

DAMIR MOGUT, ANNA IWANIAK, MONIKA HRYNKIEWICZ, JERZY DZIUBA

Katedra Biochemii Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

ELEKTROFOREZA 2D BIAŁEK MLEKA KROWIEGO I MLECZNEGO NAPOJU FERMENTOWANEGO

2D ELECTROPHORESIS OF BOVINE MILK PROTEINS AND MILK FERMENTED DRINK

Streszczenie. Celem badań była analiza proteomu mleka krowiego oraz mlecznego napoju fermentowanego za pomocą elektroforezy 2D. Kryteriami rozdziału białek były wartości ich punktów izoelektrycznych (pI) i masy cząsteczkowe (MW). Badania wykazały obecność 118 oraz 121 spotów odpowiednio w proteomie mleka oraz mlecznego napoju fermentowanego. Oba proteomy zawierały 95 identycznych spotów. Występowanie spotów nieidentycznych wskazywało na zmiany będące wynikiem aktywności proteinaz bakteryjnych działających na białka mleka podczas procesu produkcji napoju fermentowanego. Proteolityczne kultury starterowe zastosowane do produkcji mlecznego napoju fermentowanego powodowały częściową hydrolizę białek do peptydów i wolnych reszt aminokwasowych. Uzyskane wyniki pozwalają potwierdzać przydatność elektroforezy 2D do obserwacji zmian w proteomach produktów mleczarskich oraz żywności po zastosowaniu procesów technologicznych. Rozwój metod analizy proteomicznej w zakresie doskonalenia narzędzi bioinformatycznych pozwoli w przyszłości na eliminację artefaktów oraz ograniczyć możliwość popełniania ewentualnych błędów w identyfikacji białek.

Słowa kluczowe: mleko, mleczny napój fermentowany, białka, proteomika, proteom, elektroforeza 2D

Wstęp

Osiągnięcia ostatnich lat w zakresie genomiki dały podstawy nowemu obszarowi badań – proteomice (Wilkins i in., 1996). Jest to dział wiedzy uzupełniający genomikę, zajmujący się wykrywaniem i charakterystyką białek oraz ich wzajemnych oddziaływań, kodowanych w obrębie genomu danego organizmu. Zestaw i/lub skład białek zidentyfikowany w obrębie danego organizmu, jego tkanki, komórki lub płynu ustrojowego

wego jest określany mianem proteomu (Lewandowicz i in., 2009). Według Lewandowicza i in. (2009) analiza proteomiczna znajduje zastosowanie w diagnostyce medycznej, ale wykorzystanie narzędzi proteomicznych nie byłoby w pełni możliwe, gdyby nie ciągły rozwój bioinformatyki – nauki pozwalającej na analizę dużej ilości danych o skomplikowanej strukturze. Poza medycyną po analizę proteomiczną coraz częściej sięgają naukowcy zajmujący się m.in. badaniem żywności (Bouwman i in., 2011).

Do powszechnie stosowanych metod analizy proteomu należy elektroforeza dwuwymiarowa (elektroforeza 2D). Metoda ta pozwala na rozdział nawet do kilkunastu tysięcy białek jednocześnie. Ponadto elektroforeza 2D umożliwia wykrywanie białek w szerokim zakresie stężeń oraz pozwala na śledzenie między nimi różnic w obrębie badanych proteomów (Kossowska i in., 2009).

Mleko to pierwszy i podstawowy pokarm ludzi oraz zwierząt. Jest ono bogatym źródłem m.in. łatwo przyswajalnego białka, na które składa się kazeina, białka serwatkowe (α -laktoalbumina, β -laktoglobulina, immunoglobuliny) oraz inne niskocząsteczkowe białka i enzymy (Szwajkowska i in., 2011). Białka mleka są źródłem peptydów o różnych aktywnościach biologicznych (Nagpal i in., 2011).

