



**A TEHÉNTÉJ FŐ KAZEIN ÉS SAVÓFEHÉRJE FRAKCIÓINAK  
KVALITATÍV ÉS KVANTITATÍV MEGHATÁROZÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI  
ELEKTROFORETIKUS MÓDSZEREKKEL ÉS NAGYHATÉKONYSÁGÚ  
FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁVAL**

BUZÁS HENRIETTA<sup>1,2</sup> - SZAFNER GÁBOR<sup>2</sup> - KOVÁCS ATTILA JÓZSEF<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar,  
Mosonmagyaróvár,

<sup>2</sup>Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft., Mosonmagyaróvár

**ÖSSZEFOGLALÁS**

A tehéntejben átlagosan 3,3% valódi fehérje található, amely a tejalkotók közül az egyik legértékesebb komponens. A tejfehérje egy heterogén komplex peptid csoport, 90-95%-ban hat fő fehérjefrakció, az  $\alpha_{S1}$ -kazein,  $\alpha_{S2}$ -kazein,  $\beta$ -kazein,  $\kappa$ -kazein,  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin alkotja. A tejben található fehérjék sokféleségét tovább fokozza a genetikai polimorfizmus, valamint a poszttranszlációs módosulások okozta foszforiláció, glikolizáció és a proteolízis.

Számos tanulmány igazolta, hogy az egyes frakciók mennyisége és relatív aránya, bizonyos allélok előfordulása és a különböző a poszttranszlációs módosulások hatással lehetnek a tej fizikai-kémiai, táplálkozásélettani, valamint technológiai tulajdonságaira. Ezért az egyes tejfehérje frakciók pontos ismerete nem csak a tejipar, hanem a táplálkozástudomány számára is kulcsfontosságú.

Az egyes tejfehérje frakciók extrakciója, kvalitatív és kvantitatív meghatározása kihívást jelent. Az elmúlt három évtizedben számos publikáció jelent meg a kazein és savófehérje frakciók elektroforetikus és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás vizsgálatával kapcsolatban, ezek közül a leggyakrabban alkalmazott módszerek a gélelektroforézis különböző formái, a kapilláris zónaelektroforézis (CZE), a fordított

fázisú folyadékkromatográfia (RP-HPLC) és a legújabb mikrofluid „lab on a chip” technika. A szemlecikk célja a tejben található fő fehérje frakciók jellemzése, és a leggyakabban alkalmazott vizsgálati módszerek ismertetése.

**Kulcsszavak:** tejfehérje, kazein, savófehérje, HPLC, PAGE, Lab on a chip, CZE

## BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### Tehéntej fehérjefrakciói

A tehéntej átlagosan 3,3% valódi fehérjét tartalmaz (Swaisgood 1992, Csapó és Csapóné 2002). A tejben található fehérjéket 90-95%-ban négy kazein frakció ( $\alpha_{S1}$ -kazein,  $\alpha_{S2}$ -kazein,  $\beta$ -kazein,  $\kappa$ -kazein) és két savófehérje frakció ( $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin) alkotja (Heck et al. 2009, Holland et al. 2010). A fennmaradó 5-10%-ot kis koncentrációban előforduló frakciók alkotják, mint például a szérum albumin,  $\gamma$ -kazeinek, proteóz-pepton, immunglobulinok, valamint a laktoferrin (Farrell et al. 2004).

### Kazein fehérjék

A kazein fehérjék a foszfoproteinek heterogén csoportja, amelyek a nyers sovány tehéntejből (*Bos genus*) 20 °C-on 4,6-os pH-értéken kicsapódnak (Jennes et al. 1956). Aminosav szekvencia alapján négy fő kazein frakciót,  $\alpha_{S1}$ -kazein ( $\alpha_{S1}$ -CN),  $\alpha_{S2}$ -kazein ( $\alpha_{S2}$ -CN),  $\beta$ -kazein ( $\beta$ -CN),  $\kappa$ -kazein ( $\kappa$ -CN) különböztetünk meg (Farrell et al. 2004). Ezek egymáshoz viszonyított arányáról általánosságban elmondható, hogy 4:1:4:1 (Walstra 1999, Farrell et al. 2004, Fox és Brodtkorb 2008, Wang et al. 2009). Elektroforézissel végzett kísérletekben a négy kazein frakció mellett a  $\gamma$ -kazeint ( $\gamma$ -CN) is fő kazein frakcióként említik (Clayden et al. 2001). A  $\gamma$ -CN a  $\beta$ -CN különböző C terminális szegmensei, amelyek a tejben található natív plazmin enzim proteolitikus hasításából származnak (Groves 1969, Ostersen et al. 1997, Kaminski et al. 2007).

Az egyes kazein frakciók viszonylag kisméretű fehérjék, molekulatömegük 20-25 kDa (kilodalton), tejben azonban aggregátumokba tömörülnek, kisebb-nagyobb méretű, gömb alakú micellákat képeznek (Dalgleish 1992, Walstra 1999). A micellák 92% fehérjét és 8% kis molekulatömegű szervesen sókat, elsősorban kalcium-foszfátot tartalmaznak. A

micellák átmérője átlagosan 120 nm (50-500 nm) (Fox és Brodkorb 2008). A kazein fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezete hiányzik, ezért melegítés hatására nem denaturálódnak (Fox és McSweeney 1998), azonban a 140 °C-ot meghaladó hőkezelés alkalmazása esetén az egyes frakciók fokozatosan oldhatatlanná válnak (Singh 1995). A kazein frakciók további tulajdonsága, hogy a pH-ra érzékenyek, ezáltal 20 °C hőmérsékleten az izoelektromos ponthoz közeledve kicsapódnak (Walstra 1999).

### **Savófehérjék**

Savófehérjéknek nevezzük azokat a fehérje szegmenseket, amelyek savas kicsapás után is oldhatóak maradnak (Huppertz 2013). A két fő savófehérje frakció a  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -LG) és az  $\alpha$ -laktalbumin ( $\alpha$ -LA), arányuk a tehéntejben 3:1 (Swaisgood 1982). A két frakció a savófehérje megközelítőleg 80%-át alkotja. A savófehérjék globuláris fehérjék, másodlagos és harmadlagos szerkezettel rendelkeznek, így hőérzékenyek (Kinsella és Morr 1984, Ng-Kwai-Hang és Grosclaude 2003, Farrell et al. 2004). Az  $\alpha$ -laktalbumin már 63-67 °C-on, a  $\beta$ -laktoglobulin 74-77 °C-on denaturálódik (Paulsson és Dejmek 1990). További jellemzőjük, hogy hidrofóbbak, mint a kazeinek (Ng-Kwai-Hang 2002).

### **Az fő tejfehérje frakciók mennyiségét befolyásoló tényezők**

A fő tejfehérje frakciók mennyisége és egymáshoz viszonyított aránya nem állandó, ezeket elsősorban a genetikai tényezők határozzák meg (Ng Kwai Hang et al. 1987, Groen et al. 1994, Bobe et al. 1999, Heck et al. 2009, Gustavsson et al. 2014). Emellett befolyásolja a laktációs stádium (Ostersen et al. 1997, Gellrich et al. 2014), a tehen egészségi állapota (Verdi et al. 1987), a fajta (Mackle et al. 1999, Auldist et al. 2004, Poulsen et al. 2016), és évszak szerint is változatosságot mutatnak (O'Brien et al. 1999, Bernabucci et al. 2002, Bernabucci et al. 2014). Ez utóbbi azzal magyarázható, hogy az állatok a melegebb hónapokban általában kisebb fehérjetartalmú tejet termelnek, nagyobb esszenciális aminosav-tartalommal (Csapó és Csapóné 2002).

## Tejfehérje frakciók genetikai polimorfizmusa

A kazeinek és a savófehérjék genetikai polimorfizmusa igazolt (Farrell *et al.* 2004). A kérődzők tejében található fehérjék több mint 95 százalékát 6 szerkezeti gén kódolja (Martin *et al.* 2002).

