastigheten för uppbyggnad av koaglet



(Frederiksen et al., 2011)

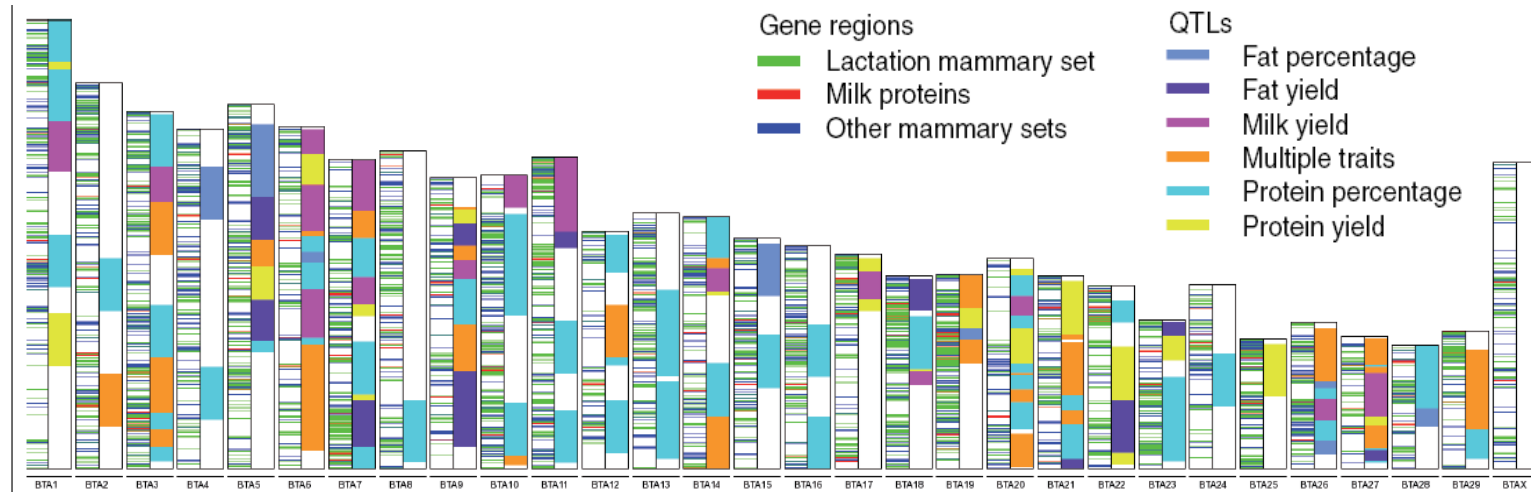
Faktorer som påverkar mjölkens koagulering



(Bittante et al., 2012)

Genomisk selektion

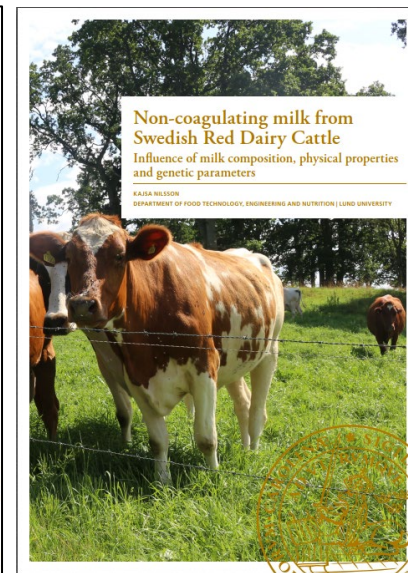
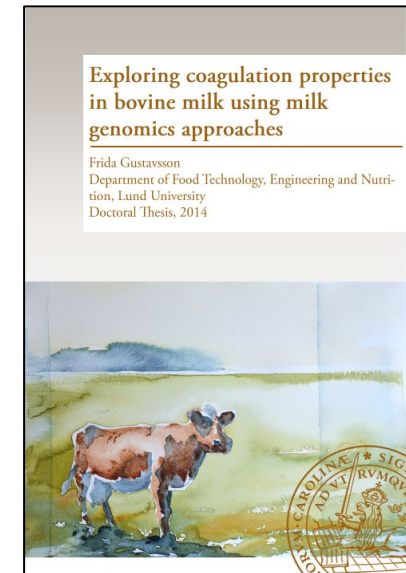
- Sekvenseringen av kons genom blev klart 2005
 - 29 kromosomer, plus X och Y kromosomerna
 - Ca 3 miljarder baspar av DNA
 - Minst 22 000 gener
- Genomisk selektion bygger på information från tusentals genetiska markörer (SNP-markör) som är spridda över kromosomerna i hela genomet
- Över 230 QTL (kromosomregioner), spridda över alla 29 kromosomer, har identifierats för mjölk-, protein- och fettavkastning samt för protein- och fetthalt



(Lemay et al., 2009)

Mjölkkkoaguleringsprojekt vid Lunds universitet

- Exploring coagulation properties in bovine milk using milk genomics approaches (2009-2014)
- Non-coagulating milk from Swedish Red Dairy Cattle (2015-2020)
- Mjölkteinerens betydelse för icke-koagulerande mjölk (2021-2024)
- Samarbete mellan:



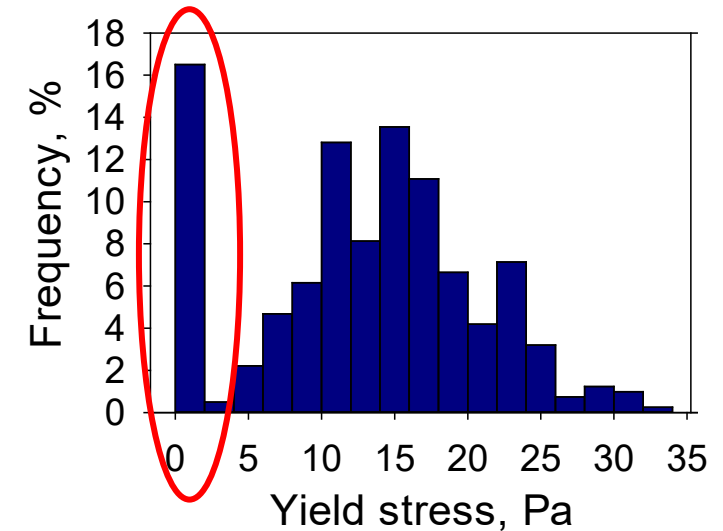
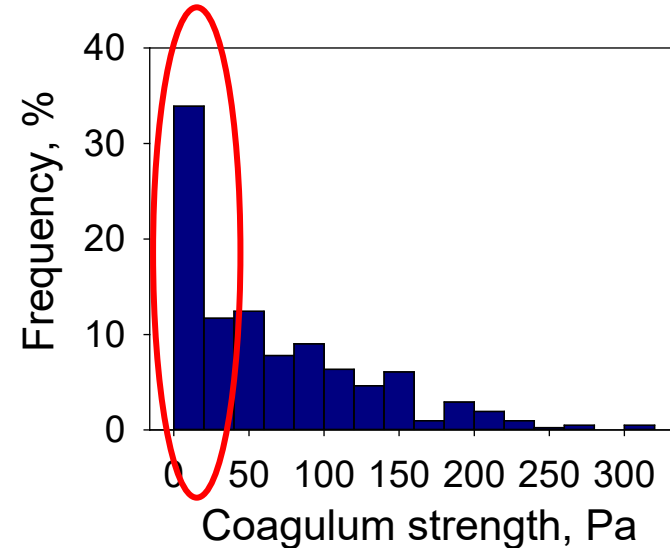
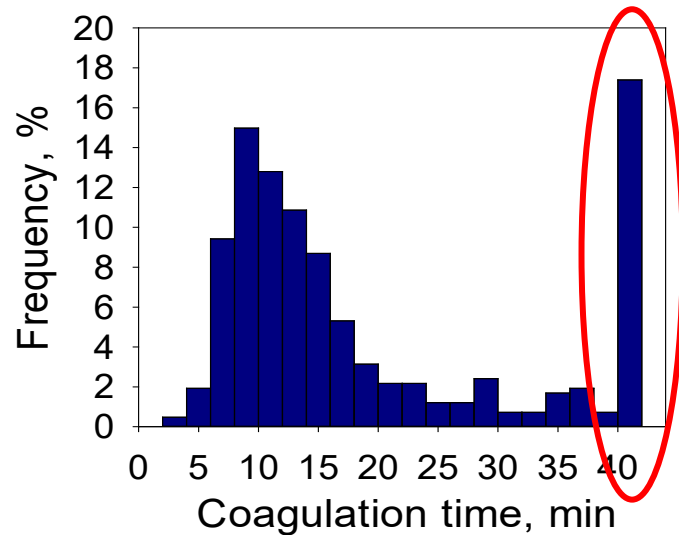
Mjök och DNA från SRB

