

牛乳重要营养品质特征的研究进展

杨永新^{1,2}, 王加启^{1,*}, 卜登攀¹, 袁廷杰¹, 杨晋辉¹, 周凌云¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 安徽省农业科学院畜牧兽医研究所, 安徽 合肥 230031)

摘要: 牛乳营养组成非常丰富, 乳蛋白和乳脂肪是表征牛奶营养品质的重要指标, 并受诸多因素的影响。本文综述遗传、环境和饲养管理等因素对乳蛋白和乳脂肪组分及含量的影响, 以及牛乳蛋白和乳脂肪酸的特征性含量和比值。

关键词: 乳蛋白; 乳脂肪; 牛乳; 脂肪酸

A Review on Research Progress in Key Nutritional Characteristics of Milk

YANG Yong-xin^{1,2}, WANG Jia-qi^{1,*}, BU Deng-pan¹, YUAN Ting-jie¹, YANG Jin-hui¹, ZHOU Ling-yun¹

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Institute of Animal Science, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: Milk derived from cattle species has many nutrients composition and milk protein and milk fat is an important indicator to characterize the nutritional quality of milk. Their contents in milk and dairy products are influenced by many factors. This review focused on the effect of genetic, environment and management on composition and concentration of milk protein and milk fatty acids, as well as their characteristic contents and ratio so as to establish the key nutritional characteristics of milk and the dairy products.

Key words: milk protein; milk fat; milk; fatty acid

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)01-0328-05

牛乳营养丰富, 含有人体所需的全部氨基酸、丰富的矿物质和维生素及乳蛋白和乳脂肪等成分, 一直被认为是人类膳食中完美的食品之一。牛乳中的乳脂肪是一种高质量的天然脂肪, 乳脂肪以小球或小液滴状分散在乳中, 脂肪球由位于中心的非极性的甘油三酯和胆固醇酯等与外层极性的磷脂、胆固醇、蛋白和酶等组成。乳脂肪的主要成分是甘油三酯、磷脂和甾醇; 与甘油三酯相结合的脂肪酸有400多种, 常见的有20多种^[1]。乳脂肪除提供营养外, 也具有许多生理活性, 特别是乳脂中的中短链脂肪酸和不饱和脂肪酸对人体健康有益, 此外还含有大量的脂溶性维生素。蛋白质也是牛乳的重要营养成分, 乳蛋白主要有酪蛋白和乳清蛋白两大类: 酪蛋白是以 α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白为主, 乳清蛋白以 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白、免疫球蛋白和乳铁蛋白等蛋白为主。乳蛋白除提供营养外, 还具有诸多生理功能, 此外, 许多乳蛋白还具有遗传多态性, 可作为辅助选择标记分子。然而, 牛乳成分因遗传、生理阶段、日粮营养、饲养方式和环境等许多因素的影响而表现出一定程度的变化。本文就表征牛乳重要营养品质的

乳蛋白和乳脂肪组分及含量的影响因素进行分析, 旨在为评价和改善牛奶品质提供依据。

1 乳脂肪酸组分及含量的研究

乳脂肪约有99%的成分是由1个分子的甘油和3个分子脂肪酸所组成的甘油三酸酯, 乳脂肪组成随个体差异、泌乳期、胎次、饲料、季节和气温等的变化会有较大的变化。牛乳脂肪酸中大约60%~70%是饱和脂肪酸(主要是 $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 和 $C_{18:0}$), 25%~30%是不饱和脂肪酸(主要是油酸), 还有大约4%是多不饱和脂肪酸(亚油酸和亚麻酸)^[1]。牛乳中碳链长度为 $C_{4:0}$ 至 $C_{14:0}$ 和50%的 $C_{16:0}$ 的脂肪酸都是由乳腺从头合成(从瘤胃的乙酸盐和 β -羟基丁酸开始), 其余50%的 $C_{16:0}$ 及所有长链脂肪酸都来自血浆。因此, 中长链乳脂肪酸易受日粮营养等的影响, 特别是日粮组成可造成乳脂肪酸的组成和含量发生较大变化^[2-4]。有研究表明^[5], 乳中 $C_{4:0}$ 至 $C_{16:0}$ 的遗传力较高, 为0.42~0.71, 其中, $C_{10:0}$ 的遗传力最高为0.71; 除*cis*-9、*trans*-11 $C_{18:2}$ 的遗传力为0.42外, $C_{18:0}$ 以上脂肪酸遗传力约