Proces otrzymywania mlecznych napojów fermentowanych przyczynia się do zmian właściwości mleka. Są to m.in.: częściowy rozkład laktozy, a także: uwolnienie kwasów tłuszczowych, wzrost przyswajalności wapnia i innych pierwiastków oraz zwiększenie strawności białka poprzez wzrost liczby wolnych reszt aminokwasowych (Mojka, 2013).

Procesy technologiczne stosowane w produkcji produktów mleczarskich mogą wywierać wpływ na zawarte w nich białka. Wynika to z obecności w systemach proteolitycznych kultur bakteryjnych różnego rodzaju proteinaz stosowanych w procesach otrzymywania mlecznych napojów fermentowanych. W wyniku działania zewnątrzkomórkowych proteinaz oraz wewnątrzkomórkowych peptydaz zachodzą m.in. hydrolytyczne przemiany białek (Hayes i in., 2007). Postawiono zatem hipotezę o wpływie wymienionych przemian białek mleka na obraz mapy proteomicznej mlecznych napojów fermentowanych. W związku z tym podjęto pracę, której celem była analiza proteomiczna mleka oraz mlecznego napoju fermentowanego za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej oraz ustalenie, czy zastosowane warunki produkcji mlecznego napoju fermentowanego przyczyniały się do zmian w obrazie obu proteomów.

Material i metody

Mleko i mleczny napój fermentowany

Świeże mleko pobrano od indywidualnego dostawcy z rejonu Olsztyna, a następnie odtłuszczono poprzez odwirowanie z prędkością 3000·g w czasie 15 min. Z odtłuszczonego mleka pochodzącego z tej samej partii wyprodukowano mleczny napój fermentowany według metody Paszczyk i in. (2014) z następującymi modyfikacjami własnymi: 1) do produkcji napoju fermentowanego zastosowano szczepionkę YO-MIX firmy Danisco zawierającą kultury bakterii fermentacji mlekowej *Streptococcus thermophilus* oraz *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; 2) nie dodawano proszku mlecznego.

Mleko oraz napój fermentowany przeznaczony do analizy proteomicznej poddawano homogenizacji ciśnieniowej (mleko: homogenizacja dwustopniowa, 18/5 MPa, napój

fermentowany: 70 MPa) (Paszczyk i in., 2014; Zander i in., 2011). Do wykonania elektroforezy 2D pobierano próbki mleka oraz mlecznego napoju fermentowanego o objętości 10 μ l.

Odczynniki

Odczynniki niezbędne do wykonania elektroforezy 2D zakupiono w firmie Polskie Odczynniki Chemiczne (POCH, Gliwice). Barwnik Roti®-Blue zakupiono w firmie Roth (Karlsruhe, Niemcy), a pozostałe reagenty o wysokim stopniu czystości – w Sigma-Aldrich®.

Elektroforeza dwukierunkowa białek mleka i mlecznego napoju fermentowanego

Do 10-mikrolitrowych próbek mleka oraz mlecznego napoju fermentowanego dodawano 500 μ l buforu rehydratacyjnego (8 M UREA, 4% CHAPS (w/v), 40 mM Tris i 100 mM DTT, 1 μ l błękitu bromofenolowego). Próbki naniesiono na paski żelowe IPG (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) o długości 24 cm i gradiencie pH 4,0–7,0. Całość zalewano olejem mineralnym (ok. 1 cm^3). Izoelektryczne ogniskowanie (IEF) wykonano za pomocą aparatury Ettan™ IPGphor™ (GE Healthcare, Uppsala, Szwecja), w następujących warunkach: 1 h – 100 V, 1 h – 500 V, 1 h – 1000 V, 0,5 h – gradient napięcia do 8000 V, 1 h – 8000 V. Napięcie zwiększano do łącznej wartości 63 000 V/h, a następnie do 65 000 V/h, co kontynuowano przez 11 h. Proces rozdziału trwał łącznie 23,20 h.

