

**KAPILARNE OGNISKOWANIE
IZOELEKTRYCZNE W ANALIZIE
BIAŁEK MLEKA**

CAPILLARY ISOELECTRIC FOCUSING
IN THE ANALYSIS OF MILK PROTEIN

**Daria Janiszewska¹, Paweł Pomastowski²,
Małgorzata Szultka-Młyńska^{1,*},
Bogusław Buszewski^{1,2}**

¹*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydział Chemii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika,
ul. Jurija Gagarina 7, 87-100 Toruń*

²*Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Wilenska 4, 87-100 Toruń*

**e-mail: mszultka@umk.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Mleko – charakterystyka proteomiczna

2. Teoria biokolooidów

3. Białkowe składniki mleka

4. Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne jako metoda rozdzielania białek mleka

4.1. Zastosowanie CE i CIEF w analizach proteomicznych mleka


Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane


Mgr Daria Janiszewska w 2019 roku ukończyła studia drugiego stopnia na kierunku Biotechnologia na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, a w 2020 na kierunku Chemia Kryminalistyczna na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie jest doktorantką Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych na tym samym wydziale, wiążąc pracę naukową z Katedrą Chemii Środowiska i Bioanalitiky pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Szultka-Młyńskiej. Główne zainteresowania badawcze skupiają się wokół identyfikacji mikrobiologicznej z zastosowaniem technik „-omicznych” oraz poznaniem i interpretacją mechanizmów związanych z działaniem i metabolizmem antybiotyków.



 <https://orcid.org/0000-0002-5252-6886>


Dr hab. Małgorzata Szultka-Młyńska, prof. UMK jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu uzyskując kolejno tytuł zawodowy magistra w 2010 roku oraz doktora nauk chemicznych w 2014, a doktora habilitowanego w 2019 roku. Jej zainteresowania badawcze koncentrują się wokół metod przygotowania próbek, technik chromatograficznych, spektrometrii mas, jak również oznaczania i identyfikacji związków biologicznie aktywnych w materiale biologicznym. Jest współautorką ok. 75 publikacji naukowych, 1 patentu i 3 zgłoszeń patentowych oraz wielu prezentacji konferencyjnych. Kierowała projektami naukowymi finansowanymi przez MNiSW oraz NCN. Za działalność naukową była kilkakrotnie wyróżniana nagrodami, m.in. KChA PAN, FNP, MNiSW, JM Rektora UMK.



 <https://orcid.org/0000-0002-4499-0128>


Dr hab. Paweł Pomastowski w roku 2012 ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W roku 2016 uzyskał stopień doktora nauk chemicznych, a w 2019 stopień doktora habilitowanego na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Obecnie jest zatrudniony na stanowisku adiunkta w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu. Jest współautorem 95 artykułów naukowych, oraz 5 zgłoszeń patentowych oraz wdrożeń w przemyśle mleczarskim. Jest laureatem nagród m.in. KChA PAN, stypendystą FNP oraz MNiSW. Główne zainteresowania naukowe skupiają się wokół syntezy metalokompleksów, fizykochemii powierzchni, biokoloidach, identyfikacji mikroorganizmów, technikach elektromigracyjnych, proteomice, spektrometrii mas w szczególności: MALDI/NALDI MS.



 <https://orcid.org/0000-0002-1594-0623>

Prof. dr hab. Bogusław Buszewski absolwent Chemii UMCS w Lublinie. W 1986 doktorat Słowacki Uniwersytet Techniczny w Bratysławie. W 1992 habilitacja, a w 1999 tytuł profesora chemii. Stypendysta Fundacji AvH. Autorem 15 książek, 62 patentów i ponad 660 artykułów naukowych. Prezes CEGSS, przewodniczącym KChA PAN, członek PAN i EASA. Laureat licznych nagród i wyróżnień w kraju i zagranicą, promotor 46 doktorantów, z których 21 uzyskało stopień doktora habilitowanego. Od 2013 r. pełnomocnik Marszałka Woj. Kujawsko-Pomorskiego ds. rozwoju nauki, badań i wdrożeń oraz innowacyjności. Główne zainteresowania naukowe: bioanalitika, -omika (metabolomika, proteomika, lipidomika itp.), techniki separacyjne (chromatografia i techniki pokrewne, adsorpcja, przygotowanie próbek), spektroskopia i spektrometria, chemometria.



 <https://orcid.org/0000-0002-5482-7500>

ABSTRACT

The analysis of milk and dairy products is essential during production, quality control, and understanding the factors that cause food allergies. Milk is one of many examples of biocolloids. Numerous studies show that capillary electrophoresis and capillary isoelectric focusing is an excellent tool for this type of analysis. In addition, the coupling of these techniques with other analytical methods such as MALDI-TOF MS or ESI-MS enables the improvement of the quality of analyzes, allows the separation of proteins close to the isoelectric point values. This short overview summarizes the possibilities of using electromigration techniques in the proteomic and microbiological analysis of milk and milk products.

