

# 乳及乳制品蛋白质掺假检测研究进展

杨光<sup>1,2</sup>, 王加启<sup>1,\*</sup>, 卜登攀<sup>1</sup>, 哈斯额尔敦<sup>1</sup>, 刘庆生<sup>1</sup>, 孙鹏<sup>1</sup>, 刘开朗<sup>1</sup>, 雒秋江<sup>2</sup>

(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. 新疆农业大学动物营养实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052)

**摘要:** 阐述两类方法、一个原则: 乳及乳制品蛋白质掺假特异性检测方法和乳及乳制品蛋白质掺假非特异性检测方法; 任何一种乳品蛋白质掺假检测方法的建立都要以某一特定蛋白质差异性为依据的原则。

**关键词:** 乳制品; 蛋白质掺假; 特异性检测; 非特异性检测; 差异性

## Advances in Identification of Protein Adulteration in Milk and Dairy Products

YANG Guang<sup>1,2</sup>, WANG Jia-qi<sup>1,\*</sup>, BU Deng-pan<sup>1</sup>, Khas-Erdene<sup>1</sup>, LIU Qing-sheng<sup>1</sup>,  
SUN Peng<sup>1</sup>, LIU Kai-lang<sup>1</sup>, LUO Qiu-jiang<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Laboratory of Animal Nutrition, Xinjiang Agricultural University, Ürümqi 830052, China)

**Abstract:** Two methods with one principle for identifying protein adulteration in milk and dairy products have been summarized in this paper. Two methods were focused on specific and non-specific identification of protein adulteration in milk and dairy products. The main principle for establishing these detection methods was concentrated on the difference among specific proteins in adulterated milk and dairy products.

**Key words:** dairy products; protein adulteration; specific identification; non-specific identification; difference

中图分类号: TS252

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)09-0306-07

乳品掺假已成为困扰我国乳品工业发展的一个突出问题, 三聚氰胺事件将这个问题再一次激化, 给我国乳业带来一次空前沉重的打击。

掺假带来的非法利润驱使着掺假者不断提高和改变掺假手段, 以应对越来越先进的掺假检测技术。所以, 掺假检测技术的革新工作任重而道远。乳品蛋白质掺假检测是一项复杂且艰难的蛋白质鉴定与定量工作, 它既不同于蛋白质的提纯(从已知的混合物中提纯某一特定的蛋白质成分), 也不同于蛋白质的区别鉴定。因为掺假者不会提前告知他是否掺假或掺什么假, 而且掺假的蛋白往往都是某些蛋白质的混合物或者是蛋白质的变性物, 还有直接掺入非蛋白氮的。

本文综述了国内外各类乳品蛋白掺假检测方法的最新研究, 将种类繁多、方法各异的乳品蛋白质掺假检测统分为特异性检测和非特异性检测, 并从种类繁杂的检测方法中总结出一条规律性的原则, 即任何一种乳品蛋白质掺假检测方法的建立都要以某一特定蛋白质差异性为依据的原则, 旨在为后续的乳品蛋白掺假检测方法

研究提供参考。

### 1 乳及乳制品蛋白质掺假的特异性检测

乳品中特定蛋白质掺假检测就是要在已知的蛋白质组分中确定出某一个或一类假定掺假蛋白质成分是否存在及其含量, 为此必须找到掺假蛋白质与乳源蛋白质的差异性。而蛋白质之间的差异性有分子量的不同、分子结构的差异(包括一级和高级结构的差异)、带电性与量的不同、溶解度不同、等电点的不同、氨基酸组成的差异、蛋白质分子的抗原特异性不同等; 此外不同来源的蛋白质掺入也会引入其他一些特征性物质, 也可通过检测引入物间接检测掺假蛋白, 如动物蛋白中DNA、大豆蛋白中的皂角素等。目前的乳品蛋白质掺假检测方法基本上是基于这些蛋白质差异性建立起来的, 其涉及了色谱、质谱、免疫、PCR、电泳、光谱学、分析化学等技术领域。

1.1 利用蛋白质的氨基酸组成差异性检测牛奶中掺入的水解蛋白。

收稿日期: 2009-08-16

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-04-01)

作者简介: 杨光(1981—), 男, 硕士研究生, 主要从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: yang.guang413@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和牛奶质量改良研究。E-mail: wang-jia-qi@263.net