Paski uzyskane po IEF równoważono, dodając 7 cm^3 buforu ekwilibracyjnego (skład: 6 M UREA, 75 mM Tris-HCl, 29,3% glicerolu (v/v), 2% SDS (w/v), 0,002% błękitu bromofenolowego (w/v) z dodatkiem DTT) przez 15 min. Następnie bufor usuwano, a całą procedurę powtarzano, stosując bufor ekwilibracyjny z dodatkiem jodoocyanu (IAA). Po zrównoważeniu paski opłukiwano buforem elektrodowym, a następnie umieszczano na powierzchni żelu poliakrylamidowego o stężeniu 12,5% (w/v). Do aparatu Ettan Dalt Six (GE Healthcare) wprowadzano bufor elektrodowy (192 mM glicyny, 0,1% SDS (w/v), 25 mM preparatu Trizma BASE, woda dejonizowana). Rozdział białek wzorców masowych na podstawie ich mas cząsteczkowych przeprowadzono w następujących warunkach: 2 h przy napięciach na żel 5 oraz 15 mA aż do uzyskania pełnego rozdziału. Rozdział prowadzono łącznie przez 22 h w przypadku mleka oraz 19 h w przypadku napoju fermentowanego. Analizę wykonano w trzech powtórzeniach (Görg i in., 2004). Uzyskane żele zanurzano w roztworze będącym mieszaniną kwasu ortofosforowego (8,5%, v/v) oraz metanolu (20%, v/v), a następnie barwiono (barwnikiem Roti®-Blue o stężeniu 20%, v/v oraz metanolem o stężeniu 60%, v/v). Po upływie 15 h żele płukano trzykrotnie w roztworze metanolu o stężeniu 25% (v/v) (Görg i in. 2004).

Analiza komputerowa

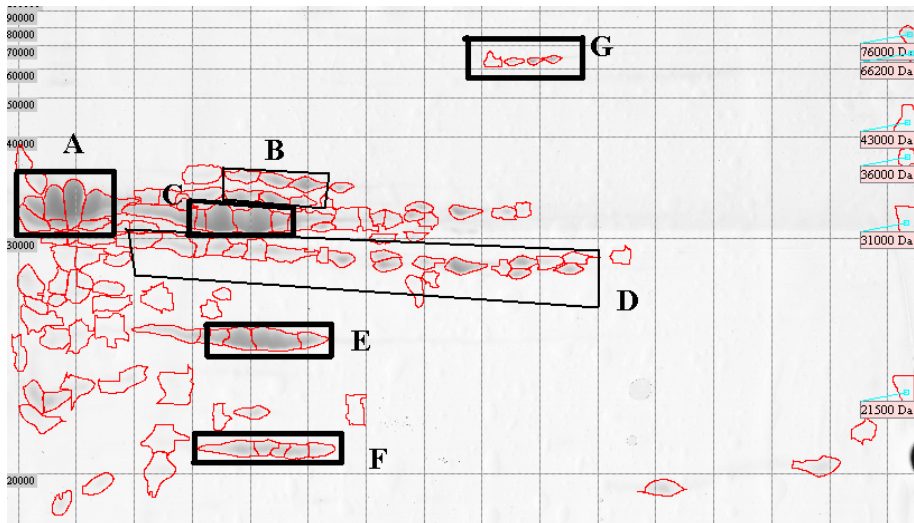
Odbarwione żele skanowano za pomocą skanera Image Scanner 3 (GE Healthcare). Obrazy zapisano w rozdzielczości 300 dpi. Analizę obrazu prowadzono za pomocą programu komputerowego Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare). Punkty izoelektryczne (pI) oraz masy cząsteczkowe (MW) obliczono dla wszystkich spotów. Wartości MW oraz pI wyrażono jako wartość średnią z trzech powtórzeń.