A kazein frakciókat ( $\alpha_{s1}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN és  $\kappa$ -CN) négy polimorf gén (CSN1S1, CSN2, CSN1S2 és CSN3) kódolja (Ferretti *et al.* 1990, Threadgill és Womack 1990). A négy gén adott sorrendben helyezkedik el a kazein-gén klaszter 6. kromoszóma 250 kilobázis hosszúságú szakaszán (Rijnkels 2002, Boettcher *et al.* 2004). Az  $\alpha$ -laktalbumin és a  $\beta$ -laktoglobulin az LAA és az LGB gének expressziójából származnak, amelyek az 5. és 11. kromoszómán helyezkednek el (Hayes és Petit 1993). A fehérjék genetikai kódja meghatározza az adott fehérje aminosav szekvenciáját (Walstra *et al.* 2006). A genetikai mutációk egy vagy több aminosav szubsztitúciót vagy deléciót okoznak a kódoló szekvencián belül, ami eltérő aminosav szekvenciával rendelkező fehérje változatokat eredményezhet (Creamer és Macgibbon 1996, Bobe *et al.* 1999). Például az  $\alpha_{s1}$ -kazeinnél a CSN1S1 lókuszt kilenc allélt mutat (A, B, C, D, E, F, G, H és I), amelyek kilenc genetikai variánsnak felelnek meg. Napjainkig több mint 60 különböző tejfehérje-variánszt azonosítottak (Farrell *et al.* 2004, Caroli *et al.* 2009).

## Tejfehérjék mikroheterogenitása

A kazein fehérjék sokféleségét tovább fokozza a mikroheterogenitás. A mikroheterogenitás alatt a poszttranszlációs módosulások okozta foszforilációt, glikolizációt és a proteolízist értjük (Ng-Kwai-Hang 2003). Számos tanulmány igazolta, hogy az egyes frakciók mennyisége és relatív aránya (Dalgleish 1992, Amalfitano *et al.* 2019), bizonyos allélok előfordulása (Guinee 2003, Bittante *et al.* 2012, Jensen *et al.* 2012/b), és a különböző poszttranszlációs módosulások (Ng-Kwai-Hang és Grosclaude 2003, Caroli *et al.* 2009) befolyásolják a tej fizikai-kémiai, táplálkozásélettani, valamint technológiai tulajdonságait (Amalfitano *et al.* 2019).

## A főbb tejfehérje frakciók részletes jellemzése

Az egyes fehérje frakciók eltérő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek. A tehéntejben megtalálható hat fő frakció fontosabb fizikai és kémiai tulajdonságait az 1. táblázat tartalmazza.

1.táblázat: Tehéntejben található fő fehérjefrakciók fizikai-kémiai tulajdonságai

Table 1: Physicochemical properties of the main bovine milk protein fractions

Fehérje frakció	Átlagos koncentráció tehéntejben (g/l)	Méret (aminosav-szám)	Főbb genetikai variánsai	Molekula tömeg (kDa)	Izoelektromos pont
$\alpha_{s1}$ -CN	12-15	199	B	23,615	4,44–4,76
			C	23,542	
$\alpha_{s2}$ -CN	3-4	207	A	25,226	
$\beta$ -CN	9-11	209	A1	24,023	
			A2	23,983	4,83–5,07
			B	24,092	
$\kappa$ -CN	2-4	169	A	19,037	5,45–5,77
			B	19,006	5,3–5,8
$\beta$ -LG	2-4	162	A	18,363	5,13
			B	18,277	5,13
$\alpha$ -LA	0,6-1,7	123	B	14,178	4,2–4,5

(Forrás: Farrell et al. 2004, O'Mahony és Fox 2014)

(Source: Farrell et al. 2004, O'Mahony and Fox 2014)

Az 1.táblázatból jól látható, hogy az egyes kazein frakciók hasonló mérettel és molekulatömeeggel rendelkeznek, szemben a savófehérjékkel.

### $\alpha_s$ -kazein

A 199 aminosav hosszúságú  $\alpha_{s1}$ -CN a kazein frakció 40% -át alkotja (Huppertz 2013). Egy fő és egy mellékkomponensből áll. A két komponens egy egyláncú polipeptid, azonos aminosav-szekvenciával (Grosclaude et al. 1972), de eltérő foszforilációs fokkal.

A molekula elsődleges többszintű foszforilációs helye a 100-110. aminosav körül található (Mercier *et al.* 1981).

Az  $\alpha_{S2}$ -CN a tehéntejben a kazein frakció legfeljebb 10%-át teszi ki. Két fő és több kisebb komponensből áll, különböző szintű foszforilációs szinttel (Swaisgood 1982). A legkevésbé hidrofób más kazeinekhez képest (de Kruif és Holt 2003). A genetikai variánsok felfedezése óta a különböző genotípusokat megpróbálták összekapcsolni a tej technológiai tulajdonságaival és az egyed tejtermelési tulajdonságaival, azonban a kapott korrelációk nem voltak egyértelműek (Farrell *et al.* 2004).

### **$\beta$ -kazein**

A  $\beta$ -CN a kazeinfrakció megközelítőleg 45%-át alkotja. A  $\beta$ -CN egy erősen hidrofób kazein, amely öt foszforilezett csoportot tartalmazó polimerként van jelen a tejben (de Kruif és Holt 2003, Huppertz 2013). Napjainkig 13 változatát írták le, melyek közül az A1 és az A2 a leggyakoribb variánsok (Gallinat *et al.* 2013). A két forma egy aminosav szubsztitúcióval különbözik egymástól. A  $\beta$ -CN A1 esetében a 64. aminosavhelyen prolin, az A2 esetében hisztidin található. A *Bos* nemzetségben az eredeti  $\beta$ -CN változat az A2 (Caroli *et al.* 2009), azonban egy mutáció hatására egyes európai szarvasmarha állományban megjelent az A1 forma is (Ng-Kwai-Hang *et al.* 2002). A két forma közötti legfontosabb különbség, hogy az A1 variáns emésztése során, az aminosavcsere hatására  $\beta$ -kazomorfín-7 (BCM-7) keletkezik (Bell *et al.* 2006). A BCM-7-et egyes kutatások összefüggésbe hozzák egyes emésztőrendszeri megbetegedésekkel, azonban jelenleg ezek az összefüggések nem bizonyítottak (EFSA 2009). Az anyatejben a kazeinfrakció 85%-a  $\beta$ -kazein. (Greenberg *et al.* 1984, Hambraeus és Lonnerdal 2003), ezért a  $\beta$ -kazein érdekes az anyatej-helyettesítő tápszerek dúsítása szempontjából. Az anyatejben és a tehéntejben található  $\beta$ -kazein közötti különbség az eltérő foszforilációs állapot. A szarvasmarha  $\beta$ -kazein általában teljesen foszforilezett formában fordul elő, míg az anyatejben a  $\beta$ -kazein multifoszforilezett formában található, molekulánként 0–5 foszfátcsoporttal (Greenberg *et al.* 1984). A foszforilezettség foka jelentős tényező az emészthetőségénél, ezért a csecsemőtápszerek előállításánál javasolt a kazein defoszforilezése, ami által a tehéntejben megtalálható  $\beta$ -kazein jobban hasonlít az anyatejben található kazeinre (Broyard és Gaucheron 2015).

**$\kappa$ -kazein**

A kazein frakciók közül a legkisebb mennyiségben a  $\kappa$ -CN frakció található meg a tehéntejben. Foszforilációjának mértéke nagyon kicsi, azonban az egyetlen kazein frakció, amely akár 6 aminosav helyen is glikolizálható (Pisano et al. 1994). A többi kazeintől eltérően szénhidrátban gazdag glikopolipeptid részt tartalmaz (124-155. pozíció), amely galaktózból, galaktózaminból és szialinsavból épül fel. Elegejtekben a  $\kappa$ -CN molekulák 60%-a glikolizált formában található meg (Vreeman et al. 1986). Két leggyakoribb variánsa az A és a B (Farrell et al. 2004). A B variáns nagyobb fokú glikozilációval társul, összehasonlítva az A variánssal (Coolbear et al. 1996). Napjainkig kevés ismeret áll rendelkezésre a  $\kappa$ -CN glikozilezés szerepéről a tej technológiai tulajdonságainak determinizmusában (Bonfatti et al. 2014). A tejelő fajtáknál az A variáns a domináns, kivétel ez alól a Jersey fajta (Ng-Kwai-Hang és Grosclaude 2003). A tejfehérjék genetikai variánsainak a tejalvadási tulajdonságokra gyakorolt hatását számos tanulmány vizsgálta. A  $\kappa$ -CN allélokra vonatkozó vizsgálatok azt mutatták, hogy a B allél szignifikánsan kedvezően hat a tejfehérje tartalomra (Ng-Kwai-Hang et al. 1984, Aleandri et al. 1990, Ikonen et al. 1997) és sajtgyártás során a B variáns kedvezőbb alvadási tulajdonságokkal rendelkezik (Ikonen et al. 1999, Di Stasio és Mariani 2000, Wedholm et al. 2006, Jensen et al. 2012/a). Ezzel szemben, a  $\kappa$ -CN A és E allélek gyenge alvadási tulajdonságot eredményeznek (Schaar et al. 1985, Marziali és Ng-Kwai-Hang 1986, Ikonen et al. 1999, Hallén et al. 2007, Heck et al. 2009, Jensen et al. 2012/a).