不同的蛋白质分子氨基酸组成比例不同,通过测定含量差别较大的某个或几个氨基酸或者特有氨基酸来区别不同的蛋白成分,即使蛋白质发生变性水解都不会影响测定。而利用氨基酸组成的差别检测牛奶蛋白中掺入的外源蛋白成分,并不像单一蛋白质的区别鉴定一样简单。首先,必须确定牛奶中内源蛋白组的总体氨基酸组成,而这个总体的氨基酸组成也是具有个体差异的。其次,掺入的外源蛋白在掺假乳总蛋白中所占的比例很小,大部分仍然是乳源蛋白,所以由于外源蛋白掺入导致的总体氨基酸组成的变化很小,难以检测。因此,可供牛奶蛋白质掺假检测的氨基酸必须是掺假蛋白质含量远高于乳蛋白,或者是掺假蛋白质特有的氨基酸。

1.1.1 利用特有氨基酸检测牛奶中掺入的水解蛋白

动物胶原水解蛋白为动物皮革毛发等下脚料经水解成可溶性肽链,其掺入牛奶中可提高乳蛋白的表观含量,但严重损害消费者的利益。

羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)是胶原蛋白所特有的氨基酸,在正常胶原蛋白中含量约为13.4%,在其他蛋白质中则不存在<sup>[1]</sup>。通过检测牛奶中羟脯氨酸的量,再换算成胶原水解蛋白的量,即可检测出牛奶中掺入的水解蛋白的含量。李景红等<sup>[2]</sup>与田艳玲<sup>[3]</sup>在浓盐酸的条件下,110℃水解6h,使胶原蛋白彻底变成游离的氨基酸,其中的羟脯氨酸也被释放出来。再用氨液-T氧化羟脯氨酸生成含吡咯环的物质,加入对-二甲氨基苯甲醛溶液显色,558nm波长处测吸光度,用标准曲线算得羟脯氨酸的质量浓度,羟脯氨酸的最小检出量为1.0mg/L。

1.1.2 利用多个特征氨基酸检测牛奶中掺入的水解蛋白

刘婷等<sup>[4]</sup>利用高效液相色谱离子交换色谱法寻找水解动物蛋白与乳粉蛋白组成差别较大的氨基酸,对乳粉和水解动物蛋白中的17种氨基酸进行了分离测定,筛选出6种含量差别较大的氨基酸;水解动物蛋白中的甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、谷氨酸、赖氨酸和亮氨酸占总氨基酸的含量比例分别为乳蛋白的16、4、6、1/2、1/2倍和1/3倍,乳粉中掺入水解动物蛋白会使前3种氨基酸含量比例升高、后3种氨基酸含量比例下降。依据此6种氨基酸建立乳粉中水解动物蛋白的半定量检测方法,

先将模拟掺假实验中所测定出的6种特征氨基酸占总氨基酸的含量比例列于表1。实际检测中,将检测到的6种氨基酸的含量比例与表1的数据对照,就可以半定量地检测出样品中水解动物蛋白的添加比例范围。

王竹等<sup>[5]</sup>为评价婴儿配方乳粉掺假的牛皮水解蛋白质对婴儿健康的潜在危险性时,对牛皮水解蛋白质的氨基酸进行评分。采用半定量方法对在阜阳抽检的60份婴儿配方乳粉中牛皮水解蛋白质的情况进行了检测与评估。结果与乳粉相比,牛皮水解蛋白质中甘氨酸含量高,含硫氨基酸等必需氨基酸含量普遍低。以FAO/WHO推荐的婴儿氨基酸模式为100,牛皮水解蛋白质氨基酸评分仅为19。

1.2 利用蛋白质的溶解性差异检测牛奶蛋白质掺假

蒋儒林等<sup>[6]</sup>用硝酸汞沉淀除去乳酪蛋白,但水解蛋白不会被除去,与饱和苦味酸(2,4,6-三硝基苯酚)产生沉淀反应:取100mL乳样,在水浴中加热浓缩到60mL,冷却至20℃取5mL乳样,加除蛋白试剂5mL混合均匀,过滤,取滤液约1mL,沿试管壁慢慢加入饱和苦味酸溶液约0.5mL形成环状接触面。结果:正常原乳滤液清亮,加苦味酸试剂后接触面无变化;掺水解蛋白的原乳,滤液呈半透明,略带乳青色,加苦味酸试剂后接触面呈白色环状。掺水解蛋白粉越多,滤液越不透明,白色沉淀越明显,最低检出量0.1g/100mL乳。