Keywords: biocolloids, capillary electrophoresis, isoelectric capillary focusing, milk proteins

Słowa kluczowe: biokolojdy, elektroforeza kapilarna, izoelektryczne ogniskowanie kapilarne, białka mleka

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

α -LA	– α -laktoalbumina
β -LG	– β -laktoglobulina
ζ	– Potencjał zeta
CA	– Elektroforeza kapilarna (ang. <i>Capillary Electrophoresis</i>)
CIEF	– Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (ang. <i>Capillary Isoelectric Focusing</i>)
ESI-MS	– Spektrometria mas z jonizacją przez elektrorozpylanie (ang. <i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>)
LAB	– Bakterie mlekowe (ang. <i>Lactic Acid Bacteria</i>)
MALDI-TOFMS	– Spektrometryczna metoda laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (ang. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-Flight Analyzer Mass Spectrometry</i>)
pI	– Punkt izoelektryczny (ang. <i>Isoelectric Point</i>)

WPROWADZENIE

Mleko będące surowcem w przetwórstwie mleczarskim musi charakteryzować się odpowiednią jakością mikrobiologiczną jak i cytologiczną. Mleko zawiera ponad 100 różnych białek. Większość z nich dzieli się na trzy frakcje azotowe: kazeiny, które są najliczniejsze (78%), białka serwatkowe (17 %) oraz frakcje azotu niebiałkowego (5%). Białka mleka obejmują również białka błonowe globulek tłuszczu mleka, tj. ponad 120 białek stanowiących 1–2% wszystkich białek mleka [1] oraz ponad 70 enzymów i hormonów [2]. Ponadto, kazeiny i białka serwatki są obecne jako co najmniej 50 zidentyfikowanych wariantów genetycznych, spośród których 12 jest oznaczanych w procedurach analitycznych [3,4]. Mleko zawierając wiele istotnych dla rozwoju substancji stanowi podstawę życia młodych ssaków. Z drugiej jednak strony, białka mleka stanowią przyczynę dużego odsetku alergii pokarmowych.

Dzięki ogromnemu postępowi w nauce badania proteomiczne uległy renesansowi. Wzrost zainteresowania tą dziedziną nauki spowodowany jest głównie ulepszeniem oraz wzrostem czułości stosowanych metod analitycznych. Spośród dostępnych metod frakcjonowania białek, największą zdolności rozdzielania wykazuje ogniskowanie izoelektryczne wykorzystujące różnice w wartościach punktów izoelektrycznych (pI) białek. Może być ono stosowane w trybie analitycznym lub preparatywnym rozdzielania białek na podstawie ich specyficznych punktów izoelektrycznych. Technika ta znajduje również zastosowanie w wielowymiarowej separacji, ponieważ jest kompatybilna z wieloma innymi sposobami rozdzielania, w szczególności chromatografią żelową czy elektroforezą żelową [5].

Niniejszy artykuł przedstawia wykorzystanie elektroforezy kapilarnej i jednego z jej rodzajów - kapilarnego ogniskowania izoelektrycznego - w analizie mleka oraz produktów mlecznych.

1. MLEKO – CHARAKTERYSTYKA PROTEOMICZNA

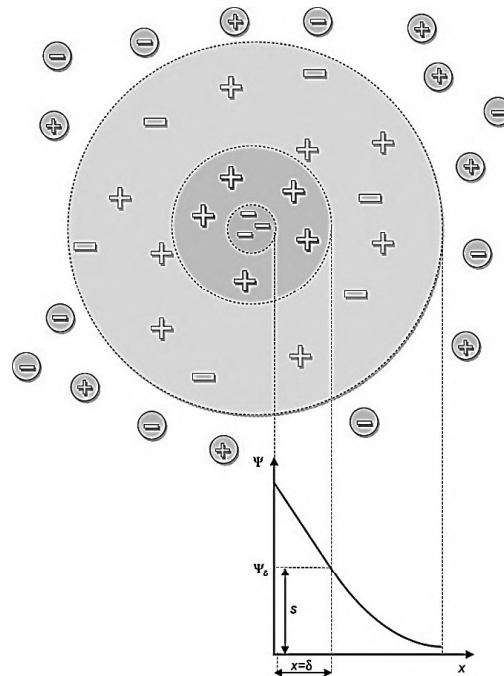
Mleko stanowi ciekłą wydzielinę gruczołów mlekowych ssaków. Zawiera 80-90% wody oraz 10-20% suchej masy. Składa się z trzech faz. Pierwszą z nich jest faza płynna, w skład której wchodzi laktoza i sole mineralne, drugą jest faza koloidalno-białkowa, natomiast trzecią stanowi zemulgowany tłuszcz. Głównymi stabilizatorami mieszaniny są fosfolipidy oraz białka mleka zbudowane z frakcji kazeiny i białek serwatkowych. Tłuszcze tworzą drobne kuleczki o średnicy 1-22 mikronów posiadające otoczkę białkową. Triacyloglicerole stanowią około 98% wszystkich lipidów mleka, natomiast około 1% to fosfolipidy [6]. Tłuszcz mleka krowiego zawiera ponad 500 kwasów tłuszczowych świadczących o jego złożonej strukturze, jak również około 2,5% niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, takich jak kwas linolowy [7]. Nielicznie mogą występować także di-