- Individuella mjökprover har samlats in från 1000 SRB-kor
 - Analyser av löpe-inducerad koagulering på individnivå
 - Bestämning av detaljerad proteinprofil och genetiska proteinvarianter
 - Analyser av mjölkens sammansättning (protein, fett, kalcium, citronsyra, etc.)
- Blodprover har tagits till låg- och högdensitetschip för SNP-analyser
 - GWAS (helgenomstudie) för koaguleringsegenskaper och mjölkens sammansättning
 - Skattning av arvbarhet och genetiska samband mellan koaguleringsegenskaper och mjölkens sammansättning



<http://srb-foreningen.se/>

Koaguleringssegenskaper och genetiska parametrar i mjölk från SRB



Genetic parameters

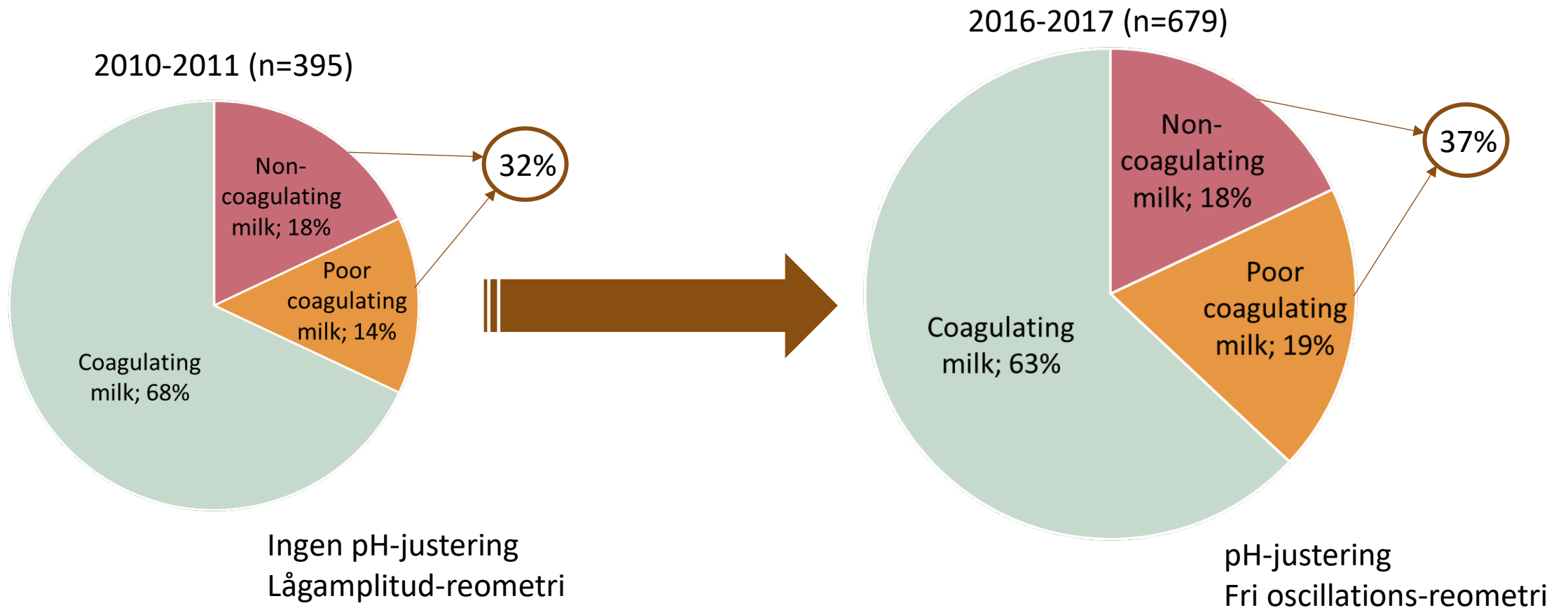
Trait	NC	G'_{40}	σ_Y
NC	0.45	-0.82	-0.48
G'_{40} (Pa)	-0.40	0.53	0.89
σ_Y (Pa)	-0.21	0.83	0.43

Heritability (diagonal), genetic correlations (above diagonal) and phenotypic correlations (below diagonal)

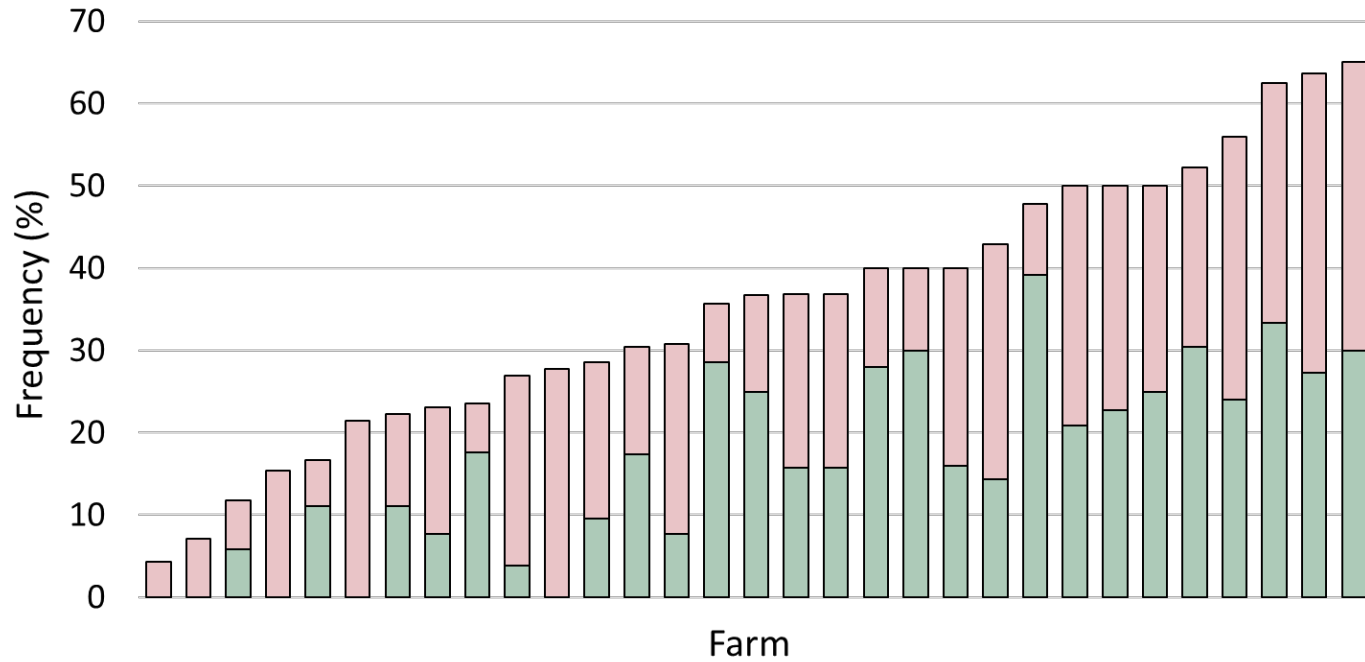
(Gustavsson, 2014; Gustavsson, Glantz, Fikse et al., 2014)