 **$\beta$ -laktoglobulin**

A  $\beta$ -laktoglobulin a savófehérjék több mint felét, az összefehérjének hozzávetőlegesen 10-12%-át alkotja (Farrell et al. 2004). Leggyakoribb variánsa az A és B, amelyek két aminosavban különböznek. A  $\beta$ -LG a tejfehérjék közül az egyik legallergénebb fehérjefrakció (Bu et al. 2013) emiatt nagy érdeklődés mutatkozik a csökkentett  $\beta$ -laktoglobulin tartalmú anyatej-helyettesítő tápszerek előállítására. Technológiai szempontból sajtgyártás során a  $\beta$ -laktoglobulin B variáns kedvezőbb alvadási tulajdonságokkal rendelkezik.

## **$\alpha$ -laktalbumin**

Viszonylag kisméretű fehérje, 123 aminosavat tartalmaz, molekulatömege 14 kDa. Tehéntejben az összes fehérje körülbelül 3,5%-át, a savófehérjék hozzávetőlegesen 17%-át alkotja (*O'Mahony et al.* 2013). Az anyatejben az  $\alpha$ -laktalbumin az egyik alapvető savófehérje frakció, így anyatej-helyettesítő tápszerekeben alkalmazzák.

## **Tejfehérjék vizsgálata elektroforetikus módszerekkel**

Az egyes tejfehérje frakciók extrakciója, kvalitatív és kvantitatív meghatározása napjainkban is kihívást jelent. A tejben található fehérje egy heterogén komplex peptidcsoport. A mennyiségi meghatározást nagyban megnehezíti, hogy jelenleg a kereskedelmi forgalomban kapható fehérjefrakció standardok legtöbbször csak 70-90% tisztaságúak és az egyes genetikai variánsokra jelenleg nem is érhető el (*Farrell et al.* 2004, *Dupont et al.* 2018). Az elmúlt három évtizedben számos publikáció jelent meg a kazein és a savófehérje frakciók elektroforetikus és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás vizsgálatával kapcsolatban, melyek közül a leggyakrabban alkalmazott módszerek a gélelektroforézis különböző formái, a kapillaris zónaelektroforézis (CZE), a fordított fázisú folyadékkromatográfia (RP-HPLC) és a legújabb mikrofluid „lab on a chip” technika. A következő fejezetben a felsorolt vizsgálati módszerek előnyeit és hátrányait ismertetem a tejfehérje vizsgálatok vonatkozásában.

## **Tejfehérjék vizsgálata gélelektroforézissel**

Az elektroforézis elvén alapuló elválasztási technikák esetén az oldat töltéssel rendelkező részecskéi elektromos erőtér hatására különböző sebességgel mozdulnak el. A gélelektroforézist széles körben alkalmazzák a tejben lévő fő fehérje frakciók és azok genetikai variánsainak elválasztásához. A módszer elvégezhető keményítő, poliakrilamid vagy poliakrilamid-agaróz gélen. A módszer különböző festési eljárásokkal és denzitometriás szkennelést követően fehérjék szemikvantitatív meghatározására alkalmas (*Dziuba és Mioduszevska* 1997, *Lin et al.* 2010).

## **Tejfehérjék vizsgálata keményítő gélelektroforézissel**

A keményítő gélelektroforézist *Melachouris és Tuckey* (1966) alkalmazta először kazeinek és egyes bomlástermékek vizsgálatára sajtban. A keményítő gélek ugyan jó elválasztást tettek lehetővé, azonban kiöntés után gyakran opálosak és törékenyek voltak



(*Smithies 1955, Tremblay et al. 2003*). Ezen hátrányok kiküszöbölésére a keményítő gélek használatát fokozatosan felváltották a poliakrilamid gélek használata.

### **Tejfehérjék vizsgálata poliakrilamid-gélelektroforézissel (PAGE)**

A poliakrilamid, az akrilamid és az N,N'-metilén-bisz-akrilamid (BIS) térhálós szerkezetű polimerizációs terméke. A monomerek koncentrációjával szabályozható a gél pórusnagysága, amely meghatározza az átszűrődő molekulák maximális tömegét. A poliakrilamid gélen végzett tejfehérje vizsgálatokra számos módszertani variáció terjedt el, mint a natív-PAGE, urea-PAGE, vagy nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid-gél (SDS-PAGE) alkalmazása.

### **Natív-PAGE**

A natív-PAGE mérés technikai módszer esetében a fehérjéket natív állapotukban választják el nettó töltésük, méretük és alakjuk alapján (*Smith 1984*). A „natív” elektroforézis kifejezés a fehérje elemzésére utal összehasonlítva az elektroforézis egyéb formáival, ahol denaturáló (SDS vagy urea) vagy redukáló szereket (merkaptotanol (ME) vagy ditiotreitolt (DTT)) használnak (*Pesic et al. 2011*). Mivel a kazeinek különböző frakcióinak izoelektromos pontja között viszonylag kicsi az eltérés (*1. táblázat*), a natív-PAGE nem alkalmas a kazein frakciók elválasztására, azonban lehetővé teszi a savófehérjék elválasztását (*McSweeney és Fox 1997, Lin et al. 2010*), ezért elsősorban tejhamisítási vizsgálatoknál alkalmazzák (*Pesic et al. 2011*). A molekula tömeg „létra” nem alkalmazható ennél a módszernél, így a fehérjék azonosítása nehézkes, tisztított fehérjefrakció standardok egyidejű futtatásával érhető el (*Sharma et al. 2021*). A módszer felbontóképessége általában kisebb, mint az SDS-PAGE módszeré, azonban előnye, hogy a fehérje natív szerkezetét elektroforézist követően is lehet vizsgálni (*Kurien és Scofield 2005*).

### **Urea-PAGE**

Az urea (karbamid) nagy koncentrációban denaturálja a fehérjéket. A fehérje denaturálásához szükséges ureakonzentráció körülbelül 6 M (*Schagger 2006*). A mintapufferhez adott karbamid javítja a kazeinek elválasztását, azonban elmosódott halvány  $\alpha$ -laktalbumin és  $\beta$ -laktoglobulin fehérje sávokat eredményez, amelyeket nehéz azonosítani (*Patel et al. 2006, Yukalo et al. 2019*). Az  $\alpha_2$ -kazein és a  $\kappa$ -kazein

elválasztásához 2-merkaptóetanol is szükséges a mintapufferbe (Andrews 1983). A módszert Duarte-Vázquez és munkatársai (2017)  $\beta$ -kazein A1 és A2 azonosítására alkalmazták tehéntejben, azonban genotipizáláshoz jelenleg még széles körben nem terjedt el. A módszer alkalmas különböző fajoktól származó tejek elemzésére, kihasználva, hogy a ló és a teve  $\beta$ -kazein és  $\kappa$ -kazein lassabban vándorol, összehasonlítva a szarvasmarha-, kecske- vagy bivaly tejével (Hinz et al. 2012).

## SDS-PAGE

Az SDS-PAGE technika a fehérjéket denaturált állapotban, főként a molekulatömegük alapján választja el. Az SDS (nátrium-dodecil-szulfát) egy erős anionos detergens, amely denaturálja a fehérjéket a hidrogénkötések lehasításával, másodlagos és harmadlagos szerkezetük felbontásával (Westermeier 2011), ezáltal 0,1 mmólnál nagyobb koncentráció konformációs változásokat okoz a fehérjékben (Reynolds és Tanford 1970).

Az SDS a fehérjékhez specifikusan kötődik, kitekeri a fehérjéket és ionos tulajdonsága miatt megközelítőleg azonos fajlagos (negatív) töltést biztosít a fehérjéknek. A tejfehérjék elválasztása esetében a leggyakrabban alkalmazott puffer a TRIS-glicin (Laemmli 1970). Az SDS-PAGE során a fehérje által megkötött SDS mennyisége arányos a fehérje tömegével. Átlagosan 1,4 g SDS kötődik 1 g fehérjéhez (Reynolds és Tanford 1970, Smith 1984).