i monoacyloglicerole, sterole, wyższe kwasy tłuszczowe, karotenoidy, jak również witaminy z grupy B oraz witamina A. Głównym sacharydem występującym w mleku jest laktoza, która umożliwia utrzymanie prawidłowej flory bakteryjnej w przewodzie pokarmowym młodych organizmów. Białka w mleku występują w charakterystycznej postaci miceli, tworzące zole w fazie wodnej mleka [8].

2. BIOKOLOIDY

Biokoloidy stanowią układy rozproszone, będące stanem pośrednim między roztworem rzeczywistym a zawiesinami, zbudowane z cząsteczek o średnicy 1-100 nm [9]. W odróżnieniu od układów homogennych, układy heterogenne - jakimi są biokoloidy - posiadają granice międzyfazowe, w których substancje mieszczące się w obrębie granicy faz wykazują inne właściwości w stosunku do cząsteczek znajdujących się w fazie objętościowej (głębia roztworu). Badanie właściwości układów koloidalnych dowodzą ich termodynamicznej nietrwałości i stabilności kinetycznej [10].

Powierzchnia biokolooidów, nazywana powierzchnią rzeczywistą, stanowi układ z warstwami zaabsorbowanymi. Pierwszą jest warstwa chemisorpcyjna nieodwracalnie związana z powierzchnią rzeczywistą, natomiast druga powstaje wskutek odwracalnej adsorpcji fizycznej. Biokoloidy posiadające ładunek powierzchniowy nazywane są micelami (Rys. 1.), a ich stabilność kinetyczna zależy od tego ładunku [11]. W układach białkowych ładunek elektryczny uzależniony jest od charakteru cząsteczki i otoczenia [12]. Powstawanie ładunku powierzchniowego wynika z dysocjacji grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni, transportu jonów z powierzchni cząstek oraz zjawiska powierzchniowej adsorpcji jonów [13]. Konsekwencją tego jest wzrost ilości przeciwjonów w obrębie powierzchni koloidu i formowanie się warstwy adsorpcyjnej. Tworzy się warstwa dyfuzyjna, której charakter zależy od rodzaju i stężenia elektrolitu [9]. Udowodniono, że do utrzymania stabilności koloidalnej miceli kazeinowych w mleku niezbędne są jony wapnia, które równocześnie wpływają na procesy krzepnięcia mleka [14].



Rysunek 1. Budowa biokoloidu. Zmiana potencjału powierzchniowego w funkcji odległości od powierzchni koloidu. Ψ - potencjał powierzchniowy, δ - grubość warstwy Sterna, Ψ_δ - potencjał rozmytej warstwy podwójnej, S - potencjał zeta

Figure 1. Structure of the biocolloid. Surface potential change as a function of distance from colloid surface. Ψ - surface potential, δ - Stern layer thickness, Ψ_δ - fuzzy double layer potential, S - zeta potential

Naładowana cząstka, zawieszona w ciekłym ośrodku, jest otoczona podwójną warstwą elektryczną, której właściwości zależą zarówno od medium, jak i od właściwości cząstek. Stosując w cieczy pole elektryczne i obserwując migrację cząstek w kierunku którejkolwiek z elektrod, można badać ładunki cząstek [15]. Jednym z najważniejszych parametrów określających układy koloidalne jest potencjał zeta (ζ) definiowany jako potencjał elektryczny hydrodynamicznej płaszczyzny ścięcia, będącej hipotetycznym obszarem międzyfazowym pomiędzy stałym ciekłym poziomem przyległym do powierzchni cząstki oraz względnie ciekłym poruszającym się do powierzchni podczas elektroforezy. Potencjał zeta jest proporcjonalny do gęstości ładunku na powierzchni koloidu, który z kolei zależy od pH. Wynika z tego, że wartość potencjału zeta będzie różna w zależności od pH oraz stężenia elektrolitu. Wartość potencjału zeta obliczana jest na podstawie ruchliwości elektroforetycznej koloidu. Standardowe układy koloidalne warunko-

wane przez oddziaływania elektrostatyczne posiadają wartość potencjału zeta w granicach od $\zeta = -30$ do $\zeta = +30$ mV, co oznacza niestabilność układu [16]. O stabilizacji układu świadczy odchylenie wartości potencjału elektrokinetycznego poza wymienione wyżej wartości. Wielkość ζ waha się od - 200 do 200 mV, w zależności od elektrochemicznego zachowania powierzchni rozdziału cząstek [17]. Dzięki istnieniu potencjału zeta możliwe jest tłumaczenie stabilności układów, zjawiska agregacji, czy adhezji.