收稿日期: 2011-10-21

基金项目: 国家“973”计划项目(2011CB100805)

作者简介: 杨永新(1978—), 男, 博士, 主要从事分子生物学研究。E-mail: yangyongxin66@yahoo.com.cn

*通信作者: 王加启(1967—), 男, 研究员, 博士, 主要从事反刍动物营养与牛奶质量改良研究。E-mail: wang-jia-qi@263.net

为0.25, 而乳中饱和脂肪酸的遗传力为0.42, 单不饱和脂肪酸的遗传力为0.14, 饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸之比的遗传力为0.27^[6]。此外, 王吉峰^[3]还发现奶牛采食不同精粗比日粮也可造成乳中脂肪酸含量的变化, 同时表明, 高精料日粮牛乳中C_{14:1}和trans C_{18:1}的含量显著高于低精料日粮组奶牛, 而乳中C_{16:0}的含量则显著低于低精料日粮组, 导致高精料日粮组饱和脂肪酸含量较低, 而不饱和脂肪酸含量有提高的趋势。Schroeder等^[7]对全混合日粮和放牧奶牛补饲谷物精料或钙盐, 乳脂中C_{4:0}的含量未有显著变化, 其他脂肪酸都发生了显著变化。另外, 在日粮中添加莫能菌素、酵母培养物和脂肪酸等可造成乳脂脂肪酸含量的改变^[8-9]。奶牛日粮中添加不同植物油籽可引起乳脂中C_{12:0}和C_{14:0}含量的变化; 不饱和与饱和脂肪酸以及多不饱和与饱和脂肪酸、*n*-3与*n*-6族脂肪酸之间的比值改变, 且奶牛日粮中添加植物油后, 也可引起乳脂中链脂肪酸的含量显著降低, 而不饱和脂肪酸和共轭亚油酸等的含量显著增加^[4,10-14]。这是由于油籽饲料中含有大量的亚油酸和亚麻酸进入乳中有着改善乳品质的效果, 但随植物油籽的种植地域、类别、量和形态的差别, 可造成乳脂脂肪酸含量呈现出一定差异。此外, 山羊乳脂脂肪酸组成也因日粮改变而发生变化^[15-16]。由此表明, 日粮的改变对乳脂脂肪酸的组成有显著影响, 可通过日粮营养策略调控乳脂脂肪酸的组成。

季节因素也是影响乳脂脂肪酸的重要因素, 这可能是随季节的变化, 奶牛日粮以及生存的环境发生了巨大变化所致。Smit等^[17]发现冬季和夏季奶牛乳脂脂肪酸含量存在较大变化, 仅C_{16:1}和C_{18:0}的含量保持在较稳定的水平。此后的研究也发现, 乳脂中C_{16:1}、C_{18:1}和共轭亚油酸的含量比较稳定^[18]。然而, 另有研究表明C_{4:0}和C_{22:6}脂肪酸含量随季节的变化未有显著差异, 而其他脂肪酸则无显著变化^[19]。此外, Heck等^[20]研究发现乳中所有脂肪酸含量都随季节发生了显著变化, 饱和脂肪酸含量在8月份最低, 为68.1%, 2月份最高, 为73.1%; 而共轭亚油酸含量在6月份最低, 为31.1%, 10月份最高, 为33.8%。同时, 也有学者发现^[21], 地理环境和奶牛群体规模的大小也可造成牛乳中脂肪酸含量发生显著变化。随季节的变化, 水牛、山羊和绵羊乳脂脂肪酸组成及含量发生了显著变化^[19,22], 但这种变化因物种差异及研究者所在环境的不同而呈现出一定差别。