Az SDS-PAGE alkalmas a savófehérje frakciók elválasztására, azonban kazein frakciók közel azonos molekulatömege (1. táblázat) miatt nem túl hatékony a kazeinek elválasztásában. További hátránya, hogy a  $\beta$ -kazein, amely nagy hidrofóbitással rendelkezik aránytalanul nagy mennyiségű SDS-t köt meg, következésképpen nagyobb elektroforetikus mobilitással rendelkezik, mint az  $\alpha_{S1}$ -kazein, amely egy nagyobb molekula (Creamer és Richardson 1984). Számos kutatásban mégis alkalmazzák a fehérjék látszólagos molekulatömegének meghatározására (Shapiro et al. 1967, Sheehan 2009), annak ellenére, hogy a mért érték jellemzően sokkal nagyobb, mint az egyéb technikával (tömegspektroszkópia) mért tényleges molekulatömeg (Dziuba 2002).

## Kétdimenziós gélelektroforézis

A kétdimenziós gélelektroforézist (2-DGE) O'Farrell (1975) alkalmazta elsőként. Ez a technika a fehérjék két molekuláris tulajdonságát is felhasználja (molekulatömeg,

izoelektromos pont), hogy megkönnyítse a hasonló molekulatömegű vagy izoelektromos ponttal rendelkező fehérjék elválasztását. A 2-DGE alkalmazásakor a fehérjék szétválasztása az első dimenzióban izoelektromos fókuszálással töltés szerint történik (IEF), majd a gélsíkot SDS-PAGE módszerrel molekulatömegük szerinti szeparálást végeznek (Ong és Pandey 2001). A módszer hátránya, hogy az kis koncentrációban lévő fehérjéket nehéz detektálni. Ennél a módszernél a fehérjék festést követően nem sávokban, hanem foltokként jelennek meg a gél képén *Hinz et al.* (2012)

### **Kapilláris zónaelektroforézis (CZE)**

Kapilláris elektroforézisről beszélünk, ha az elektroforetikus elválasztás kis belső átmérőjű (50  $\mu\text{m}$ ) 0,5-1 cm hosszú kapillárisokban történik nagy feszültség hatására. A legegyszerűbb és leggyakrabban alkalmazott kapilláris elektroforetikus módszer, a kapilláris zónaelektroforézis (CZE), amely a részecskék eltérő elektroforetikus mozgékonyaságán alapul. A kapilláris elektroforézis nem egy vertikális vagy horizontális gélben, hanem egy kapilláris belsejében történik. A módszer sokkal pontosabb a fehérjék mennyiségi meghatározásában, mint a klasszikus PAGE módszerek (*Strickland et al.* 2001). Számos tanulmány beszámol a savófehérjék (*Recio et al.* 1995) és a kazeinek (*Otte et al.* 1997, *Ortega et al.* 2002), valamint azok genetikai variánsainak egyidejű elválasztásáról (*Reico et al.* 1996, *Recio et al.* 2001). A módszer lehetővé teszi nyolc és kilenc foszfátcsoportot tartalmazó  $\alpha_{s1}$ -CN elválasztását (*Recio et al.* 1997), az  $\alpha_{s2}$ -CN és  $\alpha_{s2}$ -CN CZE kazein genotípusainak mennyiségi meghatározását (*Gomez et al.* 2004), valamint a kazeinek bomlás termékeinek vizsgálatát (*Otte et al.* 1997).

A tejfehérjék vizsgálatára elsőként *Chen és Zang* (1992) alkalmazta a módszert. Kísérleteik során azt tapasztalták, hogy foszfátpuffer alkalmazásával, urea jelenléte nélkül a kazein frakciókat nem sikerül elválasztaniuk. Karbamid foszfát pufferrel (4 M urea foszfátpufferben, pH=7) 10 perc alatt sikeresen elválasztották a  $\beta$ -kazeint, az  $\alpha$ -laktalbumint és a  $\beta$ -laktoglobulint. *Chen és Tusak* (1994) a vizsgálataikban magas pH-értékű nagy ionerősségű puffert (borát puffer pH = 10,0) alkalmaztak, azonban a savófehérjéket nem sikerült elválasztaniuk. A  $\beta$ -laktoglobulin és az  $\alpha$ -laktalbumin együtt eluálódott az  $\alpha$ s-kazeinnel. A fehérjék CE-elemzésének egyik fő problémája a fehérjék adszorpciója a negatív töltésű fuzionált kvarc kapilláris felületre, ami torz csúcsformákhoz és rossz elválasztásokhoz vezet (*Chen és Zang* 1992, *Reico* 1997). Elsőként *Nynke de Jong* és munkatársainak sikerült CZE módszerrel a savófehérjék és a

kazein fehérjék egyidejű elválasztása (*de Jong et al.* 1993). Kísérleteikhez kvarc kapilláris helyett hidrophil töltetű kapillárist használtak fel kis pH-értékű puffer oldattal (20 mM nátrium-citrát, pH=3). *Visser et al.* (1991) elválasztotta  $\beta$ -kazein három genetikai variánsát (A1, A2, A3) A módszer előnye a hagyományos elektroforetikus és kromatográfiai módszerekkel szemben a gyorsaság, nagy felbontás, egyszerűség és a kicsi üzemeltetési költségek (*Gutierrez és Jakobovits* 2003, *Kinghorn et al.* 1995).

### **„Lab on a chip” mikrofluidikai módszer**

A „Lab on a chip” módszer során a vizsgálat a mintaelőkészítéstől a detektálásig elvégezhető egy darab chip felületén. A berendezés egy 5 cm oldalú négyzet alakú chip. A chip felületén található mikroutakat a vizsgálandó mintával és reagenssel töltik meg (*Nazzaro et al.* 2012).

A mérés technika eredetileg a DNS és az RNS szétválasztására és mennyiségi meghatározására használták (*Goetz et al.* 2004). A mikrofluid technika előnye más elektroforézis módszerekkel szemben a rendkívül rövid elemzési ideje (1–3 perc), az elemzés kicsi költsége, a nagy érzékenysége, továbbá, hogy a mérésekhez kis mintamennyiség szükséges (*Nazzaro et al.* 2012, *Dolnik és Liu* 2005, *Tran et al.* 2010). *Bütikofer és munkatársai* (2006) nyers és hőkezelt tejek  $\alpha$ -laktalbumin és  $\beta$ -laktoglobulin tartalmát határozták meg mikrofluid, kapilláris elektroforézissel Kjeldahl módszerrel. A két fehérje frakció aránya az összes fehérjére vonatkoztatva százalékos arányban mikrofluid technikával  $12,8 \pm 0,2\%$ , míg a kapilláris elektroforézis módszerrel  $13,3 \pm 0,6\%$  volt. Az eredmények jó egyezőséget mutattak a Kjeldahl módszerrel becsült értékkel, amelyben a két savófehérje frakció aránya az összes fehérjére vonatkoztatva  $13,3\%$  volt. *Anema* (2009) a mikrofluid technikával fölözött tej mintákat vizsgált. Hatékony elválasztást ért el a fő kazein- és savófehérje frakciókra. Bár a mérőmódszer chipen belüli reprodukálhatósága jó volt, azonban a chippek között a csúcs alatti területek korrelációs koefficiens értékére 10-15% közötti értékeket figyeltek meg. *Buffoni és munkatársai* (2011) mediterrán vízbivalytól származó (*Bubalus bubalis*) egyedtejekből nyert savó mintákban vizsgálta az  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin és szérum-albumin (SA) tartalmát. Mennyiségi meghatározáshoz a fehérje standardokat minden egyes chipre feltöltötték, így az átlagos korrelációs együttható  $0,95$  ( $\alpha$ -laktalbumin)  $0,94$  ( $\beta$ -laktoglobulin) és  $0,93$  (szérum albumin) volt (*Buffoni et al.* 2011).

*Costa és munkatársai* (2014) TPS puffer (karbamid koncentráció: 2 mol/L) és SEP puffer (karbamid koncentráció 6 mol/L) hatását vizsgálta az elválasztás javítása céljából. Mindkét puffer javította az elválasztást. A két puffer közül a SEP puffer a kazeinfrakciók hatékonyabb elválasztását és mennyiségi meghatározását eredményezte. Ez azzal magyarázható, hogy a kazeinek karbamid jelenlétében disszociálódnak (*Hames és Rickwood* 1998).