Wyniki i dyskusja

Spośród składników odżywczych mleka białka należą do najważniejszych z punktu widzenia właściwości biologicznych (D'Alessandro i Zolla, 2012). Mleko krowie zawiera ich średnio 32 g/l, z czego frakcje kazeinowe stanowią ogółem około 80%, białka serwatkowe – około 16%, peptony i peptydy o niewielkiej masie cząsteczkowej – około 3% oraz białka otoczek kuleczek tłuszczowych – około 1% (D'Alessandro i Zolla, 2012). Kazeina jest głównym białkiem mleka, charakteryzującym się dużą wartością technologiczną związaną z szybkością powstawania i zwięzłością skrzepu (Król i in., 2011). Kazeina mleka nie jest tworem jednorodnym, w jej obrębie występuje wiele subfrakcji, z czego najważniejsze to formy: α_{s1} -, α_{s2} -, β - oraz κ -kazeina (Caroli i in., 2009). Białka serwatkowe, tj. β -laktoglobulina, α -laktoalbumina czy laktoferyna, charakteryzują się potencjałem prozdrowotnym, a ich działanie prewencyjne w zapobieganiu współczesnym chorobom cywilizacyjnym jest wieloaspektowe. Rola immunoglobulin polega na implikowaniu humoralnej odpowiedzi organizmu (Król i in., 2011).

Opublikowane dotychczas prace na temat proteomiki białek mleka dotyczyły głównie aspektów medycznych (D'Alessandro i Zolla, 2012), np. zastosowano ją do porównania białek serwatkowych mleka krów zdrowych i chorych na mastitis oraz do charakterystyki białek mleka różnych gatunków ssaków w celu poznania mechanizmów mających wpływ na alergenicność mleka krowiego (D'Alessandro i Zolla, 2012).

Elektroforeza dwukierunkowa (2D) należy do przydatnych metod proteomicznych służących do analizowania dużej liczby biomakrocząsteczek w relatywnie krótkim czasie. Podstawą tej metody jest rozdział oraz identyfikacja białek na podstawie ich punktu izoelektrycznego oraz masy cząsteczkowej (Manso i in., 2005). Na rysunku 1 przedsta-



Rys. 1. Proteom mleka: A – α_{s1} -kazeina, B – α_{s2} -kazeina, C – β -kazeina, D – κ -kazeina, E – β -laktoglobulina, F – α -laktoalbumina, G – immunoglobuliny
 Fig. 1. Milk proteome: A – α_{s1} -casein, B – α_{s2} -casein, C – β -casein, D – κ -casein, E – β -lactoglobulin, F – α -lactalbumin, G – immunoglobulins

wiono elektroforegram 2D obrazujący proteom mleka. Przedstawia on łącznie 118 spotów o różnych masach cząsteczkowych (MW) oraz punktach izoelektrycznych (pI). Największe skupiska spotów białkowych znajdują się w rejonach zaznaczonych symbolami A-G. Obszary te reprezentują główne białka mleka (Yang i in., 2014). W obszarze A zidentyfikowano 8 spotów charakteryzujących się pI w zakresie 4,0–4,3 oraz MW w zakresie 30–33 kDa. Szczegółowe dane na temat zakresów punktów izoelektrycznych oraz mas cząsteczkowych białek znajdujących się w poszczególnych obszarach zestawiono w tabeli 1. Zakresy MW oraz pI wskazują, że spoty znajdujące się w obszarze A odpowiadają α_{S1} -kazeinie (O'Donnell i in., 2004). Obszar B zawierał 6 spotów (tab. 1). Ich MW oraz pI odpowiadały α_{S2} -kazeinie, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Galvani i in., 2000). β -Kazeinę zidentyfikowano w obszarze C, w którym oznaczono 4 spoty (tab. 1). Skupisko spotów najbardziej zróżnicowanych pod względem pI (4,4–6,0) znajdowało się w obszarze D. Zidentyfikowano w nim 21 spotów (tab. 1). Według Hollanda i in. (2004) są to spoty odpowiadające różnym genotypom κ -kazeiny. Białka serwatkowe, tj. β -laktoglobulinę oraz α -laktoalbuminę, zidentyfikowano odpowiednio w rejonach E i F, w których znajdowało się po 5 spotów. Immunoglobuliny (4 spoty) występowały w obszarze G (tab. 1). Spoty występujące w obszarach A-G zajmowały około 72% łącznej objętości spotów proteomu mleka, w tym frakcje kazeinowe – ponad 56% (tab. 1, kolumna 5).