由以上研究结果可以发现, 乳脂脂肪酸的组成是一个敏感指标, 易受饲料和季节等多种因素的影响而发生显著变化。虽然如此, C_{10:0}、C_{14:0}、C_{16:0}、C_{18:0}和C_{18:1}这5种脂肪酸是山羊和绵羊乳中的主要脂肪酸, 占总脂肪酸含量的75%以上, 而牛乳中C_{14:0}、C_{16:0}、C_{18:0}和C_{18:1}是主要脂肪酸。且有研究发现, C_{12:0}与C_{10:0}的比率在各物种内较恒定, 奶牛C_{12:0}与C_{10:0}的比率约为1.16, 而山羊乳的比率为

0.46, 绵羊乳为0.58, 据此可区别牛乳脂肪与山羊和绵羊乳脂肪^[23]。因此, 牛乳中脂肪酸含量及特定脂肪酸的比率可作为牛乳区别于其他物种乳的潜在标志分子。

2 乳蛋白组分的定性和定量研究

2.1 乳蛋白组分及含量的影响因素

奶牛、山羊和绵羊等物种乳蛋白是以酪蛋白和乳清蛋白为主要组分。乳蛋白经复杂的遗传变异和丰富的翻译后修饰, 使乳蛋白组成变得非常繁杂。荷斯坦奶牛乳中酪蛋白约占总蛋白含量的80%, 酪蛋白与乳清蛋白的比例较稳定, 近来已有许多学者对影响乳中酪蛋白含量的因素进行研究, 以改善乳产品的质量和产量, 这些因素包括遗传、环境和管理等。采用随机回归模型估测的第一至第三胎次奶牛产乳量、乳脂肪和乳蛋白产量的遗传力分别为0.40~0.59、0.34~0.68和0.33~0.69^[24]。Schopen等^[25]分析发现 β -酪蛋白畜群内遗传力最低为0.25, β -乳球蛋白最高为0.80; 总乳清蛋白的遗传力为0.71, 高于总酪蛋白遗传力0.41。此后, Bobe等^[26]研究发现, β -乳球蛋白和 κ -酪蛋白基因型对主要乳蛋白组分的含量虽产生一定影响, 但对总蛋白含量无显著影响。Heck等^[27]研究发现, κ -酪蛋白和 β -酪蛋白基因型对主要乳蛋白组分的相对含量及蛋白含量有显著影响。且 β -乳球蛋白BB基因型奶牛乳中 β -乳球蛋白的含量比AA基因型低30%, 但产乳量和蛋白含量无差异, 由此改变了乳中酪蛋白的比率^[28]。由此表明, 遗传基础对乳蛋白含量也具有一定程度的影响。此外, 随泌乳日龄的增加, 奶牛的乳蛋白、乳脂肪、酪蛋白和乳清蛋白含量也增加, 而乳蛋白与乳脂肪的比例以及酪蛋白与乳清蛋白比例无显著变化; 乳蛋白组成相对稳定, 受季节因素影响较小^[20,29]。Bobe等^[30]对产后第6天肝脏中甘油三酯和糖原比<1.5和>2.5的经产荷斯坦奶牛, 于泌乳期第21~35天注射10mg/d糖原, 发现注射糖原降低了乳蛋白含量和产量, 同时 κ -酪蛋白的含量显著增加。由此可知, 内在的遗传因素与外在的饲料营养和泌乳期等都可影响牛乳蛋白组分及含量的变化。