### **Fordított fázisú kromatográfia**

A folyadékkromatográfiai módszerek közül a fordított fázisú folyadékkromatográfia (RP-HPLC) napjainkra az egyik leggyakoribb és egyben legmegbízhatóbb vizsgálati módszerre vált a tejben lévő fehérjefrakciók és egyes genetikai variánsok azonosítására és mennyiségi meghatározására (*Bordin et al.* 2001, *Bonfatti et al.* 2008, *Bonfatti et al.* 2013). A folyadékkromatográfiai rendszer a legegyszerűbb esetben egy kromatográfiai töltetből (állófázis) oszlopból (kolonnából), mobil fázisból, a mozgófázist az oszlopon átnyomó pumpából, valamint a molekulák retenciós (visszatartási) idejét jelző detektorból áll. A módszer az állófázis és a mozgófázis közötti hidrofób kölcsönhatáson alapul. A mérőrendszer egy n-alkil-szilikát alapú állófázist tartalmaz, amelyben az oldott anyagokat növekvő koncentrációjú gradiensekkel eluálják (*Aguilar* 2003.). Jellemzően a tejfehérjék elemzéséhez állófázisként C18 (*Bobé et al.* 1998/a), C8 (*Bonfatti et al.* 2008) és C4 oszlopokat (*Ma et al.* 2017) alkalmaznak. A mobil fázis gyakran tartalmaz ionpárosító szert, például 0,1% trifluor-ecetsavat (TFA), amely elegendő hidrofób képességű ionpárt hoz létre, hogy az állófázis megtartsa (*Sheehan* 2009). A mintaelőkészítés során a mintapuffer általában denaturálószerként ureát vagy guanidin-hidrokloridot, redukálószerként ditiotreitolt (DTT) tartalmaz. A fehérjék detektálásához UV, UV-VIS vagy diódasoros detektálási (DAD) módot alkalmaznak jellemzően 210-280 nm hullámhosszú tartományban. Kezdetben a kazeineket és savófehérjéket savas kicsapással elválasztották (*Carles* 1986, *Visser et al.* 1986, *Strange et al.* 1991, *Parris és Baginski* 1991), mert tejfehérjék egyidejű elemzése nem volt alkalmas. A tejfehérjék egyidejű meghatározásáról számoltak be *Visser és munkatársai* (1991) kísérleteik során a mintapuffer redukálószerként ureát, 2-merkaptotetanolt és tinátrium-citrát dihidrátot tartalmazott. A főlözött tej vizsgálata során az  $\alpha$ -laktalbumint nem sikerült elválasztaniuk, együtt eluálódott a  $\beta$ -kazein frakcióval. *Groen és munkatársai* (1994) a *Visser és*

munkatársai (1991) által leírt protokoll szerint vizsgáltak 95 tejmintát, azzal a különbséggel, hogy redukálószerként merkaptotetanol helyett ditiotreitolt (DTT) használtak. Az általuk leírt módszerrel az  $\alpha$ -laktalbumint nem sikerült elválasztaniuk a  $\beta$ -laktoglobulin B frakciótól. Emellett ellentétben *Visser et al.* (1991) által leírtakkal az  $\alpha$ -laktalbumin nem az  $\alpha_{s1}$ -kazein és  $\beta$ -kazein között eluálódott. *Bobe és munkatársai* (1998/b) számos mintaelőkészítési protokollt és reagenst vizsgáltak a tejben lévő fehérjék elemzésére. A kapott eredmények összhangban voltak *Visser et al.* (1991) és *Groen* (1994) által leírt eredményekkel, miszerint a mintapufferben alkalmazott redukálószer típusa befolyásolja az  $\alpha$ -laktalbumin és  $\beta$ -laktoglobulin retenciós idejét. Elsőként *Bobe és munkatársai* (1998/a) fejlesztett ki egy olyan mintaelőkészítési eljárást, amely alkalmas volt egyidejűleg elválasztani és mennyiségileg meghatározni a fő fehérje frakciókat. Kísérleteikhez C18-as oszlopot, puffer oldatban urea helyett guanidin-hidrokloridot, nátrium-citrátot és DTT-t alkalmaztak. A detektálási hullámhossz 220 nm volt. Az általuk leírt mintaelőkészítési protokoll és mérési módszer alkalmas a fő kazein és savófehérje frakciók, valamint a  $\kappa$ -kazein,  $\beta$ -kazein és  $\beta$ -laktoglobulin genetikai variánsainak elválasztására 52 perc alatt. *Bonfatti és munkatársai* (2008) a *Bobe és munkatársai* (1998/a) által leírt mintaelőkészítési protokollal, C8-as oszlop alkalmazásával és a mozgófázis összetételének változtatásával optimalizált módszer lehetővé teszi fő fehérje frakciók mellett a genetikai variánsok mennyiségi meghatározását is.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Az egyes tejfehérje frakciók mennyisége és relatív aránya, bizonyos allélok előfordulása és a különböző a poszttranszlációs módosulások hatással lehetnek a tej fizikai-kémiai, táplálkozásélettani, valamint technológiai tulajdonságaira (*Caroli et al.* 2009, *Amalfitano et al.* 2019). Ennél fogva az egyes tejfehérje frakciók pontos ismerete nem csak a tejipar, hanem a táplálkozástudomány számára is kulcsfontosságú (*Bar et al.* 2019). Napjainkban a leggyakrabban alkalmazott technikák a tejfehérjék elválasztására és számszerűsítésére a poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE), kapilláris elektroforézis (CE) és nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) (*Costa et al.* 2014).

A felsorolt mérés technikák midegyikének vannak előnyei és hátrányai, egyik módszer sem nyújt teljes körű információt a tej fehérjefrakcióiról. Az elektroforetikus módszerek közül a poliakrilamid gélen végzett vizsgálatok előnye, hogy a fő tejfehérje frakciók

mellett kisebb fehérje komponensek, valamint, egyes fehérjefrakciók bomlástermékei is vizsgálhatóak és nincs szükség a drága berendezésekre. Hátránya, hogy a többi módszerhez képest időigényes és szemikvantitatív meghatározást tesz lehetővé. *Sharma és munkatársai* (2020) szerint, a poliakrilamid gélen végzett elektroforetikus technikák közül az urea-PAGE a kazeinekre, míg natív-PAGE a savófehérjékre alkalmasabb. A kazeinek és savófehérjék egyidejű elválasztásra, az SDS-PAGE a legjobb módszer, mivel az SDS gélek egyszerre képesek elválasztani mind a kazeineket, mind a savófehérjéket és a nettó molekulatömegük egyidejűleg is meghatározható.

*Anema* (2009) eredményei alapján a mikrofluidika chip technológia egy gyors alternatíva lehet a tejfehérje elválasztására és mennyiségi meghatározására azonban hátránya, hogy fő tejfehérje frakciókra korlátozódik és nem alkalmas az egyes genetikai variánsok elválasztására. A fordított fázisú kromatográfia és kapilláris zónaelektroforézis hatékony és megbízható vizsgálati módszer a tej fő fehérjefrakcióinak és azok genetikai variánsainak meghatározására (*Heck et al.* 2009, *Bordin et al.* 2001)

## QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE MAIN BOVINE CASEIN AND WHEY PROTEIN FRACTIONS BY ELECTROPHORETIC TECHNIQUES AND HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

HENRIETTA BUZÁS<sup>1,2</sup>, GÁBOR SZAFNER<sup>2</sup>, ATTILA JÓZSEF KOVÁCS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences  
Department of Biosystems and Food Engineering Mosonmagyaróvár

<sup>2</sup>Hungarian Dairy Research Institute, Mosonmagyaróvár

### ABSTRACT

Bovine milk contains on average of 3.3% true protein. It is one of the most valuable ingredients of the milk components. Milk proteins are a heterogeneous group of peptides, it 90-95 percent consists of six main protein fractions, namely  $\alpha_{S1}$ -casein,  $\alpha_{S2}$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin. The protein fractions heterogeneity

further enhanced by the post translational modifications like glycosylation, phosphorylation, genetic polymorphism.

Numerous studies have shown that the amount and relative proportions of the fractions and the presence of certain alleles, various posttranslational modifications can affect nutritional value and the technological properties of milk. Consequently, accurate knowledge of the individual milk protein fractions is high interest, not only for the dairy industry but also for nutrition researches.

The extraction, qualitative and quantitative determination of each milk protein fraction is a challenging. In the last three decades, several studies have been published on the electrophoretic and high-performance liquid chromatographic analysis of casein and whey protein fractions. The most commonly used methods are the various forms of gel electrophoresis, capillary zone electrophoresis (CZE), reversed-phase chromatography (RP-HPLC) and the latest microfluidic “lab on chip” technique. Each of these techniques listed has advantages and disadvantages and none of the methods provides complete information on the milk protein fraction. The purpose of the review is to characterize the main individual milk protein fractions. Description of the most commonly used test methods for the milk protein separations and quantification.