Icke-koagulerande mjölk från SRB

- Bekräftade problemet med icke-koagulerande och dåligt koagulerande mjölk hos SRB-rasen

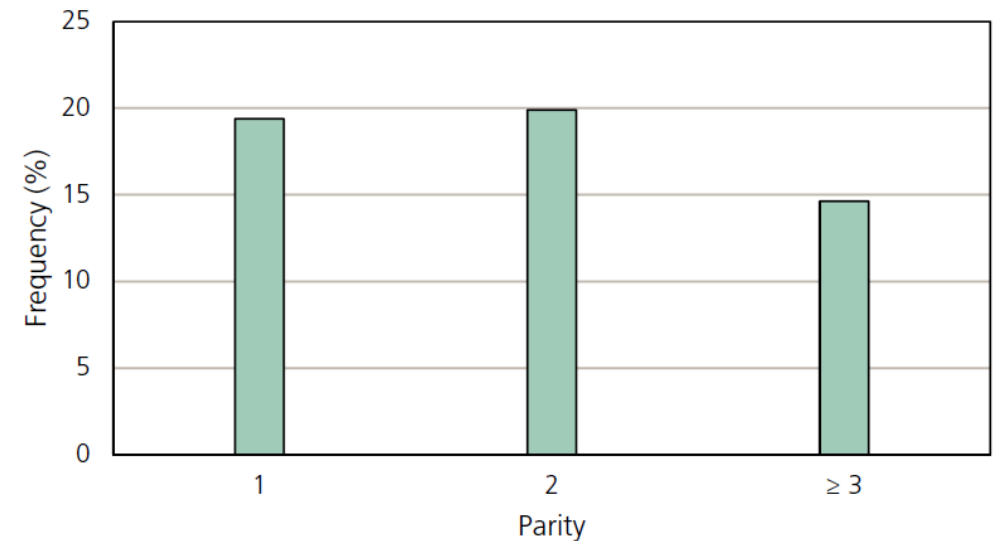
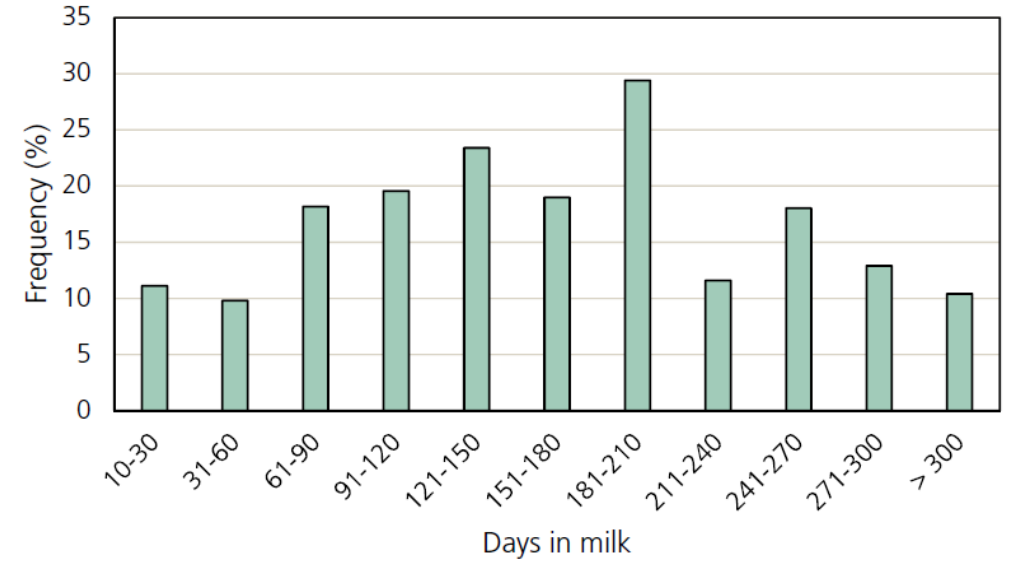


Spridning av icke-koagulerande mjölk över gård och laktation

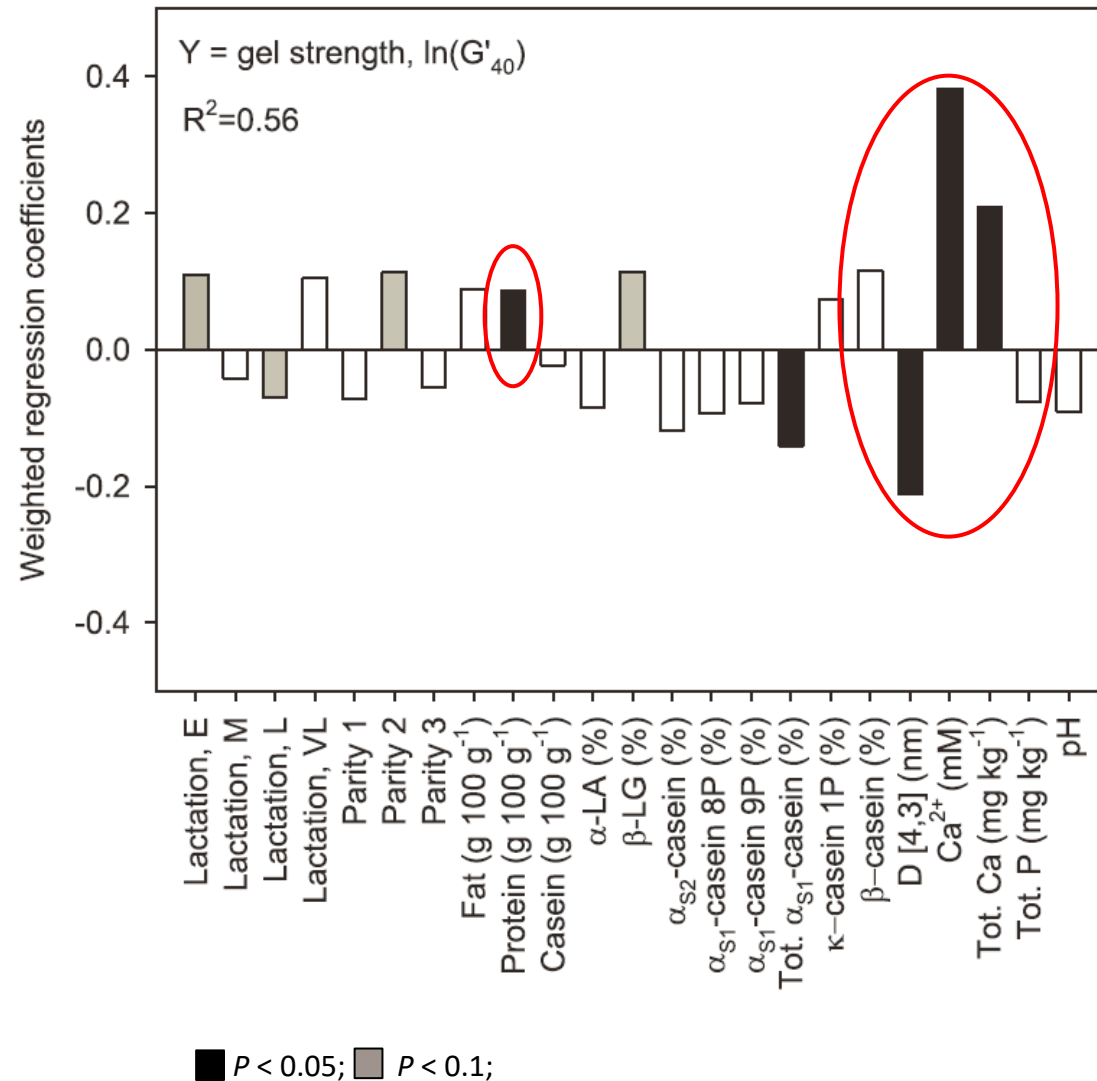


Icke-koagulerande mjölk
Dåligt koagulerande mjölk

(Nilsson, 2020)