采用反相高效液相色谱方法对牦牛乳蛋白的组成分析发现, 牦牛乳蛋白含量为4.6%~5.8%, 乳中 β -酪蛋白占总蛋白含量的41%, α_s -酪蛋白约占总酪蛋白的36.5%, κ -酪蛋白约占总酪蛋白的13.7%, 牦牛乳中 β -乳球蛋白和血清白蛋白的组成与荷斯坦牛乳相似^[31]。母马分娩后分泌的乳中, 蛋白含量可达16.41%, 在泌乳期第8~45天, 乳中蛋白含量为2.31%, 酪蛋白含量占总蛋白的51.95%^[32]。采用中红外光谱对西门塔尔牛奶蛋白含量检测发现, 乳蛋白含量为4.0%, 酪蛋白含量占总蛋白的87.5%, 其中 β -酪蛋白含量占总蛋白的36.9%, α_{s1} -酪蛋

白、 α_2 -酪蛋白和 κ -酪蛋白与荷斯坦奶牛乳蛋白组分相似^[33]。山羊乳中酪蛋白含量占总蛋白的70%以上， β -酪蛋白是其主要成分，且日粮对酪蛋白含量有显著影响，但酪蛋白组分在山羊品种间无显著差异^[34-35]。此外，还发现 α_{s2} -酪蛋白的相对含量和浓度随泌乳期的推移而逐渐降低，泌乳高峰期 κ -酪蛋白的浓度几乎是泌乳末期的2倍^[36]。

综上所述，虽然遗传、泌乳期、胎次以及季节和日粮营养等因素能够影响乳蛋白的含量^[22]，但因物种差异使乳蛋白主要组分的含量存在较大的变化。

2.2 乳蛋白组分的特性研究

基于二维凝胶电泳(2-DE)的蛋白质组学分析技术，能够直观、整体地研究乳中蛋白质的表达情况，便于全面了解蛋白质的表达信息。目前，已有研究采用2-DE技术分析奶牛干乳期蛋白表达模式，结果发现，酪蛋白的含量在整个干乳期降低，乳清中多肽含量增加，经质谱鉴定为酪蛋白的降解产物^[37]。Holland等^[38]用2-DE分离了牛乳蛋白，经过基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定后，在等电点4.47~5.81范围内发现10个 κ -酪蛋白蛋白点，其存在两种遗传变异体A和B以及翻译后修饰，由于乳蛋白中高丰度的 α_{s1} -酪蛋白和 β -酪蛋白在分离过程中会掩盖部分低丰度的 κ -酪蛋白的表达信息，根据 α_{s1} -酪蛋白和 β -酪蛋白中缺少半胱氨酸的特点，将牛乳样品用半胱氨酸亲和方法富集 κ -酪蛋白以减少 α_{s1} -酪蛋白和 β -酪蛋白的影响，富集的 κ -酪蛋白经过2-DE分离后，发现了16个 κ -酪蛋白蛋白点，并通过串联质谱鉴定，得到含有1~3个磷酸基团的 κ -酪蛋白磷酸化形式^[39]。之后，该学者^[40]又采用蛋白质组学方法分析了 κ -酪蛋白低聚物的二硫键连接方式。用免疫吸附的方法移除奶牛初乳和常乳中高丰度的 β -酪蛋白和免疫球蛋白后，对富集的低丰度蛋白质采用2-DE分离、微序列及质谱方法鉴定，结果发现奶牛初乳中含有特异的蛋白质，如血纤维蛋白原 β -链、 α -抗胰蛋白酶和阿朴脂蛋白等^[41]。

Lindmark-Månsson等^[42]采用超滤法富集了奶牛初乳和常乳中乳清后，经2-DE对乳清中多肽分离，发现初乳乳清中多肽的含量随泌乳日龄的增加而逐渐降低，直至常乳水平。此后采用离子交换色谱的方法对乳清蛋白组分区分分为30个组分，经液相色谱串联质谱鉴定为293个蛋白，其中176个蛋白在先前研究中都未能得到鉴定，此外，Neuropilin 2和丙酮酸激酶等36个蛋白特异表达于初乳，而卵泡抑素、黏蛋白16和苹果酸脱氢酶等40个蛋白则存在于常乳乳清中^[43]。