W badaniach mleczarskich potencjał zeta został wykorzystany jako wskaźnik ładunku elektrycznego kuleczek tłuszczu w mleku [18], jak również miceli kazeiny [16,19]. Uzyskane wartości potencjału zeta miceli kazeiny przy naturalnym pH (6,7) wahają się od -8 mV, określone przez Schmidta i Poll [20], do -22 mV, określone przez Philippe i in. [16]. Oczywiście staje się, że technika pomiaru i warunki eksperymentalne mają znaczący wpływ na wyniki prowadzonych analiz. Zespół profesora Buszewskiego prowadzi liczne badania dotyczące rozkładu ładunku oraz jego wpływu na właściwości fizykochemiczne oraz funkcjonalizację powierzchni biokolooidów, np. przez jony metali, w szczególności białek mleka takich jak kazeiny [21], laktoferyny [22], laktoglobuliny [23].

3. SKŁADNIKI BIAŁKOWE MLEKA

Świeże, surowe mleko stanowi roztwór koloidalny dzięki białkom występującym głównie w postaci kompleksu lub pojedynczych cząsteczek. Białka mleka można podzielić na dwie główne grupy: białka kazeinowe (nazywane kazeinami) oraz białka serwatkowe (albuminy i globuliny) (Tab. 1.) [24].

Tabela 1. Główne białka występujące w mleku krowim oraz ich najważniejsze właściwości
Table 1. The main proteins found in cow's milk and their most important properties

Białka mleka krowiego	Masa [kDa]	% występowania	pI	Rodzaje izoform
kazeina	100-150 tys	75-80		α , β , κ , γ
α -kazeina (α -s1-kazeina, α -s2-kazeina)	s1 - 23,00 s2 - 25,20	45	4,44 - 4,76	α
β -kazeina	24,00	35	4,83 - 5,07	β
κ -kazeina	19,37	15	5,45 - 5,77	κ
γ -kazeina	7,25	5	5,30 - 5,80	γ
białka serwatkowe		20-25		LF, TF, PP, LPO
laktoferyna	76,11	4	8,81	LF
transferyna	79,00	4	5,20 - 5,60	TF
proteozo-peptony	34,00	20	5,22 - 5,58	PP

laktoperoksydaza	78,00 – 89,00	1	8,63 - 9,80	LPO
albuminy		61		ALA, BLG, BSA
α -laktoalbumina	14,17	30	4,20 - 4,50	ALA
β -laktoglobulina A i B	A=18,36 B=18,28	65	5,13	BLG A i B
albumina serum (surowica krwi)	66,39	15	4,70 - 4,90	BSA
globuliny (immunoglobuliny)		10		IgG, IgM, IgA
typ G (IgG)	150-170 tys	90	5,50 - 6,80	IgG
typ M (IgM)	0,9-1 mln	5	7,50 - 8,30	IgM
typ A (IgA)	300-500 tys	5	7,50 - 8,40	IgA

Kazeina stanowi około 75-80% (v/v) ogólnej ilości białek mleka krowiego i odpowiedzialna jest między innymi za zjawisko pienienia mleka. Proces ten polega na koagulacja, czyli przechodzenia z zolu do żelu pod wpływem zakwaszenia środowiska. Kazeina występuje w postaci fosfoproteidy oraz glikoproteiny. W stanie natywnym występuje w formie miceli o średnicy 50-250 nm, składających się z podjednostek zawierających różne frakcje kazeinowe. Pojedyncza micela zbudowana jest z 300-500 podjednostek połączonych jonami wapniowymi, fosforanowymi i cytrynianowymi. Podstawową funkcją kazeiny jest wiązanie wapnia i fosforu, tym samym zwiększając ich przyswajalność. Dodatkowo wspomaga wchłanianie innych pierwiastków, takich jak cynk czy miedź w przewodzie pokarmowych. Dzięki zdolności wiązania jonów metali, kazeina posiada właściwości antyoksydacyjne.

Drugą grupą białek mlekowych są białka serwatkowe stanowiące bogate i zbilansowane źródło aminokwasów w diecie człowieka. Podobnie jak aktywne biologicznie peptydy i aminokwasy uwalniane podczas trawienia, białka serwatkowe wykazują znaczne wartości odżywcze. Białka globularne są bardziej podatne na działanie enzymów w porównaniu z np. białkami fibrylarnymi oraz wykazują określoną aktywność biologiczną.