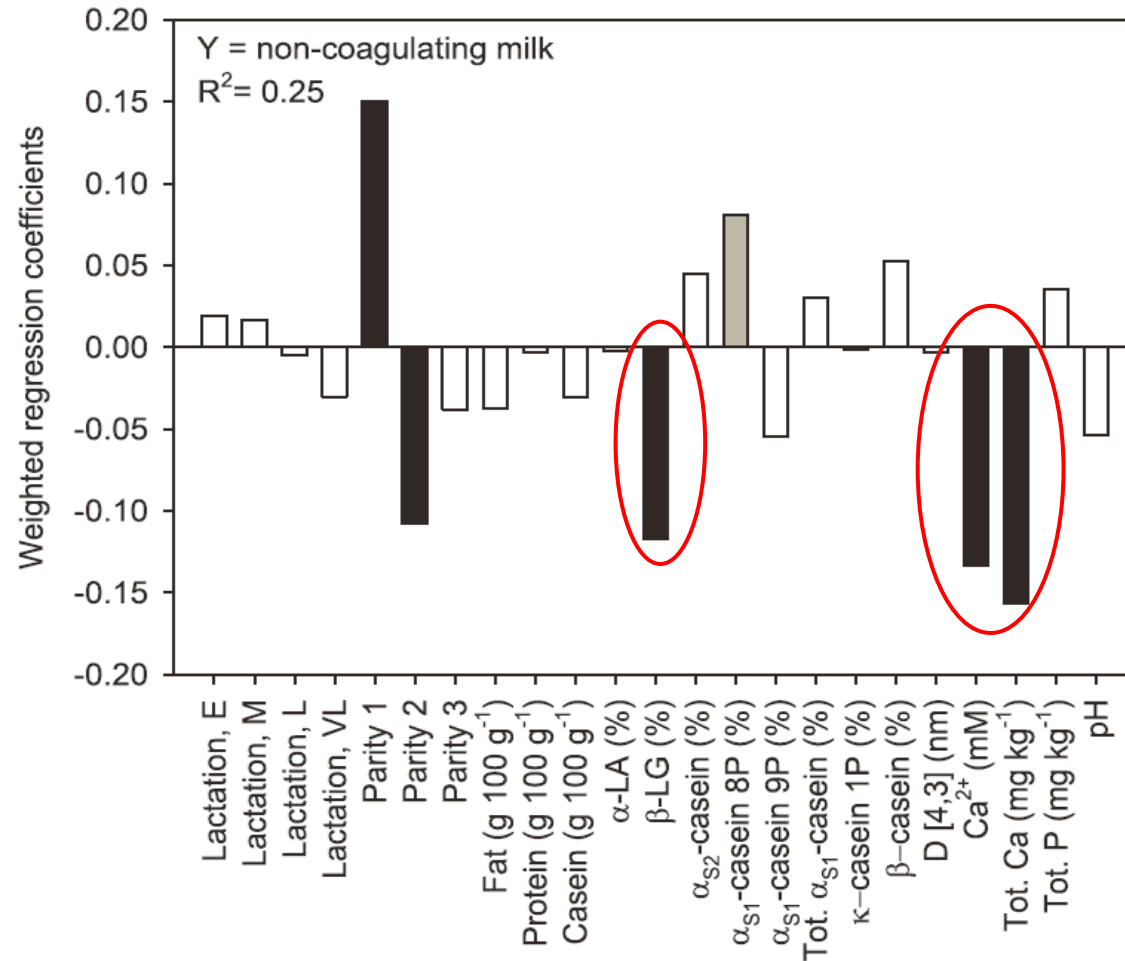
Mjölksammansättningens betydelse för koagulering



Starkt koagel gynnas av:

- Hög proteinhalt
- Små kaseinmiceller
- Högt halt av totalt kalcium
- Högt Ca²⁺-koncentration

Mjölksammansättningen betydelse för icke-koagulering



■ P < 0.05; ■ P < 0.1;

Icke-koagulerande mjölk påverkas av:

- Relativ koncentration av β-LG
- Total kalciumhalt
- Ca²⁺-koncentration

Detaljerad proteinprofilering

- Proteomik-metodik
 - Identifiering av genetiska varianter och posttranslationella modifieringar (PTM)
 - Analysteknik: LC-HRMS

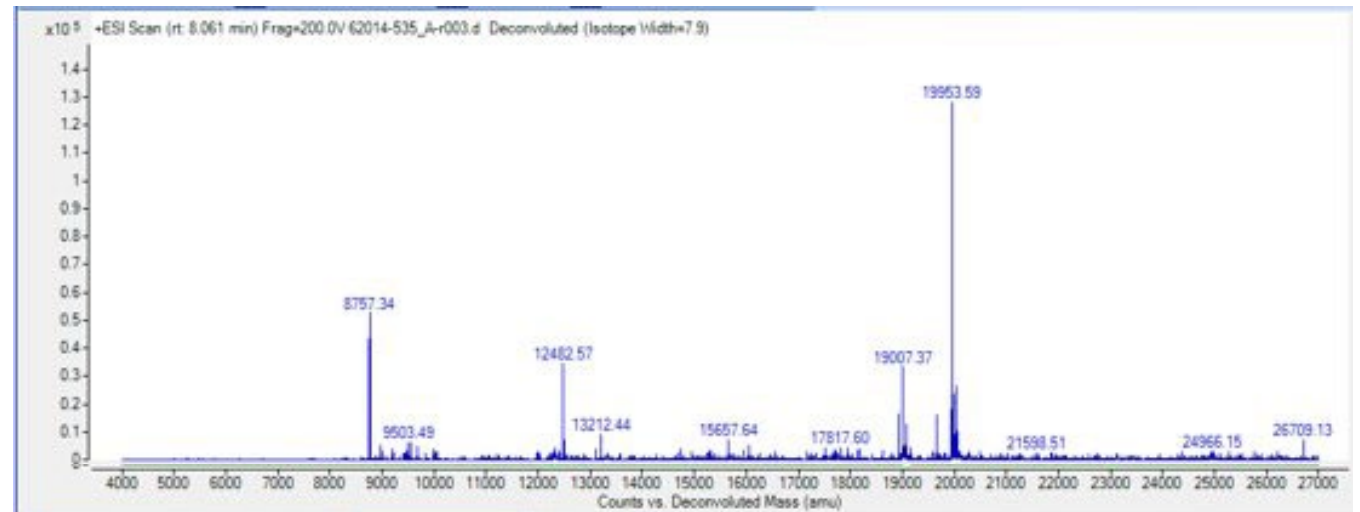
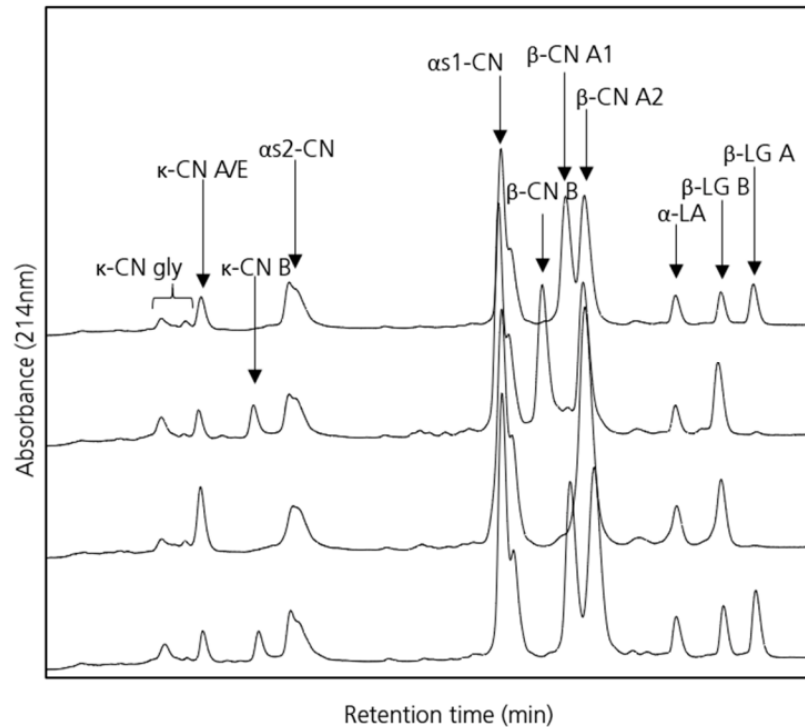