此外，Kuy等^[44]采用蛋白质组学方法对袋貂泌乳早期和后期乳中乳清蛋白和酪蛋白组分进行了鉴定，结果发现泌乳早期组织蛋白酶B、凝集素、溶菌酶和中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白以及一个新的蛋白-Velp表达量高于泌乳后期； α -酪蛋白和 β -酪蛋白在泌乳早期和后期

期无显著变化，而 κ -酪蛋白在泌乳后期表达量显著降低。采用蛋白质组学方法分析了水牛脱脂乳蛋白、乳清和乳脂肪球膜蛋白的组分，鉴定了 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白和 β -乳球蛋白等72个主要蛋白^[45]。Miranda等^[46]采用SDS-PAGE和反相高效液相色谱分析了马乳蛋白，鉴定了马乳中 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白和溶菌酶C等主要蛋白成分，并发现 α_{s1} -酪蛋白和 β -酪蛋白存在多态性。通过与奶牛、山羊和人乳蛋白模式比较，表明马乳酪蛋白和溶菌酶C的含量以及酪蛋白与乳清蛋白比与人乳相似。此外，还有研究采用2-DE方法构建了人、马、驴、山羊、绵羊、水牛和荷斯坦奶牛的乳蛋白表达图谱，并发现不同物种凝胶图谱中乳蛋白的表达存在一定的差异^[47]。

2.3 乳蛋白组分及含量的研究

近来，随着检测技术的飞速发展，建立了酪蛋白的色谱分离技术，在UV检测器280nm酪蛋白含量(0.5~40 μ mol/L)和峰面积线性相关， α -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白的检测限为0.33~0.65 μ mol/L， α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白的相对标准偏差值为4.4%~6.2%^[48]。此后，又有研究者建立了分离和定量 α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白的反相液相色谱电喷雾离子质谱技术^[49]，从而采用质谱技术获取乳蛋白样品图谱也得以实现。Cozzolino等^[50-51]通过Maldi-Tof MS分析了荷斯坦奶牛、水牛和绵羊乳蛋白，发现荷斯坦奶牛、水牛和绵羊乳蛋白的质谱图谱的存在差异，这为区分不同物种乳蛋白来源奠定了基础。随后，又有研究采用高效液相色谱串联电喷雾离子质谱的方法定量分析了奶牛和山羊乳清蛋白，发现奶牛和山羊乳蛋白总离子流图谱存在差异，据此可检测山羊乳中是否掺有牛乳，且最低检出限为5%^[52]。另外，采用毛细管等电聚焦电泳结合质谱的方法鉴定了纤溶酶水解水牛和荷斯坦奶牛 β -酪蛋白的多肽，发现水牛 β -酪蛋白水解后除 γ -酪蛋白外，还存在一个新的15476D的多肽，从而与荷斯坦奶牛 β -酪蛋白的水解产物形成明显的差异^[53]。液相色谱电喷雾离子串联质谱检测纤溶酶水解后的绵羊、山羊和奶牛酪蛋白，结果发现绵羊酪蛋白水解后可产生一个独特的质核比为860的肽段，由此，通过此肽段的检测可确定山羊和奶牛奶酪中含有2%的绵羊乳^[54]。此后，用反相高效液相色谱串联质谱的方法定量了水牛乳中酪蛋白含量，发现 β -酪蛋白和 α_{s2} -酪蛋白存在1个峰，而 α_{s1} -酪蛋白和 κ -酪蛋白分别有2、3个峰，可能是 α_{s1} -酪蛋白和 κ -酪蛋白存在变异或翻译后修饰^[55]。

综上所述，基于蛋白质组分差异的质谱技术为定性和定量分析乳蛋白提供了准确和可靠的研究策略，从而为牛乳蛋白特征图谱的建立提供了有力的技术支持，并可作为区分其他物种乳蛋白的标志。

3 结 语

牛乳营养丰富,成分复杂,虽有许多研究广泛地分析了牛乳重要营养品质的许多方面,但仍未能阐明牛乳营养品质的组分和含量及其特征。随着分子生物学技术和方法的飞速发展,特别是基于组学的系统和整体的分析策略,为牛乳重要营养品质研究提供了准确和可靠的信息,由此,今后有望全面解析牛乳各组分及含量,以用于评价和改善牛乳品质。