**Keywords:** milk protein fractions, caseins, whey proteins, PAGE, RP-HPLC, lab on a chip, CZE

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

A publikáció elkészítését az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 számú „Innovatív tudományos műhelyek a hazai agrár felsőoktatásban” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

## **IRODALOMJEGYZÉK:**

*Aguiar, M. (2003): HPLC of Peptides and Proteins, Methods and Protocols. Humana Press. Totowa.*



- Aleandri, R. – Buttazzoni, L. G. – Schneider, J. C. – Caroli, A. – Davoli, R.* (1990): The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *Journal of Dairy Science*. 73, (2) 241-255.
- Amalfitano, N. C. - Cipolat-Gotet, A. – Cecchinato, M. - Malacarne Summer, A.- Bittante, G.* (2019): Milk protein fractions strongly affect the patterns of coagulation, curd firming, and syneresis. *Journal of Dairy Science*. 102, (4) 2903–2917.
- Andrews, A. T.* (1983): Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*. 50, (1) 45-55.
- Anema, S. G.* (2009): The use of ‘‘lab-on-a-chip’’ microfluidic SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins. *International Dairy Journal*. 19, (4) 198-204.
- Auldust, M. J. – Johnston, K. A. – White, N. J. – Fitzsimons, W. P. – Boland, M. J.* (2004): A comparison of the composition, coagulation characteristics and cheese making capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows. *Journal of Dairy Research*. 71, (1) 51-57.
- Bar, C. – Mathis, D. – Neuhaus, P. – Dürr, D. – Bisig, W. – Egger, L. – Portmann, R.* (2019): Protein profile of dairy products: Simultaneous quantification of twenty bovine milk proteins. *International Dairy Journal*. 97, (1) 167-175.
- Bell, S. J. – Grochoski, G. T. – Clarke, A. J.* (2006): Health Implications of Milk Containing  $\beta$ -Casein with the A2 Genetic Variant. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46, (1) 93-100.
- Bernabucci, U. – Biffani, S. L. – Buggiotti, L. – Vitali, A. – Lacetera, N. – Nardone, A.* (2014): The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 97, (1) 471-486.
- Bernabucci, U. – Lacetera, N. Ronchi, B. – Nardone, A.* (2002): Effects of the hot season on milk protein fractions in Holstein cows. *Animal Research*. 51, (1) 25-33.
- Bittante, G. – Penasa, M. – Cecchinato, A.* (2012): Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*. 95, (12) 6843–6870.
- Bobe, G. – Beitz, D. C. – Freeman, A. E. – Lindberg, G. L.* (1998/a): Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, (4) 458–463.
- Bobe, G. – Beitz, D. C. – Freeman, A. E. – Lindberg, G. L.* (1998/b): Sample preparation affects separation of whey proteins by reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, (4) 1321–1325.

- Bobe, G. – Beitz, D. C. – Freeman, A. E. – Lindberg, G. L. (1999):* Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. *Journal of Dairy Science.* 82, (12) 2797-2804.
- Boettcher, P. J. – Caroli, A. – Stella, A. – Chessa, S. – Budelli, E. – Canavesi, F. (2004):* Effects of casein haplotypes on milk production traits in Italian Holstein and Brown Swiss cattle. *Journal of Dairy Science.* 87, (12) 4311–4317.
- Bonfatti, V. – Chiarot, G. – Carnier, P. (2014):* Glycosylation of  $\kappa$ -casein: Genetic and nongenetic variation and effects on rennet coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science.* 97, (4) 1961-1969.
- Bonfatti, V. – Gervaso, M. – Rostellato, R. – Coletta, A. – Carnier, P. (2013):* Protein composition affects variation in coagulation properties of buffalo milk. *Journal of Dairy Science.* 96 (7) 4182-4190.
- Bonfatti, V. – Grigoletto, L. – Cecchinato, A. – Gallo, L. – Carnier, P. (2008):* Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *Journal of Chromatography A.* 1195, (1-2) 101-106.
- Bordin, G. – Cordeiro Raposo, F. – de la Calle, B. – Rodriguez, A. R. (2001):* Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 928 (1) 63-76.
- Broyard, C. – Graucheron, F. (2015):* Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. *Dairy Science and Technology.* 95, (6) 831-862.
- Bu, G. – Luo, Y. – Chen, F. – Liu, K. – Zhu, T. (2013):* Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Science & Technology.* 93, (3) 211-223.
- Buffoni, J. N. – Bonizzi, I. – Pauciullo, A. – Ramunno, L. – Feligini, M. (2011):* Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Food Chemistry.* 127, (4) 1515-1520.
- Butikofer, U. – Meyer, J. – Rehberger, B. (2006):* Determination of the percentage of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin of total milk protein in raw and heat treated skim milk. *Milchwissenschaft.* 61, (3) 263-266.
- Carles, C. (1986):* Fractionation of bovine caseins by reversed phase high performance chromatography: identification of a genetic variant. *Journal of Dairy Research.* 53, (1) 35–41.

- Caroli, A. M. – Chessa, S. – Erhardt, G. J. (2009).* Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science.* 92, (11) 5335–5352.
- Chen, F. T. A. – Tusak, A. (1994):* Characterization of food proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A.* 685, (2) 331-337.
- Chen, F. T. A. – Zang, J. H. (1992):* Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of AOAC International.* 75, (1) 905–909.
- Clayden, J. – Greeves, N. – Warren, S. – Wothers, P. (2001):* Organic Chemistry, Oxford University Press Inc. New York.
- Coolbear, K. P. – Elgar, D. F. – Ayers, J. S. (1996):* Profiling of genetic variants of bovine  $\kappa$ -casein macropeptide by electrophoretic and chromatographic techniques. *International Dairy Journal.* 6, (11-12) 1055–1068.
- Costa, F. F. – Brito, M. A. V. P.- Furtado, M. A. M. – Martins, M. F. – Olivera, M. A. L. -Barra, P. M. C. – Santos, A. S. O. (2014):* Microfluidic chip electrophoresis Investigation of major milk proteins: study of buffers effects and quantitative approaching. *Analytical Methods.* 6, (6) 1666-1673.
- Creamer, L.K. – Macgibbon, A. K. H. (1996):* Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *International Dairy Journal.* 6, (6) 539-568.
- Creamer, L. K. – Richardson, T. (1984):* Anomalous behaviour of bovine  $\alpha_{s1}$ - and  $\beta$  - caseins on gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate buffer. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 234, (2) 476-486.
- Csapó, J. – Csapóné Kiss, Zs. (2002):* Tej és tejtermékek a táplálkozásban. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Dalgleish, D.G. (1992):* The enzymatic coagulation of milk. In. *Advanced Dairy Chemistry Proteins.* Elsevier Applied Science, Barking, UK.
- De Jong, N. – Visser, S. – Olieman, C. (1993).* Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A.* 652, (1) 207-213.
- de Kruif, C. G. – Holt, C. (2003):* Casein micelle structure, functions and interactions. In *Advanced Dairy Chemistry.* Kluwer Academic Plenum Publishers, New York.
- Di Stasio, L.- Mariani, P. (2000):* The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production. *Zootecnicæ Nutrizione Animale.* 26, (3) 69-90.
- Dolnik, V. – Liu, S. (2005):* Application of capillary electrophoresis on microchip. *Journal of Separation Science.* 28, (15) 1994 - 2009.

*Duarte-Vázquez, M. A. - García-Ugalde, C. R. – Álvarez, B. E. – Villegas, L. M. - García-Almendárez, B. E. – Rosado, J. L. (2017):* Production of Cow's Milk Free from Beta-Casein A1 and Its Application in the Manufacturing of Specialized Foods for Early Infant Nutrition. *Foods*. 6, (7) 1-15.

*Dupont, D. – Croguennec, T. – Pochet, S. (2018):* Milk Proteins - Analytical Methods. Reference Module in Food Sciences. Elsevier, Academic Press.

*Dziuba, J. – Mioduszevska, H. (1997):* Quantitative analysis of milk proteins by SDS-PAGE method. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 6/47, (1) 91-98.

*Dziuba, J. – Darewicz, M. – Minkiewicz, P. – Panfil, T. (2002):* Application of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and reversed-phase-high performance liquid chromatography on-line with the second and fourth derivatives UV spectroscopy in identification of  $\beta$ -casein and its peptide fractions. *Milchwissenschaft*. 57, (9-10) 497-502.

*EFSA (European Food Safety Authority) (2009):* Review of the potential health impact of  $\beta$ -casomorphins and related peptides. *EFSA Scientific Report* 231, 1–107.

*Farrell, Jr. H. M. - Jimenez-Flores, R. – Bleck, G. T.- Brown, E. M. – Butler, J. E. – Creamer, L. K. – Hicks, C. L. Holler, C. M. - Ng-Kwai-Huang, K. – Swaisgood, H. E. – (2004):* Nomenclature of the proteins of cows' milk -sixth revision. *Journal of Dairy Science*. 87, (6) 1641–1673.