Tabela 1. Zakresy punktów izoelektrycznych (pI) oraz mas cząsteczkowych (MW) białek zidentyfikowanych w proteomie mleka

Table 1. Ranges of isoelectric points (pI) and molecular weights (MW) of proteins identified in milk proteome

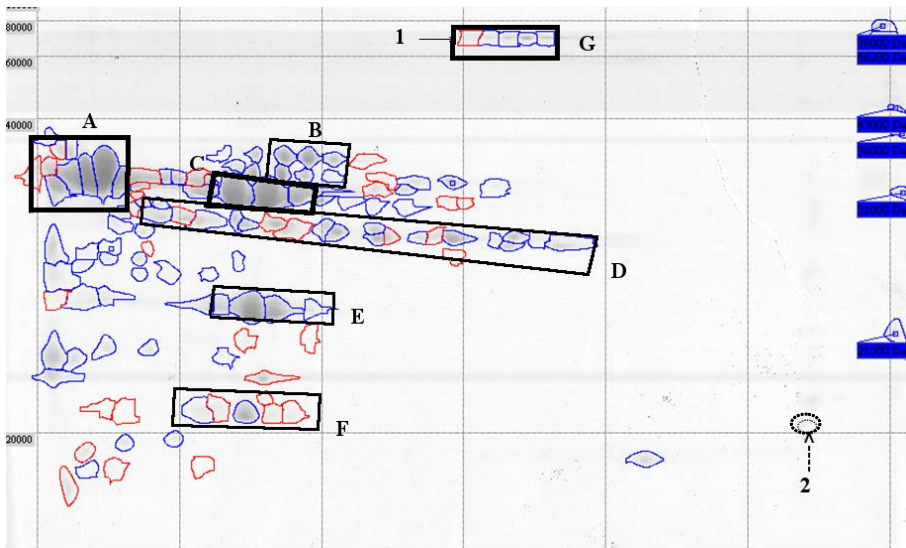
Obszar Area	Liczba spotów Number of spots	Zakres pI Range of pI	Zakres MW Range of MW (Da)	% Vol* % Vol*	Białko Protein
A	8	4,04–4,26	30 147–32 681	22,763	α_{S1} -Kazeina α_{S1} -Casein
B	6	4,77–4,99	32 495–34 454	5,382	α_{S2} -Kazeina α_{S2} -Casein
C	4	4,63–4,90	30 906–31 119	15,866	β -Kazeina β -Casein
D	21	4,42–5,92	26 864–29 837	12,201	κ -Kazeina κ -Casein
E	5	4,64–5,00	23 996–24 260	10,895	β -Laktoglobulina β -Lactoglobulin
F	5	4,77–5,02	20 372–20 423	3,846	α -Laktoalbumina α -Lactalbumin
G	4	5,64–5,85	62 724–63 714	0,799	Immunoglobuliny Immunoglobulins

*% Vol – procent objętości zajmowanej przez dane białko względem całego proteomu.

*% Vol – percentage of the volume occupied by given protein in a whole proteome.

Rysunek 2 przedstawia proteom mlecznego napoju fermentowanego. Główne frakcje kazeiny i białek serwatkowych znajdują się w analogicznych do proteomu mleka obszarach. Zidentyfikowano ogółem 121 spotów, z czego 95, tj. około 79%, było identycznych ze spotami zidentyfikowanymi w proteomie mleka. Spoty identyczne oznaczono na niebiesko, a na czerwono zaznaczono takie, których nie można było jednoznacznie dopasować. Zakresy MW oraz pI obliczone dla białek zidentyfikowanych w proteomie mlecznego napoju fermentowanego (tj. identycznych spotów w obu proteomach) pokrywały się z danymi zawartymi w tabeli 1 (dane niezamieszczone). Znaczne podobieństwo obu proteomów można wyjaśnić tym, że fermentowane napoje mleczarskie należą do produktów, w których obecne są te same frakcje białek co w mleku, a ich zawartość i liczba może być taka sama lub różnić się zależnie od postępowania technologicznego. W rezultacie mogą być one bardziej strawne pod wpływem zachodzącej fermentacji mlekowej a tym samym lepiej przyswajalne dla organizmu (Dąbrowska i in., 2014).