参考文献:

- [1] JENSEN R G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000[J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85 (2): 295-350.
- [2] KADEGOWDA A K, PIPEROVA L S, ERDMAN R A. Principal component and multivariate analysis of milk long-chain fatty acid composition during diet-induced milk fat depression[J]. *J Dairy Sci*, 2008, 91(2): 749-759.
- [3] 王吉峰. 日粮精粗比对奶牛消化代谢及乳脂脂肪酸成分影响的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2004.
- [4] BORK N R, SCHROEDER J W, LARDY G P, et al. Effect of feeding rolled flaxseed on milk fatty acid profiles and reproductive performance of dairy cows[J]. *J Anim Sci*, 2010, 88(11): 3739-3748.
- [5] STOOP W M, van ARENDONK J A, HECK J M, et al. Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians[J]. *J Dairy Sci*, 2008, 91(1): 385-394.
- [6] SOYEURT H, DARDENNE P, DEHARENG F, et al. Genetic parameters of saturated and monounsaturated fatty acid content and the ratio of saturated to unsaturated fatty acids in bovine milk[J]. *J Dairy Sci*, 2008, 91(9): 3611-3626.
- [7] SCHROEDER G F, DELAHOY J E, VIDAURRETA I, et al. Milk fatty acid composition of cows fed a total mixed ration or pasture plus concentrates replacing corn with fat[J]. *J Dairy Sci*, 2003, 86(10): 3237-3248.
- [8] HENNESSY A A, ROSS R P, DEVERY R, et al. Optimization of a reconstituted skim milk based medium for enhanced CLA production by bifidobacteria[J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 106(4): 1315-1327.
- [9] ODONGO N E, OR-RASHID M M, BAGG R, et al. Long-term effects of feeding monensin on milk fatty acid composition in lactating dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2007, 90(11): 5126-5133.
- [10] 王建平, 王加启, 卜登攀, 等. 饱和脂肪酸对高温环境条件下泌乳中期奶牛产奶性能及牛奶脂肪酸组成的影响[J]. *动物营养学报*, 2009, 21(3): 301-311.
- [11] KUDRNA V, MAROUNEK M. Influence of feeding whole sunflower seed and extruded linseed on production of dairy cows, rumen and plasma constituents, and fatty acid composition of milk[J]. *Arch Anim Nutr*, 2008, 62(1): 60-69.
- [12] HURTAUD C, PEYRAUD J L. Effects of feeding camelina(seeds or meal)on milk fatty acid composition and butter spreadability[J]. *J Dairy Sci*, 2007, 90(11): 5134-5145.
- [13] CHICHLOWSKI M W, SCHROEDER J W, PARK C S, et al. Altering the fatty acids in milk fat by including canola seed in dairy cattle diets[J]. *J Dairy Sci*, 2005, 88(9): 3084-3094.
- [14] 尹福泉, 嘎尔迪, 刘瑞芳, 等. 日粮中添加油料籽实对奶牛生产性能及乳脂脂肪酸组成的影响[J]. *动物营养学报*, 2008, 20(3): 261-267.
- [15] SCHMIDELY P, MORAND-FEHR P, SAUVANT D. Influence of extruded soybeans with or without bicarbonate on milk performance and fatty acid composition of goat milk[J]. *J Dairy Sci*, 2005, 88(2): 757-765.
- [16] BERNARD L, SHINGFIELD K J, ROURL J, et al. Effect of plant oils in the diet on performance and milk fatty acid composition in goats fed diets based on grass hay or maize silage[J]. *Br J Nutr*, 2009, 101(2): 213-224.
- [17] SMIT L, SCHNFELDT H, de BEER W, et al. The effect of locality and season on the composition of South African whole milk[J]. *J Food Compos Anal*, 2000, 13(4): 345-367.