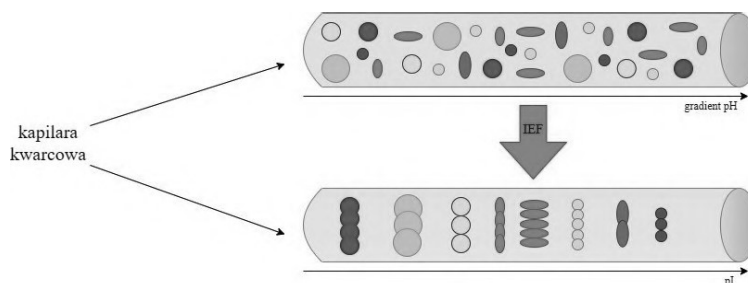
Znając zależność pomiędzy strukturą białka, a jego właściwościami możliwa jest modyfikacja jego cech istotnych w przetwarzaniu żywności. Przykładem może być enzymatyczna modyfikacja białek serwatkowych celem otrzymania żywności o zaplanowanych pożądanych właściwościach, w tym hydrolizatów o ściśle określonym składzie peptydowym [25]. Ogromnym atutem poznania składu białkowego mleka jest pomoc w leczeniu alergii pokarmowych. U dzieci w wieku poniżej 2 lat alergia na mleko krowie jest drugą przyczyną alergii pokarmowych i występuje w przedziale od 2 do 3% [26]. Ponieważ mleko jest głównym pokarmem niemowlęcia, ta patologia jest znaczącym problemem zdrowotnym.

Większość białek mleka wiąże się z odpowiedzią alergiczną [27,28], jednak badania wykazały, że głównymi alergenami są kazeiny: α -LA i β -LG [29,30].

4. KAPILARNE OGNISKOWANIE IZOELEKTRYCZNE JAKO METODA ROZDZIELANIA BIAŁEK MLEKA

Elektroforeza kapilarna (*Capillary Electrophoresis*, CE) jest alternatywą dla tradycyjnej elektroforezy żelowej w płytkach, ponieważ umożliwia wykonywanie automatycznych analiz z bardzo wysoką rozdzielczością i bardzo małym zapotrzebowaniem na próbkę i bufor. Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (ang. *Capillary Isoelectric Focusing*, CIEF) jest rodzajem CE, odbywającym się w buforze, w którym wartość pH buforu zmienia się w sposób ciągły, od wartości najwyższej przy katodzie do najniższej przy anodzie. Ustalenie się wartości pH możliwe jest dzięki zastosowaniu specjalnych roztworów buforowych zwanych amfolitami. Amfoteryczne substancje takie, jak białka czy peptydy, migrują w polu elektrycznym w kierunku elektrod o znaku przeciwnym. Napotykać jednak po drodze zmieniające się wartości pH elektrolitu zatrzymują się w miejscu, w którym $pH = pI$. Punkt, w którym dochodzi do przecięcia zera przez potencjał zeta to punkt izoelektryczny (ang. *Isoelectric Point*, pI), oznaczający wartość pH, przy której wypadkowy ładunek cząsteczki białka wynosi 0. W punkcie tym białko nie wykazuje ruchliwości elektroforetycznej oraz charakteryzuje się najniższą rozpuszczalnością, lepkością i ciśnieniem osmotycznym.

W środowisku o wysokim stężeniu jonów wodorowych (niskie pH) białko zyskuje ładunek dodatni, natomiast przy niskim stężeniu jonów wodorowych – ładunek ujemny. Cząsteczka migrując w polu elektrycznym powraca do strefy $pH = pI$. Następnie wysokie napięcie zostaje odłączone, a roztwór wypychany jest z kapilary przez zastosowanie wysokiego ciśnienia na jednym z jej końców. Skutkuje to rozdzieleniem białek na podstawie ich pI, a selektywność rozdzielania związana jest z użytym zestawem amfolitów. Wartość pI może ulec zmianie poprzez modyfikacje potranslacyjne białek, takie jak: fosforylacja i defosforylacja.