Na rysunku 2 zaznaczono również dwa przykłady (1 i 2), które mogą wskazywać na nieprecyzyjność działania programu identyfikującego spoty. Pierwszy (1) wskazuje na obecność „dodatkowej” frakcji białkowej w proteomie mlecznego napoju fermento-



Rys. 2. Proteom mlecznego napoju fermentowanego: A – α_{S1} -kazeina, B – α_{S2} -kazeina, C – β -kazeina, D – κ -kazeina, E – β -laktoglobulina, F – α -laktoalbumina, G – immunoglobuliny. Spoty niebieskie – identyczne z proteomem mleka, spoty czerwone – różniące się od proteomu mleka. 1 i 2 – inne zaobserwowane różnice w stosunku do proteomu mleka (potencjalne artefakty): 1 – obecność dodatkowego spotu, 2 – brakujący spot, który wykryto w proteomie mleka

Fig. 2. Proteome of milk fermented drink: A – α_{S1} -casein, B – α_{S2} -casein, C – β -casein, D – κ -casein, E – β -lactoglobulin, F – α -lactalbumin, G – immunoglobulins. Blue spots – identical with the milk proteome, red spots – different than those in milk proteome. 1 and 2 – other observed differences between milk and milk fermented drink (potential artefacts): 1 – presence of additional spot, 2 – missing spot which was detected in milk proteome

wanego. W drugim przypadku (2) wykazano brak jednego spotu, który występował w proteomie mleka. Zjawisko to można wyjaśnić istnieniem artefaktów, wynikającym m.in. z migrowania białek na żelu 2D i osiągnięcia „dowolnej” lokalizacji na elektroforegramie. Spoty białkowe mogą się również nakładać na siebie, co może mieć wpływ na dokładność rozdzielania elektroforetycznego oraz interpretację wyników (Campostrini i in., 2005). Hunsucker i Duncan (2006) podkreślają, że chociaż metody detekcji białek wymagają udoskonaleń, to elektroforeza 2D jest wciąż najlepszym narzędziem analizy proteomicznej, a jej zastosowanie pozwoliło na uzyskanie wielu cennych informacji na temat ludzkiego proteomu.

Podsumowując wyniki analizy proteomicznej, można stwierdzić istnienie niewielkich różnic w obu proteomach. Na przykład proteom mlecznego napoju fermentowanego zawierał 3 spoty więcej niż proteom mleka. Były to spoty słabo widoczne, które można uznać za artefakty, co omówiono wyżej. Z kolei niedopasowanie 26 spotów świadczy o zmianach, jakie zaszły podczas produkcji mlecznego napoju fermentowanego, co wpłynęło na różnice w obrazie 2D obu proteomów. Proteoliza zachodząca podczas produkcji napojów fermentowanych nie jest tak dalece posunięta, jak np. podczas procesu produkcji serów dojrzewających. Wpływ na to może mieć stosunkowo małe stężenie wydzielanej proteazy bakteryjnej oraz krótsza hydroliza białek podczas fermentacji mleka w porównaniu z czasem trwania hydrolizy białek podczas dojrzewania serów. Ponadto aktywność proteolityczna enzymów pochodzenia bakteryjnego jest zróżnicowana w zależności od zastosowanego szczepu (Wróblewska i Jędrzychowski, 2003). Obserwacje Shihaty i Shaha (2000) wykazały, że zależnie od genotypu tych samych drobnoustrojów zmienia się zdolność proteolityczna produkowanych przez nie enzymów.