1.3 利用蛋白质的抗原特异性检测羊乳中掺入的牛乳

不同种属蛋白分子具有不同的分子结构,具有特异性的氨基酸序列片段常被作为特异性决定簇,被机体免疫系统识别并产生与之亲和的抗体。抗原抗体特异性结合是免疫学的核心理论,也是免疫测定的理论依据。目前,免疫方法检测乳品蛋白掺假主要集中在羊乳及其乳制品中掺入的廉价牛乳成分,方法主要是ELISA(enzyme linked immuno sorbent assay)法,其建立可分为以下3个步骤。

抗原的选择:抗原可以用牛乳清蛋白或酪蛋白,也可以是牛 $\alpha_1$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白等单一蛋白分子,也有选择牛IgG为抗原的(表2)。抗原选择的原则:1)抗原蛋白在牛乳中含量要较高而且稳定,这样可以提高定

表1 乳粉中添加不同比例水解动物蛋白的特征氨基酸占总氨基酸的比例

Table 1 Ratio between characteristic amino acids and total amino acids in milk powder with the addition of hydrolyzed animal proteins

名称	乳粉中水解动物蛋白的氨基酸添加比例/%										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
甘氨酸	1.91	9.83	15.31	19.36	22.48	24.96	26.98	28.65	30.08	31.26	32.30
丙氨酸	3.33	5.59	7.40	8.74	9.77	10.59	11.26	11.81	12.28	12.68	13.04
精氨酸	0.39	0.92	1.50	1.54	1.74	1.90	2.03	2.14	2.23	2.31	2.38
谷氨酸	19.60	18.20	16.61	15.44	14.53	13.81	13.22	12.74	12.33	11.98	11.68
赖氨酸	23.90	21.16	19.19	17.73	16.60	15.71	14.98	14.38	13.87	13.43	13.06
亮氨酸	8.57	7.01	6.05	5.33	4.78	4.35	4.00	3.70	3.45	3.24	3.06

表2 ELISA方法检测羊乳中的牛乳成分  
Table 2 Detection of cow milk in ewe milk by ELISA method

抗原	抗体	ELISA 类型	检测下限(体积分数%)	抗体专一性提高方法	参考文献
牛乳清蛋白	多克隆抗体(兔抗牛)	间接 ELISA	1	抗血清经过亲和色谱纯化 用生物素标记后 再经过羊乳清蛋白免疫吸附提高专一性	[7]
牛乳酪蛋白	多克隆抗体(兔抗牛)	间接 ELISA	1	抗血清经过亲和色谱纯化 用生物素标记后 再经过羊乳酪蛋白免疫吸附提高专一性	[8]
牛 $\alpha_1$ -酪蛋白	多克隆抗体(兔抗牛)	竞争 ELISA	0.15	将牛 $\alpha_1$ -酪蛋白的特异性片段与载体结合 构建高特异性抗原以提高对应抗体的专一性	[9]
牛 $\beta$ -酪蛋白	单克隆抗体(鼠抗牛)	竞争 ELISA	0.5	单克隆抗体的制备	[10]
牛 IgG	单克隆抗体(鼠抗牛)	竞争 ELISA	0.1	单克隆抗体的制备	[11]

量检测的准确性。2)抗原分子要具有很高的种属特异性决定簇。也就是牛源性抗原产生的抗体不会与其他种属抗原结合,只专一性结合牛乳中蛋白成分。一般选择单一蛋白分子做抗原比混合蛋白分子做抗原特异性强。因为牛和羊的种属差异较小,混合蛋白抗原大大提高交叉抗原出现的机率。García等<sup>[7]</sup>采用牛乳清蛋白做抗原和Rodríguez等<sup>[8]</sup>采用牛酪蛋白做抗原生产多克隆抗体,抗血清经一次亲和纯化制得的抗体的专一性很低。

抗体的制备:抗体制备分多克隆抗体和单克隆抗体的制备。一般单克隆抗体的专一性高于多克隆抗体。抗体的专一性越高,检测的可信度就越高。Anguita等<sup>[10]</sup>和Hurley等<sup>[11]</sup>制备的单克隆抗体专一性很强,不需要再用免疫吸附来提高专一性。多克隆抗体一般采用兔抗牛,单克隆抗体多采用鼠抗牛,也有使用羊抗牛多克隆抗体的,羊抗牛抗体最适合羊乳中牛乳的检测,因为羊的免疫系统对自身抗原免疫耐受,因此羊抗牛抗体不会交叉结合羊乳蛋白。Hurley等又建立了夹心ELISA检测羊乳中的牛IgG,就采用多克隆羊抗牛IgG为捕获抗体,方法具有非常高的专一性,最低检测限为体积分数0.01%。