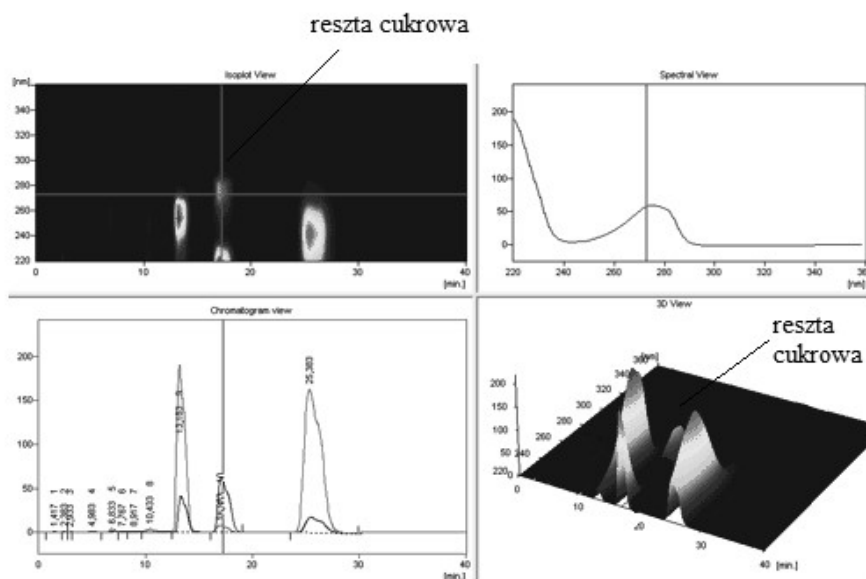


Rysunek 2. Schemat kapilarnego ogniskowania izoelektrycznego [31]

Figure 2. Scheme of capillary isoelectric focusing [31]

4.1. ZASTOSOWANIE CE I CIEF W ANALIZACH PROTEOMICZNYCH MLEKA

Wiele przeprowadzonych badań wykazało, że CE jest odpowiednią techniką do analizy białek mleka krów, owiec i kóz [32,33] oraz peptydów wytwarzanych w wyniku ich proteolizy podczas dojrzewania w produktach mlecznych [34] (Rys. 3,4).

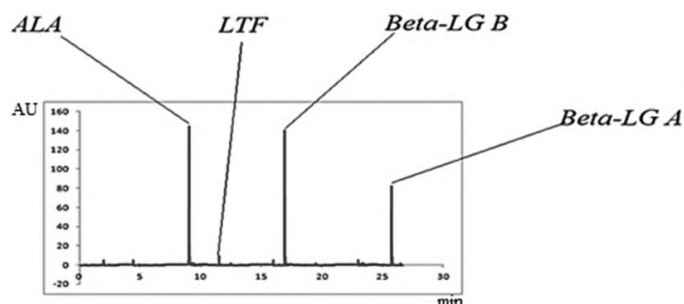


Rysunek 3. Analiza białek serwatkowych. Warunki analizy zachowane według protokołu Beckmana [35]. Widoczne trzy sygnały : α -laktoalbumina, β -LG B, β -LG A. Znajduje się tu reszta cukrowa nie widoczna w 280nm (widmo 3D – kolor na widmie oznacza ilość związku)

Figure 3. Analysis of whey proteins. Analysis conditions maintained according to Beckman protocol. Three signals visible: α -lactalbumin, β -LG B, β -LG A. There is a sugar residue not visible at 280nm (3D spectrum - the color in the spectrum indicates the amount of the compound)

Somma i in. opracowali ulepszoną procedurę kapilarnego ogniskowania izoelektrycznego do wykrywania i różnicowania produktów hydrolizy β -kazeiny bydlęcej i bawolej przez plazminy [36]. W warunkach eksperymentalnych skutecznie oddzielono kazeinę γ z obu gatunków. Analiza uzyskanych elektroferogramów sugeruje, że CIEF może stanowić skuteczną alternatywę dla tradycyjnej analizy elektroforezy w żelu do podstawowych badań strukturalnych lub do zastosowań w ocenie jakości produktów mleczarskich [36]. Poitevina i in. opracowali metodę z zastosowaniem „wąskich cięć pH” poprzez frakcjonowanie IEF mieszaniny amfolitów nośnikowych w szerokim zakresie pH. Dodanie tak przygotowanych amfolitów nośnikowych do dostępnych w handlu mieszanin amfo-

litycznych, umożliwiło zwiększenie rozdzielczości przy wybranym pH oraz poprawę trudnej separacji lizoform β -LG i α -LA kazeiny o zbliżonych wartościach pI [37]. Integracja CIEF z jonizacją przez elektrorozpylanie ESI-MS jest idealna do separacji o wysokiej rozdzielczości i pewnej identyfikacji proteoform. Badania przeprowadzone przez Lecoeuri i in. dowodzą możliwości wykorzystania metody *on-line* CIEF-ESI/MS do jakościowej i ilościowej analizy białek serwatkowych mleka o zbliżonych wartościach Pi [38]. Trimboli i in. prowadzili badania mające na celu wykrycie i ilościowe oznaczenie mleka krowiego dodawanego do mleka bawolego podczas produkcji. W tym celu wykorzystali krowią α -laktoalbuminę jako marker zafalszowania. Metoda elektroforezy kapilarnej wykazała wysoką liniowość oraz powtarzalność, co pozwoli na szybką i dokładną identyfikację zafalszowań mlekiem krowim [39].