Bild: Buhelt Johansen, Arla Foods

Mjölkteinens betydelse för koaguleringsförmåga

Trait	Predictor variable	Regression coefficient	SE of coefficient		Contribution to variation	R ² _{adj}	R ² _{10fold}
t _g	Constant	0.41 · 10 ⁻²	8.09 · 10 ⁻²				
	Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	-1.42 · 10 ⁻²	0.39 · 10 ⁻²	***	6.42%		
	Total calcium (g kg ⁻¹)	-4.15 · 10 ⁻²	1.53 · 10 ⁻²	**	6.31%		
	D[4,3] (µm)	-38.7 · 10 ⁻²	17.3 · 10 ⁻²	*	0.02%	30.7%	22.1%
	β-CN 5P (%)	0.46 · 10 ⁻²	0.18 · 10 ⁻²	*	6.73%		
	κ-CN 1P UG (%)	-1.15 · 10 ⁻²	0.25 · 10 ⁻²	***	2.18%		
	κ-CN 1P 1G (%)	-2.32 · 10 ⁻²	0.63 · 10 ⁻²	***	10.1%		
	κ-CN 2P 1G (%)	-6.57 · 10 ⁻²	3.03 · 10 ⁻²	*	2.22%		
G ² ₃₀	Constant	-643	77.2				
	Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	20.5	5.06	***	1.98%		
	Total calcium (g kg ⁻¹)	98.4	22.3	***	16.6%		
	Total CN (%)	71.1	15.2	***	10.4%	50.3%	46.1%
	α _{S2} -CN 12P (%)	29.4	11.1	**	0.43%		
	κ-CN 1P UG (%)	24.5	3.21	***	7.36%		
	κ-CN 1P 1G (%)	53.6	7.88	***	15.6%		
G ² _{2.5tg}	Constant	-87.8	67.7				
	Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	4.64	2.01	*	0.05%		
	Total calcium (g kg ⁻¹)	19.7	8.55	*	13.5%		
	Total CN (%)	74.5	6.09	***	36.3%		
	CN:protein	-319	86.5	***	1.44%	69.7%	67.5%
	α _{S2} -CN 12P (%)	11.6	4.26	**	0.13%		
	κ-CN 1P UG (%)	11.3	1.25	***	6.55%		
	κ-CN 2P UG (%)	10.7	3.70	**	10.1%		
κ-CN 1P 1G (%)	15.4	3.89	***	3.33%			

Mjölkteinens betydelse för koaguleringsförmåga

Trait	Predictor variable	Regression coefficient	SE of coefficient		Contribution to variation	R ² _{adj}	R ² _{10fold}
t _g	Constant	0.41 · 10 ⁻²	8.09 · 10 ⁻²				
	Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	-1.42 · 10 ⁻²	0.39 · 10 ⁻²	***	6.42%		
	Total calcium (g kg ⁻¹)	-4.15 · 10 ⁻²	1.53 · 10 ⁻²	**	6.31%		
	D[4,3] (µm)	-38.7 · 10 ⁻²	17.3 · 10 ⁻²	*	0.02%	30.7%	22.1%
	β-CN 5P (%)	0.46 · 10 ⁻²	0.18 · 10 ⁻²	*	6.73%		
	κ-CN 1P UG (%)	-1.15 · 10 ⁻²	0.25 · 10 ⁻²	***	2.18%		
	κ-CN 1P 1G (%)	-2.32 · 10 ⁻²	0.63 · 10 ⁻²	***	10.1%		
	κ-CN 2P 1G (%)	-6.57 · 10 ⁻²	3.03 · 10 ⁻²	*	2.22%		
G ² ₃₀	Constant	-643	77.2				
	Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	20.5	5.06	***	1.98%		
	Total calcium (g kg ⁻¹)	98.4	22.3	***	16.6%		
	→ Total CN (%)	71.1	15.2	***	10.4%	50.3%	46.1%
	α _{S2} -CN 12P (%)	29.4	11.1	**	0.43%		
	κ-CN 1P UG (%)	24.5	3.21	***	7.36%		
	κ-CN 1P 1G (%)	53.6	7.88	***	15.6%		
	G ² _{2.5tg}	Constant	-87.8	67.7			
Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)		4.64	2.01	*	0.05%		
Total calcium (g kg ⁻¹)		19.7	8.55	*	13.5%		
→ Total CN (%)		74.5	6.09	***	36.3%		
CN:protein		-319	86.5	***	1.44%	69.7%	67.5%
α _{S2} -CN 12P (%)		11.6	4.26	**	0.13%		
κ-CN 1P UG (%)		11.3	1.25	***	6.55%		
κ-CN 2P UG (%)		10.7	3.70	**	10.1%		
κ-CN 1P 1G (%)		15.4	3.89	***	3.33%		