Wnioski

Analizowane produkty żywnościowe, tj. mleko i mleczny napój fermentowany, charakteryzowały się znacznym podobieństwem w obrazach obu proteomów, o czym świadczy identyczność 95 na 118 i 121 spotów zidentyfikowanych odpowiednio w proteomie mleka i napoju fermentowanego. Różnice obserwowane w obu proteomach wynikały z aktywności proteolitycznej kultur bakteryjnych powodujących częściową hydrolizę białek mleka. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że elektroforeza dwukierunkowa jest przydatnym narzędziem obserwowania zmian w obrębie proteomów produktów żywnościowych. Dynamicznie rozwijające się metody bioinformatyczne wspomagają badania proteomiczne, co pozwala na analizę wyników w stosunkowo krótkim czasie.

Podziękowania

Autorzy dziękują prof. dr hab. Małgorzacie Darewicz za merytoryczną pomoc w dyskusji wyników.

Literatura

- Bouwman, F. G., de Ross, B., Rubio-Aliaga, I., Crosley, L. K., Duthie, S. J., Mayer, C., Horgan, G., Polley, A. C., Heim, C., Coort, S. L. M., Evelo, C. T., Mulholland, F., Johnson, I. T., Elliot, R. M., Daniel, H., Mariman, E. C. M. (2011). 2D-electrophoresis and multiplex immunoassay proteomic analysis of different body fluids and cellular components reveal known and novel markers for extended fasting. *BMC Med. Genomics*, 4, 24, 1–12.
- Camprostrini, N., Areces, L. B., Rappsilber, J., Pietrogrande, M. C., Dondi, F., Pastorino, F., Ponzoni, M., Righetti, P. G. (2005). Spot overlapping in two-dimensional gel maps: a serious problem ignored for much too long. *Proteomics*, 5, 9, 2385–2395.
- Caroli, A. M., Chessa, S., Erhardt, G. J. (2009). Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect of animal breeding and human nutrition. *J. Dairy Sci.*, 92, 11, 5335–5352.
- D'Alessandro, A., Zolla, L. (2012). We are what we eat. Food safety and proteomics. *J. Proteome Res.*, 11, 26–36.
- Dąbrowska, A. Z., Baranowska, M., Batyk, I., Kujawski, M., Hryniewska, M., Roszkowska, B. (2014). Spożycie mlecznych napojów fermentowanych przez osoby z różną tolerancją laktozy. *J. Health Sci.*, 4, 10, 107–112.
- Galvani, M., Hamdan, M., Righetti, P. G. (2000). Two-dimensional gel electrophoresis/matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of a milk powder. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14, 20, 1889–1897.
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M. J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4, 12, 3665–3685.
- Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2007). Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview. *Biotechnol. J.*, 2, 4, 426–434.
- Holland, J. W., Deeth, H. C., Alewood, P. F. (2004). Proteomic analysis of kappa-casein microheterogeneity. *Proteomics*, 4, 3, 743–752.
- Hunsucker, S. W., Duncan, M. W. (2006). Is protein overlap in two-dimensional gel a serious practical problem? *Proteomics*, 6, 5, 1374–1375.
- Kossowska, B., Dudka, I., Gancarz, R., Antonowicz-Juchniewicz, J. (2009). Analiza proteomiczna profili białkowych w niektórych zmianach patofizjologicznych ludzkiego organizmu. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 63, 549–563.
- Król, J., Brodziak, A., Litwińczuk, A. (2011). Podstawowy skład chemiczny i zawartość białek serwatkowych w mleku krów różnych ras i serwatce podpuszczkowej. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 77, 4, 74–83.
- Lewandowicz, A., Bakun, M., Imiela, J., Dadlez, M. (2009). Proteomika w uronefropologii – nowe perspektywy diagnostyki nieinwazyjnej. *Nefrol. Dial. Pol.*, 13, 1, 15–21.
- Manso, M. A., Léonil, J., Jan, G., Gagnaire, V. (2005). Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. *Int. Dairy J.*, 15, 6–9, 845–855.
- Mojka, K. (2013). Charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych. *Post. Hig. Epidemiol.*, 94, 4, 722–729.
- Nagpal, R., Behare, P., Rana, R., Kumar, A., Kumar, M., Arora, S., Morotta, F., Jain, S., Yadav, H. (2011). Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food Funct.*, 2, 1, 18–27.
- O'Donnell, R., Holland, J. W., Deeth, H. C., Alewood, P. (2004). Milk proteomics. *Int. Dairy J.*, 14, 12, 1013–1023.
- Paszczyk, B., Czerniewicz, M., Brandt, W. (2014). Skład kwasów tłuszczowych ze szczególnym uwzględnieniem zawartości kwasu *cis9trans11* C18:2 (CLA) oraz izomerów *trans* kwasu C18:1 i C18:2 w mleku oraz wyprodukowanych z niego kefirach i jogurtach. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 92, 1, 41–51.
- Shihata, A., Shah, N. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, 10, 5–6, 401–408.