*Ferretti, L. – Leone, P. – Sgaramella, V. (1990):* Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Research*. 18, (23) 6829-6833.

*Fox, P.F. – Brodtkorb, A. (2008):* The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*. 18, (7) 677–684.

*Fox, P.F. – McSweeney, P. L. H. (1998):* Dairy chemistry and biochemistry. Blackie Academic & Professional. London.

*Gallinat, J. – Qanbari, L. S. – Drogemuller, C. – Pimentel, E. C. – Thaller, G. – Tetens, J. (2013):* DNA-based identification of novel bovine casein gene variants. *Journal of Dairy Science*. 96, (1) 699–709.

*Gellrich, K. – Meyer, H. H. D.- Wiedemann, S. (2014):* Composition of major proteins in cow milk differing in mean protein concentration during the first 155 day of lactation and the influence of season as well as short- term restricted feeding in early and mid-lactation. *Czech Journal of Animal Science*. 59, (3) 97–106.

- Goetz, H. – Kuschel, M. – Wulff, T. – Sauber, C. – Miller, C. – Fisher, S. – Woodward, C.* (2004): Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 60, (3) 281–293.
- Gomez Ruiz, J. A. – Miralles, B. – Aguera, P. – Amigo, L.* (2004): Quantitative determination of alphas<sub>2</sub>- and alphas<sub>1</sub>-casein in goat's milk with different genotypes by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1054, (1-2) 279-284.
- Greenberg, R. – Groves, M. L. – Dower, H. J.* (1984): Human beta-casein. Amino acid sequence and identification of phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*. 259, (8) 5132–5138.
- Groen, A. F. - van der Vegt, R. - van Boekel, M. A. - de Rouw, O. L. A – Vos, H.* (1994): Case study on individual animal variation in milk protein composition as estimated by highpressure liquid chromatography. *Netherland Milk & Dairy Journal*. 48, 201–212.
- Grosclaude, F. – Mahe, M. F. – Mercier, J. C. - Ribadeau-Dumas, B.* (1972): Characterization of genetic variants of  $\alpha_{S1}$  and bovine caseins. *European Journal of Biochemistry*. 26, (3) 328–337.
- Groves, M. L.* (1969): Some minor components of casein and other phosphoproteins in milk. A review. *Journal of Dairy Science* 52, (8) 1155–1165.
- Guinee, T. P.* (2003): Role of protein in cheese and cheese products. In *Advanced Dairy Chemistry*. Springer, New York, NY.
- Gustavsson, F. – Buitenhuis, A. J. – Johansson, M. – Bertelsen, H. P. – Glantz, M. – Poulsen, N. A. –Lindmark Mansson, H. – Stalhammar, H. – Larsen, L. B. – Bendixen C. Paulsson, M. – Andrén, A.* (2014): Effects of breed and casein genetic variants on protein profile in milk from Swedish Red, Danish Holstein, and Danish Jersey cows. *Journal of Dairy Science*. 97, (6) 3866-3877.
- Gutierrez, J. E. N. – Jakobovits, L.* (2003): Capillary electrophoresis of  $\alpha$ -lactalbumin in milk powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, (11) 3280–3286.
- Hallen, E.- Allmere, T.- Naslund, J.- Andren, A.- Lunden, A.* (2007): Effect of genetic polymorphism of milk proteins on rheology of chymosin-induced milk gels. *International Dairy Journal*. 17, (7) 791-799.
- Hambraeus, L. – Lonnerdal, B.* (2003): Nutritional aspects of milk proteins. *Advanced Dairy Chemistry*. Springer, Boston, MA.

- Hames, B. D. – Rickwood, D. (1998): Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach, Oxford University Press.*
- Hayes, H. –Petit, E. (1993): Mapping of the  $\beta$ -lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M heavy chain-like sequence in homologous cattle, sheep and goat chromosomes. Mammalian Genome. 4, (4) 207–210.*
- Heck, J. M. L. – Olieman, C. – Schennink, A. - van Valenberg, H. J. F. – Visker, M. H. P. W. – Meuldijk, R. C. R. – van Hooijdonk, A. C. M. (2008): Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. International Dairy Journal. 18, (5) 548–555.*
- Heck, J. M. L. – Schennink, A. – van Valenberg, H. J. F. – Bovenhuis, H. – Visker, M. H. P. W. – Arendonk, J. A. M. van Hooijdonk, A. C. M. (2009): Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. 92, (3) 1192-1202.*
- Hinz, K. - O'Connor, P. M. – Huppertz, T. – Ross, R. P.- Kelly, A. L. (2012): Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk. Journal of Dairy Research. 79, (2) 185-191.*
- Holland, B. – Rahimi, Yazdi S. - Ion Titapiccolo, G. – Corredig, M. (2010): Short communication: separation and quantification of caseins and casein macropeptide using ion-exchange chromatography. Journal of Dairy Science. 93, (3) 893-900.*
- Huppertz, T. (2013): Chemistry of the caseins. In Advanced Dairy Chemistry. Springer.*
- Ikonen, T. – Ahlfors, K. – Kempe, R. – Ojala, M.- Ruottinen, O. (1999): Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. Journal of Dairy Science. 82, (1) 205-214.*
- Ikonen, T. – Ojala, M – Syvaioja, E. L. (1997): Effects of composite casein and  $\beta$ -lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model. Agricultural and Food Science Finland. 6, (4) 283-294.*
- Jenness, R. – Larson, B. L. – McMeekin, T. L. – Swanson, A. M. – Whitnah, C. H. – Whitney, R. McL. (1956): Nomenclature of the proteins of bovine milk. Journal of Dairy Science. 39, (5) 536-54.*
- Jensen, H. B. – Holland, J. W. – Poulsen, N. A. – Larsen, L. B. (2012/a): Milk protein genetic variants and isoforms identified in bovine milk representing extremes in coagulation properties. Journal of Dairy Science. 95, (6) 2891-2903.*
- Jensen, H. B. – Poulsen, N. A. – Andersen, K. K. – Hammershoj, M. – Poulsen, H. D – Larsen, L. B. (2012/b): Distinct composition of bovine milk from Jersey and Holstein-*

- Friesian cows with good, poor, or noncoagulation properties as reflected in protein genetic variants and isoforms. *Journal of Dairy Science*. 95, (12) 6905–6917.
- Kaminski, S. – Cieslinska, A. – Kostyra, E.* (2007): Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics*. 48, (3) 189-198.
- Kinghorn, N. M. – Norris, C. S. – Paterson, G. R. – Otter, D. E.* (1995): Comparison of capillary electrophoresis with traditional methods to analyse bovine whey proteins. *Journal of Chromatography A*. 700, (1-2) 111–123.
- Kinsella, J. E. – Morr, C. V.* (1984): Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Food Science and Nutrition*. 21, (3) 197–262.
- Kurien, B. T.- Scofield, R. H.* (2005): Western blotting. *Methods*. 38, 283-293.
- Laemmli, U.K.* (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Lin, S. – Sun, J. – Cao, D. – Cao, J.- Jiang, W.* (2010): Distinction of different heat-treated bovine milks by native-PAGE fingerprinting of their whey proteins. *Food Chemistry*. 121, (3) 803-808.
- Ma, L. – Yang, Y. – Chen, J. – Wang, J. – Bu, D.* (2017): A rapid analytical method of major milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Animal Science Journal*. 88, (10) 1623-1628.
- Mackle, T. R. – Bryant, A. M. – Petch, S. F. – Hill, J. P. – Auldist, M. J.* (1999): Nutritional influences on the composition of milk from cows of different protein phenotypes in New Zealand. *Journal of Dairy Science*. 82, (1) 172–180.
- Martin, P. – Szymanowska, M. – Zwierzchowski, L. – Leroux, C.* (2002): The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reproduction Nutrition Development*. 42, (5) 433–459.
- Marziali, A. S. - Ng-Kwai-Hang, K. F.* (1986): Relationships between milk protein polymorphism and cheese yielding capacity. *Journal of Dairy Science*. 69, (5) 1193-1201.
- McSweeney, P. L. H. – Fox, P. F.* (1997): Chemical methods for the characterization proteolysis in cheese during ripening. *Lait*. 77, (1) 41–76.
- Melachouris, N. P. – Tuckey, S. L.* (1966): Changes of the Proteins in Cheddar Cheese Made from Milk Heated at Different Temperatures. *Journal of Dairy Science*. 49, (7) 800-805.
- Mercier, J. C.* (1981): Phosphorylation of caseins, present evidence for an amino acid triplet code posttranslationally recognized by specific kinases. *Biochimie*. 63, (1) 1-17.