ELISA方法的建立:将制备好的抗体和纯化抗原进行固相化或酶标记,建立合适ELISA方法进行检测。包括间接ELISA、间接竞争ELISA、夹心ELISA都可用于乳蛋白质掺假检测。

#### 1.4 利用蛋白质分子量和带电量的不同进行乳蛋白质掺假检测

蛋白质颗粒在各种介质中包括在聚丙烯酰胺凝胶电泳时,它的迁移率决定于它所带的净电荷以及分子大小和形状等因素<sup>[12]</sup>。

##### 1.4.1 利用SDS-PAGE检测牛奶中掺入的豆奶蛋白

在聚丙烯酰胺凝胶系统中加入阴离子去污剂十二烷基硫酸钠(SDS)和少量巯基乙醇,则蛋白质分子电泳迁移率主要取决于它的相对分子质量,而与原来所带电荷和分子形状无关。吴茹怡<sup>[13]</sup>利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)来检测牛奶中的豆奶成分。将牛奶和豆奶分别进行SDS-PAGE分析,从电泳谱图上可看到7条牛奶蛋白带和13条豆奶蛋白带。牛奶中掺入的豆奶体积分数达5%即可被检测到。

##### 1.4.2 毛细管电泳在乳蛋白质掺假检测上的应用

毛细管电泳统指以高压电场(10~50kV)为驱动力,以微内径管(一般内径为50 $\mu$ m,外径为300 $\mu$ m)为分离通道的电泳。电渗作用使溶液向负极流动,由于电渗流速度大于带电离子的电泳速度,故电泳方向与电渗方向相同的正离子迁移速度最快,中性分子居中,负离子迁移最慢,从而根据蛋白分子带电性与量的不同将其分离。

Cartoni等<sup>[14]</sup>利用毛细管区带电泳检测羊奶产品中掺入的牛乳成分。其中牛乳的定性和定量是依据乳中具有特异性乳清蛋白的存在。相对校准曲线被制定。该电泳使用甲基硅烷毛细管,以pH值为9.2的硼酸钠为背景电解质,检测峰具有很高的分辨率。牛乳的最小检出量在乳混合物中体积分数2%,在奶酪中体积分数为4%。个体遗传差异和可能的热处理会影响检测结果。

张东送等<sup>[15]</sup>在研究毛细管电泳在牛奶蛋白质掺假检测上的应用时,试图用毛细管电泳图谱的比对检测奶粉中掺入大豆粉;结果表明,乳中添加大豆蛋白检测时出现新的特征峰,而且大豆蛋白特征峰面积与添加量成正比。通过直接观察比对指纹图谱可检测到牛乳中掺入质量分数10%的大豆蛋白。

#### 1.5 利用不同的分子结构红外光吸收谱不同的特点检测乳粉中的三聚氰胺

1889年Angstrom首次证实红外吸收产生的根源是分子而不是原子,不久Julius第一次将分子的结构特征和光谱吸收峰的位置直接联系起来。红外吸收检测方法的建立成为可能。

Mauer等<sup>[16]</sup>获取了未掺杂的配方奶粉样本,并利用近红外和中红外光谱技术测量这些样本。红外激光束在样本上反射并进入了一个探测器,后者计算出激光的能量有多少被样本吸收,并建立对样本唯一的一个吸收谱。对纯三聚氰胺也收集了同样的数据。把这种配方奶粉与三聚氰胺混合然后进行分析,对新的谱和未掺杂的配方奶粉的谱进行了比较,结果显示了样本中的三聚氰胺的浓度。因为,三聚氰胺的结构与配方奶粉非常不同,因此可以在谱上看出差别,通过计算机软件程序分析谱线的差异可以检测到样品中百万分之一的三聚氰胺。

### 1.6 利用掺假时引入的其他特殊物质进行的间接检测

由于乳品蛋白质掺假时的引入物质往往不是蛋白质, 这样它与乳源蛋白质的差异程度就会更大, 更易于被区别鉴定, 而且引入物质往往不止一种, 可以筛选那些最易检测的物质作为特定掺假物的指示剂。所以引入物的检测大多可以不依赖于昂贵的仪器和复杂的处理过程, 这就为建立现场蛋白质掺假的快速检测方法提供理论依据。