Mogut, D., Iwaniak, A., Hryniewicz, M., [Dziuba, J.](#) (2015). Elektroforeza 2D białek mleka krowiego i mlecznego napoju fermentowanego. *Nauka Przyr. Technol.*, 9, 3, #42. DOI: 10.17306/J.NPT.2015.3.42

- 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, 4, 269–280.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 13, 19–50.
- Wróblewska, B., Jędrychowski, L. (2003). Wpływ modyfikacji technologicznych na zmianę właściwości immunoreaktywnych białek mleka krowiego. *Alerg. Astma Immunol.*, 8, 4, 157–164.
- Yang, Y., Zheng, N., Yang, J., Bu, D., Wang, J., Ma, L., Sun, P. (2014). Animal species milk identification by comparison of two-dimensional gel map profile and mass spectrometry approach. *Int. Dairy J.*, 35, 1, 15–20.
- Zander, L., Haponiuk, E., Zander, Z., Probola, G. (2011). Wpływ obróbki mechanicznej na stabilność reologiczną skrzepu jogurtowego. *Inż. Apar. Chem.*, 50, 2, 17–18.

2D ELECTROPHORESIS OF BOVINE MILK PROTEINS AND MILK FERMENTED DRINK

Summary. The aim of the study was the analysis of milk and milk fermented drink proteomes with the use of 2D electrophoresis. The criteria of proteins separation were the values of their isoelectric points (pI) and molecular weights (MW). Our results showed that milk and milk fermented drink proteomes consisted of 118 and 121 spots, respectively. The computer analysis revealed the identity of 95 spots in both proteomes. Non-identical spots indicated the changes resulting from the action of bacterial proteinases on milk proteins during the production of milk fermented drink. Proteolytic starter cultures applied to produce the milk fermented drink led to a partial hydrolysis of milk proteins to peptides and free amino acid residues. Results obtained led to confirm the suitability of 2D electrophoresis to observe the changes in the proteomes of milk products, as well as other food products after the application of technological processes. The development of the methods of proteomic analysis will let, in the future, eliminate the artefacts, which may limit the possibility of errors during proteins' identification.

Key words: milk, milk fermented drink, proteins, proteomics, proteome, 2D electrophoresis

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Damir Mogut, Katedra Biochemii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, pl. Cieszyński 1, 10-719 Olsztyn, Poland, e-mail: damir.mogut@uwm.edu.pl

Zaakceptowano do opublikowania – Accepted for publication:

25.03.2015

Do cytowania – For citation:

*Mogut, D., Iwaniak, A., Hryniewicz, M., [Dziuba, J.](#) (2015). Elektroforeza 2D białek mleka krowiego i mlecznego napoju fermentowanego. *Nauka Przyr. Technol.*, 9, 3, #42. DOI: 10.17306/J.NPT.2015.3.42*