- [18] CASTILLO A, TAVERNA M, PÁEZ R, et al. Fatty acid composition of milk from dairy cows fed fresh alfalfa based diets[J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2006, 131(3/4): 241-254.
- [19] TALPUR F, BHANGER M, KHOOHARO A, et al. Seasonal variation in fatty acid composition of milk from ruminants reared under the traditional feeding system of Sindh, Pakistan[J]. *Livest Sci*, 2008, 118(1/2): 166-172.
- [20] HECK J M, van VALENBERG H J, DIJKSTRA J, et al. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition[J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(10): 4745-4755.
- [21] ALLORE H, OLTENACU P, ERB H. Effects of season, herd size, and geographic region on the composition and quality of milk in the northeast1[J]. *J Dairy Sci*, 1997, 80(11): 3040-3049.
- [22] PARK Y, JUÁREZ M, RAMOS M, et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk[J]. *Small Rumin Res*, 2007, 68(1/2): 88-113.
- [23] IVERSON J, SHEPPARD A. Detection of adulteration in cow, goat, and sheep cheeses utilizing gas-liquid chromatographic fatty acid data[J]. *J Dairy Sci*, 1989, 72(7): 1707-1712.
- [24] JAMROZIK J, SCHAEFFER L R. Estimates of genetic parameters for a test day model with random regressions for yield traits of first lactation Holsteins[J]. *J Dairy Sci*, 1997, 80(4): 762-770.
- [25] SCHOPEN G C, HECK J M, BOVENHUIS H, et al. Genetic parameters for major milk proteins in Dutch Holstein-Friesians[J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(3): 1182-1191.
- [26] BOBE G, BEITZ D C, FREEMAN A E, et al. Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates[J]. *J Dairy Sci*, 1999, 82(12): 2797-2804.
- [27] HECK J M, SCHENNINK A, van VALENBERG H J, et al. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk[J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(3): 1192-1202.
- [28] BERRY S D, LOPEZ-VILLALOBOS N, BEATTIE E M, et al. Mapping a quantitative trait locus for the concentration of beta-lactoglobulin in milk, and the effect of beta-lactoglobulin genetic variants on the composition of milk from Holstein-Friesian×Jersey crossbred cows[J]. *N Z Vet J*, 2010, 58(1): 1-5.
- [29] AULDIST M J, WALSH B J, THOMSON N A. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand[J]. *J Dairy Res*, 1998, 65(3): 401-411.
- [30] BOBE G, HIPPEA A R, SHE P, et al. Effects of glucagon infusions on protein and amino acid composition of milk from dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(1): 130-138.
- [31] LI Haimei, MA Ying, DONG Aijun, et al. Protein composition of yak milk[J]. *Dairy Sci Technol*, 2009, 90(1): 111-117.
- [32] CSAPÓ-KISS Z, STEFLER J, MARTIN T, et al. Composition of mares' colostrum and milk. Protein content, amino acid composition and contents of macro and micro-elements[J]. *Int Dairy J*, 1995, 5(4): 403-415.
- [33] de MARCHI M, BONFATTI V, CECCHINATO A, et al. Prediction of protein composition of individual cow milk using mid-infrared