#### 1.6.1 基于DNA的乳蛋白质掺假检测

蛋白质是由mRNA翻译合成, mRNA是由DNA转录合成, 天然蛋白质一般都会或多或少含有原有机体的遗传物质。乳中外源蛋白质的掺入会引入该外源有机体的种属特异性遗传物质, 可通过PCR扩增检测种属特异性DNA片段来间接检测外源蛋白。

López-Calleja等<sup>[17]</sup>使用PCR技术特异性检测绵羊和山羊乳中掺入的牛乳, PCR使用了针对线粒体中12S rRNA基因的引物以达到种属特异性。上游引物与一个保守DNA片段互补结合, 下游引物与牛的特异DNA片段结合, 这样就扩增出一个223bp的牛乳中DNA片段, 而绵羊和山羊的DNA片段不会得到扩增。这个技术被用在生鲜乳、巴氏杀菌乳和灭菌后的牛-绵羊和牛-山羊混合乳的检测, 它能够很好的检测出混合物中的牛乳, 具有灵敏的检测限体积分数0.1%。

López-Calleja等<sup>[18]</sup>使用PCR技术特异性检测绵羊乳中掺入的山羊乳, PCR使用了针对线粒体中12S rRNA基因的引物以达到种属特异性。这个山羊种属特异性引物的使用能扩增出一个122bp的山羊乳DNA片段, 而绵羊、母牛和水牛的DNA片段不会得到扩增。这个PCR分析技术被用在由山羊和绵羊二元混合的生鲜乳、高温处理乳的特异性检测上, 它能够很好的检测出混合物中的山羊乳, 最低检测限为体积分数0.1%。

Kotowicz等<sup>[19]</sup>采用双重PCR检测山羊乳中的牛乳, 该双重PCR使用两对能识别线粒体D环片段序列的引物。该PCR检测具有很高的特异性和灵敏性, 它能检测到羊奶中体积分数不到1%的牛奶成分。一对引物是特异性识别牛线粒体DNA片段, 另一对引物可识别山羊和牛的线粒体DNA片段以阻止假阴性的发生。

#### 1.6.2 利用皂角素的特异性反应检测牛乳中掺入的大豆蛋白

有些掺假者用廉价的豆浆掺入牛奶中, 以提高牛奶中蛋白含量, 而豆浆蛋白的掺入引入了易于检测的大豆中特有的皂角素, 可以通过向牛奶中加入醇醚混合液后, 再加入25%的氢氧化钠溶液。10min后若有黄色出现则证明牛奶中掺有豆浆<sup>[20]</sup>。此方法简单快速, 可以用于收奶现场掺假检测。

#### 1.6.3 利用肌酐的特异性反应检测生鲜乳中掺入的哺乳动物尿

掺尿原料奶中的肌酐(来自哺乳动物的尿)与碱性苦味酸作用, 生成红色的苦味酸肌酐复合物。取原料奶3mL, 加10%氢氧化钠4滴, 混匀, 加饱和苦味酸溶液(3g苦味酸溶于200mL蒸馏水)0.6mL; 放置5min后观察现象。黄色说明乳中不含尿, 红色表明乳中掺入尿液。其中, 该方法掺牛尿量越多, 显色愈快, 颜色愈深。该方法最低检出量为体积分数2%。此方法简单快速, 可以用于收奶现场掺假检测<sup>[6]</sup>。

#### 1.7 非蛋白含氮物质的特异性快速检测

非蛋白含氮物质不是蛋白质, 其物化性质与蛋白质有质的区别, 利用它们特有的蛋白质所不具备的性质一般都能将其简单快速灵敏地检测出来。

##### 1.7.1 铵盐的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-KI-NaClO显色体系法检测

在中性或碱性介质中, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>离子可与KI和NaClO溶液作用生成黑色NHL<sub>2</sub>沉淀, 其沉淀物多少与氨或铵离子的含量成正比。试剂: 称取25.0g固体KI加水溶解, 并定容到50mL配制成质量浓度为500g/L的KI溶液, 摇匀备用。称取5g固体NaOH试剂, 加水溶解, 冷却至室温, 并加水稀释到100mL, 配制成质量浓度为50g/L的NaOH溶液, 摇匀保存备用。NaClO原液商品安福替民, 有效氯(Cl)不少于10%。操作: 准确吸取待检奶样5mL于10mL具塞比色管中, 加入质量浓度为50g/L的KI试剂0.5mL, 混匀后沿着试管壁缓缓加入体积比为4:4:2的NaClO、H<sub>2</sub>O、NaOH混合液1.0mL, 并同时观察奶样与最后所加试剂两者界面处的颜色变化, 若出现棕灰至黑色浑浊, 表明样品掺有铵盐。最低检出限为16.82μg/mL乳。该法操作简便快捷, 灵敏度高, 显色效果好, 试剂配制方便容易保存, 易于在收奶现场推广应用<sup>[21-22]</sup>。