Rysunek 4. Elektroferogram 2D dla białek serwatkowych mleka krowiego uzyskany metodą Beckmana. Widoczne cztery sygnały : α -laktoalbumina (ALA) ($t_R=9,85\pm 0,98$ min), laktotransferyna (LTF) ($t_R=11,21\pm 0,86$ min), β -LG B ($t_R=16,12\pm 0,67$ min), β -LG A ($t_R=26,21\pm 0,93$ min). Warunki analizy zachowane dla protokołu Beckmana

Figure 4. 2D electropherogram for cow's milk whey proteins obtained by Beckman's method. Visible four entrances: α -lactalbumin (ALA) ($t_R=9,85\pm 0,98$ min), lactotransferrin (LTF) ($t_R=11,21\pm 0,86$ min), β -LG B ($t_R=16,12\pm 0,67$ min), β -LG A ($t_R=26,21\pm 0,93$ min), Analysis conditions retained for Beckman protocol

Połączenie CIEF ze spektrometryczną metodą laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS) jest narzędziem pomocnym w analizie białek. Po kapilarnym ogniskowaniu izoelektrycznym próbka zostaje wymyta i zebrana, a następnie analizowana przy użyciu MALDI-TOF MS. Crowley i in. przeprowadzając kompleksową analizę surowicy ludzkiej za pomocą techniki CIEF-MALDI-TOF MS w trybie *off-line* dowiedli, że zastosowana technika analityczna może stanowić alternatywę dla dwuwymiarowej elektroforezy żelowej w badaniu białek [40].

Ponadto, zastosowanie CIEF umożliwia separację i oznaczanie mikroorganizmów probiotycznych znajdujących się w produktach mlecznych i jednocześnie stanowiących ważną część mikroflory ludzkiej. Szybkie i czułe oznaczanie i identyfikacja tych mikroorganizmów ma kluczowe znaczenie dla kontroli jakości. Ruzicka i in. w swoich badaniach fermentowanych produktów mlecznych, z powodzeniem zastosowali CIEF do rozdzielania i charakterystyki probiotycznych bakterii LAB, takich jak: *L. paracasei* sp. *paracasei*, *L. acidifarinae*, *L. fermentum*, *L. gasperi*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *E. durans*, *E. faecalis* i *E. faecium* na, na podstawie ich punktów izoelektrycznych [41]. Odpowiednie dostosowanie warunków separacji umożliwiło potwierdzenie tożsamości (identyfikację) i analizę ilościową bakterii w próbce z wystarczającą czułością. Dlatego też, CIEF może być skutecznym podejściem do szybkiego wykrywania i rozdzielania LAB, nawet bezpośrednio w produktach mlecznych w przyszłości.

UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione metody elektroforezy kapilarnej są niezwykle istotnym narzędziem w analizie mleka oraz produktów mlecznych. Dzięki połączeniu CE i CIFE z innymi technikami analitycznymi możliwe jest rozdzielanie białek o podobnych właściwościach fizykochemicznych oraz tożsamych wartościach pI. Technika ta pozwala nie tylko na analizę i identyfikację białkowych składników mleka, ale także na oznaczanie bakterii mlekowych w produktach mlecznych. Potrzebne są jednak dalsze badania celem dalszego udoskonalania tych technik.

PODZIĘKOWANIA

Praca ta została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu Opus 14 nr No. 2017/27/B/ST4/02628 (2018-2021).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] T.A. Reinhardt, J. D. Lippolis, J Dairy Res, 2006, **73**, 406.
- [2] P.F. Fox, Advanced Dairy Chemistry. Proteins, Springer US, 2003.
- [3] A. Caroli, R. Rizzi, G. Lühken, G. Erhardt, J Dairy Sci 2010, **93**, 1260.
- [4] H. M. Farrell, R. Jimenez-Flores, G.T. Bleck, E.M. Brown, J.E. Butler, L.K. Creamer, C.L. Hick, C.M. Hollar, K.F. Ng-Kwai-Hang, H.E. Swaisgood, J Dairy Sci, 2004, **87**, 1641.
- [5] G. Schroeder, Wybrane aspekty chemi supramolekularnej, BETAGRAF P.U.H, 2009, Poznań
- [6] G. Cichosz, H. Czeczot. Bromat Chem Toksykol, 2011, **1**, 8.
- [7] M. Kowalska, G. Cichosz, Bromat Chem Toksykol, 2011, **1**, 1.