Mjölkteinerens betydelse för koaguleringsförmåga

Trait	Predictor variable	Regression coefficient	SE of coefficient		Contribution to variation	R ² _{adj}	R ² _{10fold}
t _g	Constant	0.41 · 10 ⁻²	8.09 · 10 ⁻²				
	→ Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	-1.42 · 10 ⁻²	0.39 · 10 ⁻²	***	6.42%		
	Total calcium (g kg ⁻¹)	-4.15 · 10 ⁻²	1.53 · 10 ⁻²	**	6.31%		
	D[4,3] (µm)	-38.7 · 10 ⁻²	17.3 · 10 ⁻²	*	0.02%	30.7%	22.1%
	β-CN 5P (%)	0.46 · 10 ⁻²	0.18 · 10 ⁻²	*	6.73%		
	κ-CN 1P UG (%)	-1.15 · 10 ⁻²	0.25 · 10 ⁻²	***	2.18%		
	κ-CN 1P 1G (%)	-2.32 · 10 ⁻²	0.63 · 10 ⁻²	***	10.1%		
	κ-CN 2P 1G (%)	-6.57 · 10 ⁻²	3.03 · 10 ⁻²	*	2.22%		
G ² ₃₀	Constant	-643	77.2				
	Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	20.5	5.06	***	1.98%		
	→ Total calcium (g kg ⁻¹)	98.4	22.3	***	16.6%		
	Total CN (%)	71.1	15.2	***	10.4%	50.3%	46.1%
	α _{S2} -CN 12P (%)	29.4	11.1	**	0.43%		
	κ-CN 1P UG (%)	24.5	3.21	***	7.36%		
	κ-CN 1P 1G (%)	53.6	7.88	***	15.6%		
G ^{2.5} _{tg}	Constant	-87.8	67.7				
	Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	4.64	2.01	*	0.05%		
	→ Total calcium (g kg ⁻¹)	19.7	8.55	*	13.5%		
	Total CN (%)	74.5	6.09	***	36.3%		
	CN:protein	-319	86.5	***	1.44%	69.7%	67.5%
	α _{S2} -CN 12P (%)	11.6	4.26	**	0.13%		
	κ-CN 1P UG (%)	11.3	1.25	***	6.55%		
	κ-CN 2P UG (%)	10.7	3.70	**	10.1%		
κ-CN 1P 1G (%)	15.4	3.89	***	3.33%			

Mjölkteinens betydelse för koaguleringsförmåga

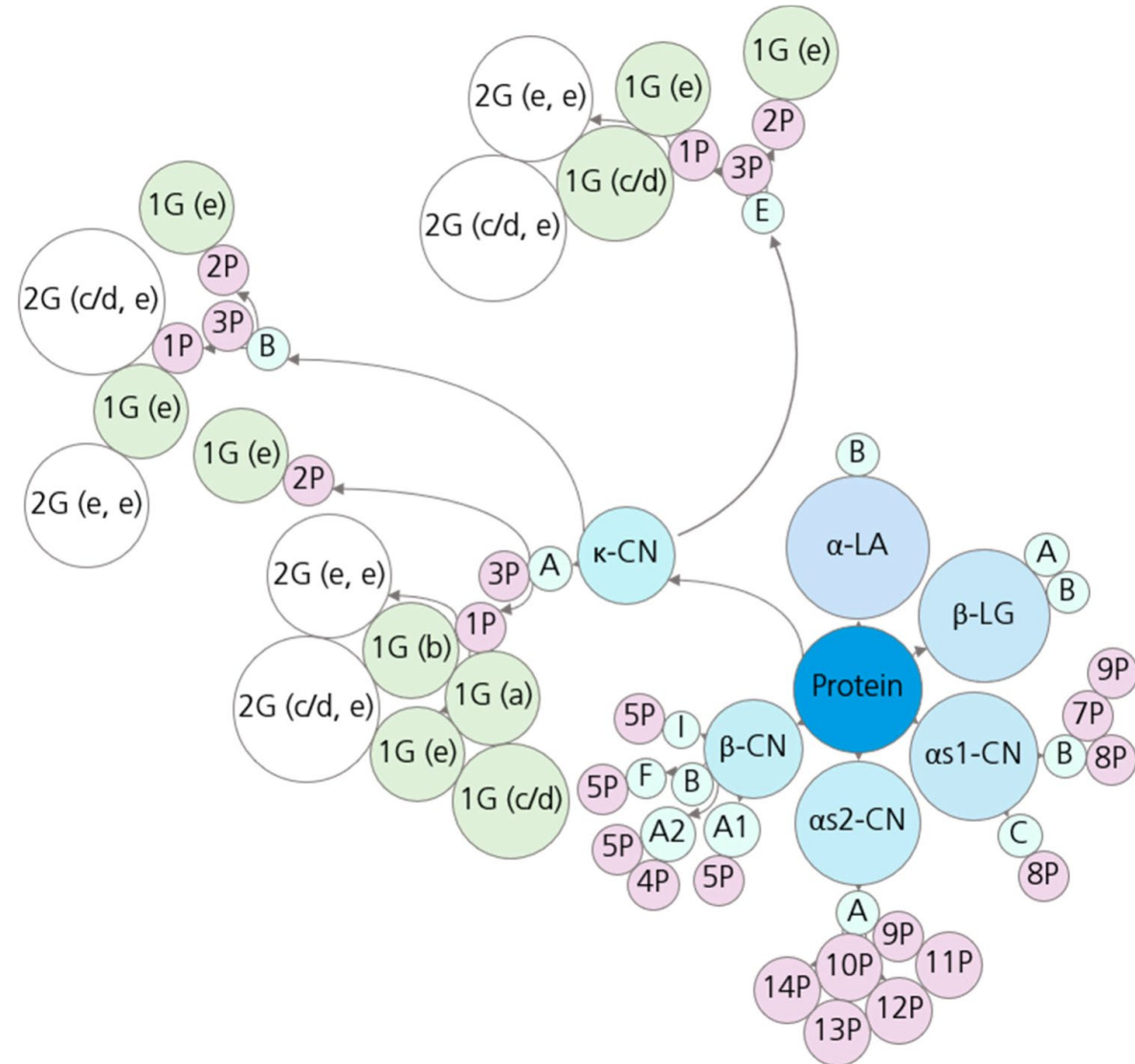
Trait	Predictor variable	Regression coefficient	SE of coefficient		Contribution to variation	R ² _{adj}	R ² _{10fold}
t _g	Constant	0.41 · 10 ⁻²	8.09 · 10 ⁻²				
	Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	-1.42 · 10 ⁻²	0.39 · 10 ⁻²	***	6.42%		
	Total calcium (g kg ⁻¹)	-4.15 · 10 ⁻²	1.53 · 10 ⁻²	**	6.31%		
	D[4,3] (µm)	-38.7 · 10 ⁻²	17.3 · 10 ⁻²	*	0.02%	30.7%	22.1%
	β-CN 5P (%)	0.46 · 10 ⁻²	0.18 · 10 ⁻²	*	6.73%		
	κ-CN 1P UG (%)	-1.15 · 10 ⁻²	0.25 · 10 ⁻²	***	2.18%		
	κ-CN 1P 1G (%)	-2.32 · 10 ⁻²	0.63 · 10 ⁻²	***	10.1%		
	κ-CN 2P 1G (%)	-6.57 · 10 ⁻²	3.03 · 10 ⁻²	*	2.22%		
G ² ₃₀	Constant	-643	77.2				
	Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	20.5	5.06	***	1.98%		
	Total calcium (g kg ⁻¹)	98.4	22.3	***	16.6%		
	Total CN (%)	71.1	15.2	***	10.4%	50.3%	46.1%
	αS ₂ -CN 12P (%)	29.4	11.1	**	0.43%		
	κ-CN 1P UG (%)	24.5	3.21	***	7.36%		
	κ-CN 1P 1G (%)	53.6	7.88	***	15.6%		
G ^{2.5} _{tg}	Constant	-87.8	67.7				
	Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	4.64	2.01	*	0.05%		
	Total calcium (g kg ⁻¹)	19.7	8.55	*	13.5%		
	Total CN (%)	74.5	6.09	***	36.3%		
	CN:protein	-319	86.5	***	1.44%	69.7%	67.5%
	αS ₂ -CN 12P (%)	11.6	4.26	**	0.13%		
	κ-CN 1P UG (%)	11.3	1.25	***	6.55%		
	κ-CN 2P UG (%)	10.7	3.70	**	10.1%		
	κ-CN 1P 1G (%)	15.4	3.89	***	3.33%		