- Nazzaro, F. – Orlando, P. – Fratianni, F. - Di Luccia, A. – Coppola, R.* (2012): Protein analysis-on-chip systems in foodomics. *Nutrients*. 4, (10) 1475–1489.
- Ng-Kwai-Hang, K. F. – Grosclaude, F.* (2003): Genetic Polymorphism of milk proteins. *Advanced Dairy Chemistry*. Springer. US.
- Ng-Kwai-Hang, K. F. – Hayes, J. F. – Moxley, J. E – Monardes, H. G.* (1987): Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *Journal of Dairy Science*. 70, (3) 563–570.
- Ng-Kwai-Hang, K. F. – Hayes, J. F. – Moxley, J. E. – Monardes, H. G.* (1984): Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with fat, and protein production by dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 67, (4) 835-840.
- Ng-Kwai-Hang, K. F.* (2002): Heterogeneity, fractionation and isolation. In *Encyclopaedia of Dairy Sciences*. Academic Press. London.
- O'Farrell, P. H.* (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 250, (10) 4007-4021.
- O'Mahony, J. A. – Fox, P. F. – Kelly, A. L.* (2013): Analysis, Electrophoresis. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press. New York.
- O'Brien, B. – Mehra, R. – Connolly, J. F. – Harrington, D.* (1999): Seasonal variation in the composition of Irish manufacturing and retail milks. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 38, (1) 53-64.
- Ong, S. E. – Pandey, A.* (2001): An evaluation of the use of twodimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomolecular Engineering*. 18, (5) 195-205.
- Ortega, N. – Albillos, S. M. – Busto, M. D.* (2002): Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis. *Food Control*. 14, (5) 307-315.
- Ostensen, S. – Foldaber, J. – Hermansen, J. E.* (1997): Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *Journal of Dairy Research*. 64, (2) 207–219.
- Otte, J. – Zakora, M. – Kristiansen, K. R. – Qvist, K. B.* (1997): Analysis of bovine caseins and primary hydrolysis products in cheese by capillary zone electrophoresis. *Lait*. 77, (2) 241-257.
- Parris, N. – Baginski, M. A.* (1991): A rapid method for the determination of whey protein denaturation. *Journal of Dairy Science*. 74, (91) 58 - 64.



- Patel, H. A. – Singh, H. – Anema, S. G. – Creamer, L. K.* (2006): Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 3409–3420.
- Paulsson, M. – Dejmeek, P.* (1990): Thermal denaturation of whey proteins in mixtures with caseins studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Dairy Science*. 73, (3) 590-600.
- Pesic, M. – Barac, M. – Vrvic, M. – Ristic, N. – Macej, O. – Stanojevic, S.* (2011). Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. *Food Chemistry*. 125, (2) 1443-1449.
- Pisano, A. – Packer, N. H. – Redmond, J. W. – Williams, K. L. – Gooley, A.* (1994): Characterization of O-linked glycosylation motifs in the glycopeptide domain of bovine  $\kappa$  casein. *Glycobiology*. 4, (6) 837-844.
- Poulsen, N. A.- Jensen, H. B. – Larsen, L. B.* (2016): Factors influencing degree of glycosylation and phosphorylation of caseins in individual cow milk samples. *Journal of Dairy Science*. 99. (5) 3325-3333.
- Reico, I. – Molina, E. – Ramos, M. – de Frutos, M.* (1995): Quantitative analysis of major whey proteins by capillary electrophoresis using uncoated capillaries. *Electrophoresis*. 16, (4) 654-658.
- Recio, I. – Oileman, C.* (1996): Determination of denatured serum proteins in the casein fraction of heat-treated milk by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 17, (7) 1228-1233.
- Recio, I. - Pérez-Rodríguez, M. L. – Ramos, M. – Amigo, L.* (1997): Capillary electrophoretic analysis of genetic variants of milk proteins from different species. *Journal of Chromatography A*. 768, (1) 47-56.
- Recio, I. – Ramos, M. - López-Fandino, R.* (2001): Capillary electrophoresis for the analysis of food proteins of animal origin. *Electrophoresis*. 22, (1) 1489-1502.
- Reynolds, J. A. – Tanford, C.* (1970): The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *Journal of Biological Chemistry*. 245, (19) 5161–5165.
- Rijnkels, M.* (2002): Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of the casein gene family. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*. 7, (3) 327-345.
- Schaar, J. – Hansson, B. – Pettersson, H. E.* (1985): Effects of genetic variants of kappa casein and beta lactoglobulin on cheesemaking. *Journal of Dairy Research* 52, (3) 429–438.

- Sharma, N. - Rajan Sharma, R. – Yudhishtir, Y. S. – Mann, B. (2021): Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution. International Dairy Journal. 114, (1) 198-204.*
- Schagger, H. (2006): Tricine - SDS-PAGE. Nature Protocols. 1, (1) 16–22.*
- Shapiro, A. L. – Vinuela, E. – Maizel, J. V. Jr. (1967): Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, Biochemical and Biophysical Research Communications. 28, (5) 815-820.*
- Sheehan, D. (2009): Physical Biochemistry: Principles and Applications. John Wiley & Sons.*
- Singh, H. (1995): Heat induced changes in casein including interactions with whey proteins. In Heat-induced changes in milk. International Dairy Federation, Belgium.*
- Smith, B. J. (1984): SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Humana Press, New York.*
- Smithies, O. (1955): Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochemical Journal. 61, (4) 629–641.*
- Strange, E. D. - van Hekken, D. – Thompson, M. P. (1991): Qualitative and quantitative determination of caseins with reverse phase and anion exchange HPLC. Journal of Food Science 56, (1) 1415–1420.*
- Strickland, M. – Johnson, M. E. – Broadbent, J. R. (2001): Qualitative and quantitative analysis of proteins and peptides in milk products by capillary electrophoresis. Electrophoresis. 22, (8) 1510–1517.*
- Swaigood, H. E. (1982): Chemistry of milk protein. In Fox, P. F. Developments in Dairy Chemistry-1. Elsevier Applied Science, London.*
- Swaigood, H. E. (1992): Chemistry of the caseins. In Advanced dairy chemistry. szerk. Fox, P. F. New York.*
- Threadgill, D. W. – Womack, J. E. (1990): Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. Nucleic Acids Research. 18, (23) 6935-6942.*
- Tran, N. T. – Ayed, I. – Pallandre, A. – Taverna, M. (2010): Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods: An update. Electrophoresis. 31, (1) 147–173.*
- Tremblay, L. – Laporte, M. F. – Lenoil, J.- Dupont, D. – Paquin, P. (2003): Quantitation of proteins in milk and milk products. In Advanced Dairy Chemistry, Proteins, Kluwer Academic Plenum Publishers, New York.*

*Verdi, R. J. – Barbano, D. M. – Dellavalle, M. E. – Senyk, G. F. (1987):* Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen and proteolysis in high and low somatic-cell milks. *Journal of Dairy Science.* 70, (2) 230-242.

*Visser, S.- Slangen, C. J. – Rollema, H. S. (1991):* Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 548, (1-2) 361–370.

*Visser, S. – Slangen, K. J. – Rollema, H. S. (1986):* High performance liquid chromatography of bovine caseins with the application of various stationary phases. *Milchwissenschaft* 41, (9) 559–562.

*Vreeman, H. J. – Visser, S. – Slangen, C. J. - Van Riel, J. A. (1986):* Characterization of bovine kappa-casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography. *The Biocemical Journal.* 240, (1) 87-97.

*Walstra, P. (1999):* Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal.* 9, (3/6) 189-192.

*Walstra, P. – Wouters, J. T. M. – Geurts, T. J. (2006):* *Dairy Science and Technology.* Taylor and Francis Group. Boca Raton.

*Wang, J. – Zhang, Q. H. – Wang, Z. H. – Li, H. M. (2009):* Determination of major bovine milk proteins by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry.* 37, (11) 1667–1670.

*Wedholm, A. – Larsen, L. B. - Lindmark-Mansson, H. – Karlsson, A. H. – Andrén, A. (2006):* Effect of protein composition on the cheesemaking properties of milk from individual dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 89, (9) 3296–3305.

*Westermeier, R. (2011):* Electrophoresis in Gels. In *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*

*Yukalo, V. – Datsyshyn, K. – Storozh, L. (2019):* Electrophoretic system for express analysis of whey protein fractions. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies.* 2, (737) 37–44.

*A szerző levélcíme – Address of the authors:*

Buzás Henrietta

Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft.

9200, Mosonmagyaróvár Lucsony utca 24.

E-mail cím: [hbuzas@mtki.hu](mailto:hbuzas@mtki.hu)

# **SZEMLE**