- [8] R. Bajek, J. Pizoń, *Technologia żywienia człowieka – wybrane zagadnienia*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, 2017, Lublin.
- [9] G.L. Brown, *Surface and colloid science*, A John Wiley & Sons, Nowy Jork, 1969
- [10] H. Sonntag, *Koloidy*, PWN, Warszawa, 1982.
- [11] H. Ohshima, *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science 2VSet*, A John Wiley & Sons, Nowy Jork, 2016.
- [12] S.S. Strickler, A.V. Gribenko, T.R. Keiffer, J. Tomlinson, T. Reihle, V.V. Loladze, G.I. Makhatadze, *Biochemistry*, 2006, **45**, 2761.
- [13] P. Pomastowski, E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, *Anal Nauk i Prakt*, 2012, **2**, 19
- [14] A. Osintsev, V. Braginsky, *JAE*, 2019, **1**, 1.
- [15] C. Cano-Sarmiento, D.I. Téllez-Medina, R. Viveros-Contreras, M. Cornejo-Mazón, C.Y. Figueroa-Hernández, E. García-Armenta, L. Alamilla-Beltrán, H.S. García, G.F. Gutiérrez-López, *Food Eng Rev*, 2018, **10**, 113.
- [16] M. Philippe, Y. Le Graët, F. Gaucheron, *Food Chem*, 2005, **90**, 673.
- [17] T. Glawdel, C. Ren, *Encyclopaedia of microfluidics and nanofluidics*, Springer-Verlag Heidelberg; 2008, Niemcy.
- [18] M.C. Michalski, F. Michel, D. Sainmont, V. Briard, *Biointerfaces*, 2002, **23**, 23.
- [19] M.H. Famelart, J. Tomazewski, M. Piot, S. Pezennec, *Int Dairy J*, 2003, **13**, 123.
- [20] D.G. Schmidt, J.K. Poll, *Neth Milk Dairy J*, 1986, **40**, 269.
- [21] P. Pomastowski, M. Sprynskyy, B. Buszewski, *Colloids Surf B*, 2014, **120**, 21.
- [22] P. Pomastowski, M. Sprynskyy, P. Zuvela, K. Rafińska, M. Malinowski, J.J. Liu, M. Yi, B. Buszewski, *J. Am. Chem*, 2016, **138 25**, 7899.
- [23] B. Buszewski, A. Rodzik, V. Railean-Plugaru, M. Sprynskyy, P. Pomastowski, *Colloids Surf. A*, 2020, **591**, 124443.
- [24] G. Cichosz, H. Czeczot, *Żywieniowy fenomen mleka*, WUM, Olsztyn-Warszawa, 2013.
- [25] J. Leman, *Przem Spożywczy*. 2006, **60**, 26.
- [26] R. Crittenden, C. Little, G. Georgiou, S. Forsyth, L. Bennett, *Aust J Dairy Technol*, 2007, **24**, 62.
- [27] M. Natale, C. Bisson, G. Monti, A. Peltran, L.P. Garoffo, *Mol Nutr Food Res*, 2004, **48**, 363.
- [28] S. Sharma, P. Kumar, C. Betzel, T.P. Singh, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001, **756**, 183.
- [29] R.R. Cocco, K.M. Järvinen, H.A. Sampson, K. Beyer, *J Allergy Clin Immunol*, 2003, **112**, 433.
- [30] P.J. Busse, K.M. Järvinen, L. Vila L, K. Beyer, H.A. Sampson, *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, **129**, 93.
- [31] J. Dai, J. Lamp, Q. Xia, Y. Zhang, *Anal Chem*, 2018, **90**, 2246.
- [32] E. Molina, M. De Frutos, M. Ramos, *J Dairy Res*, 2000, **67**, 209.
- [33] P. Ferranti, R. Pizzano, G. Garro, S. Caira, L. Chianese, F. Addeo, *J Dairy Res*, 2001, **68**, 35
- [34] I. Recio, M.R. García-Risco, L. Amigo, E. Molina, M. Ramos, P.J. Martín-Álvarez, *J Dairy Sci*, 2004, **87**, 1595.

-
- [35] Beckman Coulter, Application Guide PA 800 plus Pharmaceutical Analysis System Capillary Isoelectric Focusing (cIEF) Analysis, USA, 2014.
- [36] A. Somma, P. Ferranti, F. Addeo, R. Mauriello, L. Chianese, *J Chromatogr A*, 2008, **1192**, 294.
- [37] M. Poitevin, A. Morin, J.M. Busnel, S. Descroix, M.C. Hennion, G. Peltre, *J Chromatogr A*, 2007, **1155**, 230.
- [38] M. Lecoeur, P. Gareil, A. Varenne, *J Chromatogr A*, 2010, **1217**, 7293.
- [39] F. Trimboli, N. Costanzo, V. Lopreatato, C. Ceniti, V.M. Morittu, A. Spina, D. Britti, *J Dairy .Sci*, 2019, **102**, 5962.
- [40] T.A. Crowley, M.A. Hayes, *Proteomics*, 2005, **5**, 3798.
- [41] F. Ruzicka, M. Horak, V. Hla, K. Mlynarikova, V. Drab, *Food Anal Methods*, 2016, **9**, 3251.

Praca wpłynęła do Redakcji 15 maja 2021 r.