Koaguleringssegenskaper och detaljerad proteinprofil

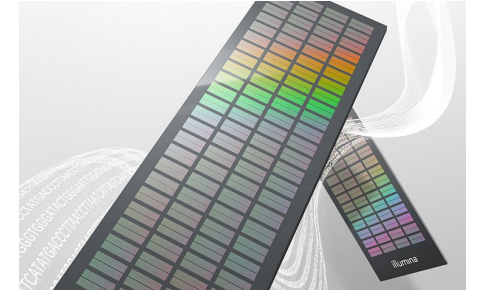
PTMs och genetiska kaseinvarianter

Ökad risk för icke-koagulerande mjölk vid:

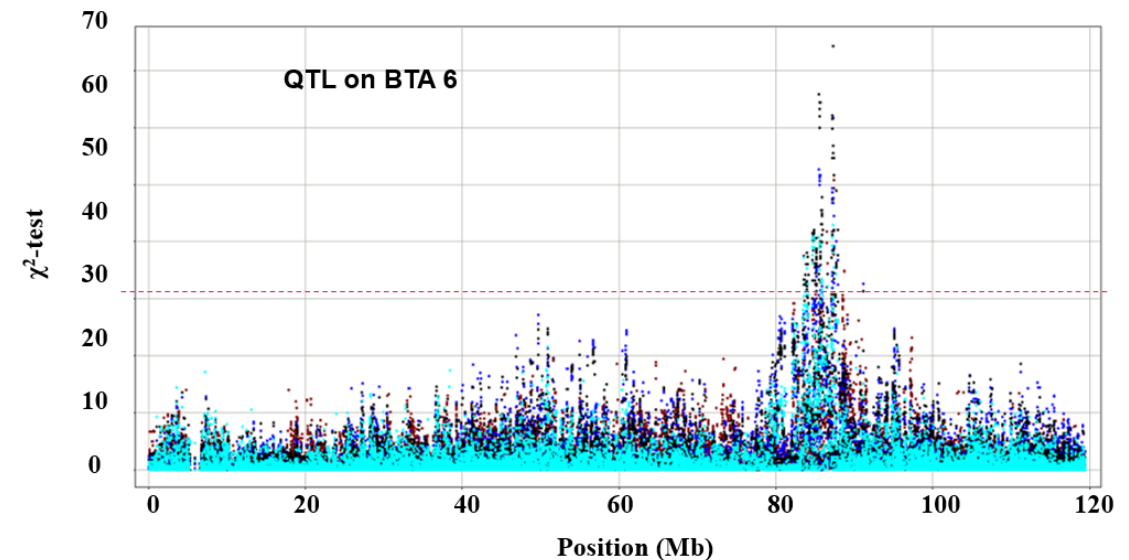
- Hög relativ koncentration av
 - α -LA
 - β -CN
- Låg relativ koncentration av
 - κ -CN
 - α_{S1} -CN 8P
 - β -LG



GWAS - helgenomstudie



- GWAS (helgenomstudie) för koaguleringssegenskaper
 - Högdensitetschip
- 9 unika QTL (kromosomregioner) identifierades ha en additiv effekt av den vanligaste haplotypen för löpe-inducerad koagulering
 - BTA 6, 13, 15, 16, 22, 27, 29, X
 - Förklarar 3-14% av den fenotypiska variationen
- QTL inkluderar
 - kaseingener (CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3)
 - glykosyleringsgen (GALNT1)
 - fosforyleringsgen (CSNK2A1)