- spectroscopy[J]. Ital J Anim Sci, 2010, 8(2): 399.
- [34] SANZ SAMPELAYO M, AMIGO L, ARES J, et al. The use of diets with different protein sources in lactating goats: composition of milk and its suitability for cheese production[J]. Small Rumin Res, 1998, 31(1): 37-43.
- [35] MOATSOU G, SAMOLADA M, PANAGIOTOU P, et al. Casein fraction of bulk milks from different caprine breeds[J]. Food Chem, 2004, 87(1): 75-81.
- [36] BROWN J R, LAW A J, KNIGHT C H. Changes in casein composition of goats' milk during the course of lactation: physiological inferences and technological implications[J]. J Dairy Res, 1995, 62(3): 431-439.
- [37] ASLAM M, JIMENEZ-FLORES R, KIM H Y, et al. Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins of bovine mammary gland secretions collected during the dry period[J]. J Dairy Sci, 1994, 77(6): 1529-1536.
- [38] HOLLAND J W, DEETH H C, ALEWOOD P F. Proteomic analysis of kappa-casein micro-heterogeneity[J]. Proteomics, 2004, 4(3): 743-752.
- [39] HOLLAND J W, DEETH H C, ALEWOOD P F. Analysis of O-glycosylation site occupancy in bovine kappa-casein glycoforms separated by two-dimensional gel electrophoresis[J]. Proteomics, 2005, 5(4): 990-1002.
- [40] HOLLAND J W, DEETH H C, ALEWOOD P F. Analysis of disulphide linkages in bovine kappa-casein oligomers using two-dimensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 2008, 29(11): 2402-2410.
- [41] YAMADA M, MURAKAMI K, WALLINGFORD J C, et al. Identification of low-abundance proteins of bovine colostrum and mature milk using two-dimensional electrophoresis followed by microsequencing and mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2002, 23(7/8): 1153-1160.
- [42] LINDMARK-MÅNSSON H, TIMGREN A, ALDÉN G, et al. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins and peptides in bovine milk[J]. Int Dairy J, 2005, 15(2): 111-121.
- [43] LE A, BARTON L D, SANDERS J T, et al. Exploration of bovine milk proteome in colostrum and mature whey using an ion-exchange approach[J]. J Proteome Res, 2010, 10(2): 692-704.
- [44] KUY S, KELLY V C, SMIT A M, et al. Proteomic analysis of whey and casein proteins in early milk from the marsupial *Trichosurus vulpecula*, the common brushtail possum[J]. Comp Biochem Physiol: Part D Genomics Proteomics, 2007, 2(2): 112-120.
- [45] D'AMBROSIO C, ARENA S, SALZANO A M, et al. A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens[J]. Proteomics, 2008, 8(17): 3657-3666.
- [46] MIRANDA G, MAHE M F, LEROUX C, et al. Proteomic tools to characterize the protein fraction of Equidae milk[J]. Proteomics, 2004, 4(8): 2496-2509.
- [47] D'AURIA E, AGOSTONI C, GIOVANNINI M, et al. Proteomic evaluation of milk from different mammalian species as a substitute for breast milk[J]. Acta Paediatr, 2005, 94(12): 1708-1713.
- [48] BRAMANTI E, SORTINO C, RASPI G. New chromatographic method for separation and determination of denatured alphaS1-, alphaS2-, beta- and kappa-caseins by hydrophobic interaction chromatography[J]. J Chromatogr A, 2002, 958(1/2): 157-166.
- [49] BONIZZI I, BUFFONI J N, FELIGINI M. Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(1): 165-168.
- [50] COZZOLINO R, PASSALACQUA S, SALEMI S, et al. Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2001, 36(9): 1031-1037.
- [51] COZZOLINO R, PASSALACQUA S, SALEMI S, et al. Identification of adulteration in water buffalo mozzarella and in ewe cheese by using whey proteins as biomarkers and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2002, 37(9): 985-991.
- [52] CHEN R, CHANG L, CHUNG Y, et al. Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18(10): 1167-1171.
- [53] SOMMA A, FERRANTI P, ADDEO F, et al. Peptidomic approach based on combined capillary isoelectric focusing and mass spectrometry for the characterization of the plasmin primary products from bovine and water buffalo [beta]-casein[J]. J Chromatogr A, 2008, 1192(2): 294-300.
- [54] GUARINO C, FUSELLI F, MANTIA A, et al. Peptidomic approach, based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, for detecting sheep's milk in goat's and cow's cheeses[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010, 24(6): 705-713.
- [55] FELIGINI M, BONIZZI I, BUFFONI J N, et al. Identification and quantification of alphaS1, alphaS2, beta, and kappa-caseins in water buffalo milk by reverse phase-high performance liquid chromatography and mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(7): 2988-2992.