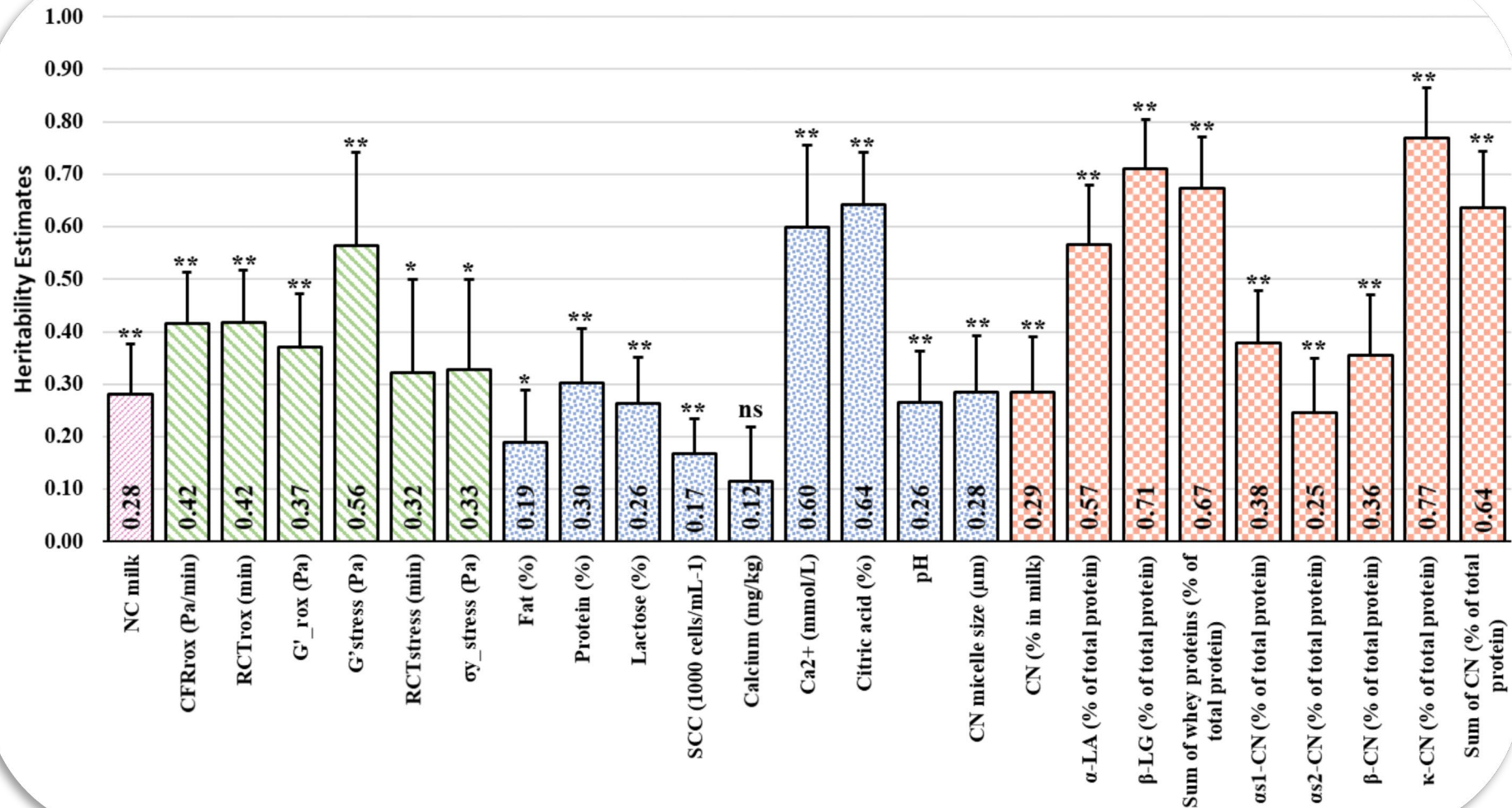


Identifierade SNPs relaterade till icke-koagulerande mjölk

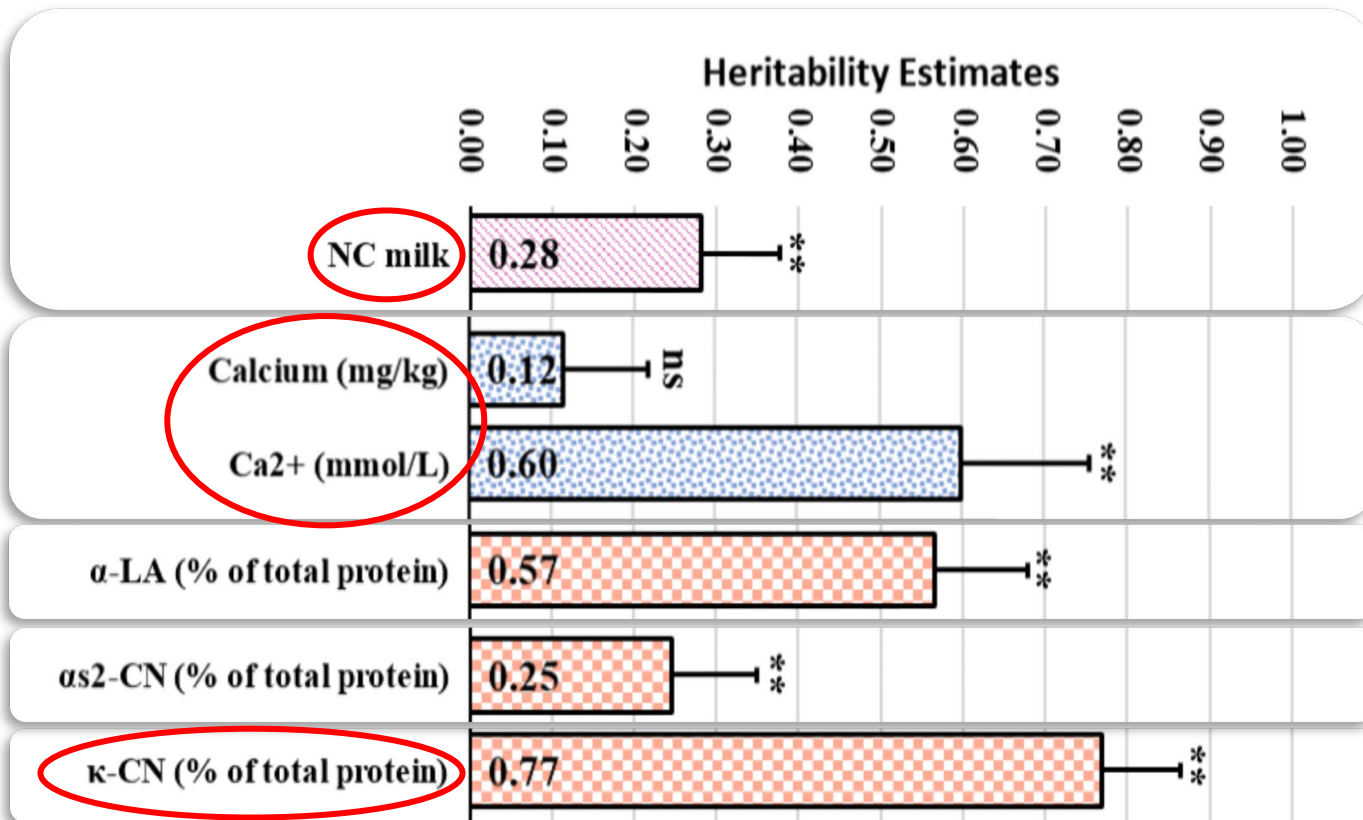
- Nya SNP i kaseingenerna har identifierats
- SNP för icke-koagulerande mjölk kunde identifieras:

Gene SNP ID ¹	BTA:bp ²	Allele (ref/alt) ³	Intron	AF (n = 30)	AF in NC (n = 13)	Variant consequence type
CSN1S1						
→ rs137349211	6:85424552	C/T	13	0.77/0.23	0.89/0.11	Splice pol. tract
rs110440863	6:85422786	T/C	12	0.42/0.58	0.31/0.69	Intron
rs109193501	6:85424759	A/G	14	0.92/0.08	0.92/0.08	Intron
ss9732325462	6:85413132	TT/T ⁴	1	0.97/0.03	0.96/0.04	Intron
ss9732325456	6:85415203	TT/T ⁴	2	0.33/0.67	0.23/0.77	Splice pol. tract
ss9732325455	6:85416195	CTTC/C ⁴	4	0.97/0.03	0.96/0.04	Intron
ss9732325458	6:85425555	TT/T ⁴	13	0.97/0.03	0.96/0.04	Splice pol. tract
ss9732325457	6:85425495	TTT/T ⁴	14	0.97/0.03	0.96/0.04	Splice pol. tract
CSN1S2						
→ rs110808655	6:85534747	T/C	5	0.62/0.38	0.77/0.23*	Intron
rs379988962	6:85535109	G/T	5	0.95/0.05	0.96/0.04	Splice pol. tract
rs110122319	6:85539636	T/C	12	0.60/0.40	0.73/0.27	Intron
→ rs133836703	6:85539717	C/T	12	0.52/0.48	0.65/0.35*	Intron
ss9732325449	6:85541964	T/TT ⁵	15	0.60/0.40	0.73/0.27	Intron
ss9732325454	6:85542736	T/TT ⁵	15	0.52/0.48	0.65/0.35	Intron
CSN2						
rs110466181	6:85450710	G/A	7	0.52/0.48	0.35/0.65*	Intron
→ rs110291532	6:85454960	A/AT ⁵	2	0.40/0.60	0.23/0.77*	Intron
CSN3						
→ rs136419748	6:85648236	T/A	1	0.73/0.27	0.88/0.12*	Intron
ss9732325461	6:85656352	T/TT ⁵	3	0.78/0.22	0.88/0.12	Intron

Arvbarhet av olika mjölkegenskaper



Arvbarhet och genetiska korrelationer



Non-coagulation vs.	Phenotypic correlation	Genotypic correlation
Fat, % in milk	-0,12*	-0,20
Calcium, mg/kg	-0,21*	-0,96*
Ca ²⁺ , mmol/L	-0,13*	-0,10
α -LA, %	0,16*	0,39*
β -LG, %	-0,10*	-0,02
α_{s2} -CN, %	0,03	0,58*
β -CN, %	0,18*	0,15
κ -CN, %	-0,22*	-0,65*

Slutsatser

- Ett alarmerande stort antal SRB-kor gav mjölk med nedsatt löpekoaguleringsförmåga i två på varandra följande studier
 - 18% icke-koagulerande mjölk och 19% dåligt koagulerande mjölk = 37% av mjölken som har försämrade koaguleringsegenskaper
- Ökad förståelse för mjölkens sammansättning och fysikaliska egenskaper som påverkar icke-koagulerande mjölk har uppnåtts
- Arvbarhetsskattningarna var måttliga – höga för koagulerings-egenskaper
 - Möjlighet att förbättra egenskaper genom avel
- Lovande markörer för icke-koagulering
 - Kalciumkoncentration
 - κ-kasein; koncentration och genetiska varianter



Relevans och rekommendationer

- Orsaken till icke-koagulerande mjölk är inte helt utredd och resultaten tyder på att egenskapen styrs av både fenotypiska och genetiska faktorer
- Markörer för genomisk selektion bör inkluderas i avelsarbetet för att minska förekomsten av den oönskade egenskapen icke-koagulerande mjölk
 - Indirekta markörer
 - Direkta markörer
- Variation i mjölkens koaguleringsförmåga bör även undersökas på gårds- och mejerinivå för att förstå vilken effekt andelen icke- och dåligt koagulerande mjölk kan ha på industriell ostproduktion
- Om förekomsten av sämre koagulerande mjölk fortsätter att öka finns det en risk att ostutbyte och ostkvalitet försämras med ekonomiska konsekvenser som följd för den svenska mejerinäringen



<http://srb-foreningen.se/>



LUND
UNIVERSITY