##### 1.7.2 亚硝酸盐的检测

在弱酸性条件下, 亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化, 再与-萘胺偶合形成紫红色染料。将0.1g-萘酚、0.2g-萘胺及0.6g对氨基苯磺酸溶于400mL 50%的冰醋酸中, 在棕色瓶中避光保存。取奶样2mL于试管中, 然后加入1.5mL上述配制试剂, 摇匀2min后, 观察现象。结果判定: 白色, 无亚硝酸盐; 微粉色, 含亚硝酸盐0.2mg/kg; 水粉色, 含亚硝酸盐0.3mg/kg; 粉红色, 含亚硝酸盐0.4mg/kg<sup>[23]</sup>。

##### 1.7.3 尿素的检测

尿素与亚硝酸盐在酸性溶液中发生反应生成二氧化碳气体逸出, 而亚硝酸盐可与格里斯试剂发生偶氮反应生成紫红色染料, 掺尿素就会影响该反应的发生。称取89g酒石酸、10g对氨基苯磺酸和1g-萘胺, 在研

钵中研细混匀制成格里斯试剂后,装入棕色瓶备用。取被检奶样 3mL 放入大试管中,加入 0.05% 的亚硝酸钠溶液 0.5mL,加入浓硫酸 1mL,将胶塞盖紧摇匀,待泡沫消失后向试管中加入约 0.1g 格里斯试剂,充分摇匀,待 25min 后观察结果。结果判定:紫红色不含尿素,不变色含尿素。本法灵敏度为 0.01g/100mL。因此被检奶样最少不能低于 2.5mL。本实验最好以正常牛奶作对照,其结果会更加准确<sup>[24]</sup>。

## 2 乳及乳制品蛋白质掺假的非特异性检测

国家制定的常规检验方法已不能满足越来越高明的掺假现状。现行的掺假检验研究,大多针对某假定的单一物质进行定性定量检测,要实现多个项目的检测操作繁琐,尤其是对可能出现的未知物将难以评判。乳及乳制品蛋白质掺假的非特异性检测是指不针对某假定的单一物质的乳蛋白质质量检测。

### 2.1 基于乳品中粗蛋白分析的非特异性检测

GB/T 5413.1—1997《婴儿配方和乳粉蛋白质的测定》<sup>[25]</sup>中规定的乳粉中蛋白质分析方法是用凯氏定氮法直接测定乳粉中粗蛋白含量。因为正常情况下,乳品中非蛋白氮含量在总氮中所占比例是基本稳定的,因此凯氏定氮法测定的结果基本能反映样品蛋白质含量水平。该方法测定结果能有效地筛查出因掺水等非含氮物质导致的蛋白营养成分不足量的掺假乳品。

由于凯氏定氮法实际上测定的是样品中氮元素的含量,一旦人为添加了非蛋白氮(NPN),该方法就表现出其局限性。陈婧等<sup>[26]</sup>利用凯氏定氮法测定掺加了水解蛋白的乳粉样品粗蛋白含量,其结果较原始值要高。添加水解蛋白中的氮 100% 被检出。可见水解蛋白对凯氏定氮法测定乳粉蛋白质含量有显著影响。

### 2.2 基于乳品中真蛋白分析的非特异性检测

因为凯氏定氮法有其局限性,现行国际标准 ISO 8968-5:2001/IDF 20-5:2001<sup>[27]</sup>采用三氯乙酸-凯氏定氮法来解决这个问题。先用三氯乙酸沉淀乳品中真蛋白,而非蛋白含氮物(尿素、甘氨酸、硝酸铵、亚硝酸钠和水解蛋白等)不会被沉淀,利用溶解性的不同将乳品中真蛋白与非蛋白含氮物分离,再用凯氏定氮法测定沉淀物中蛋白质含量,其结果即为乳品中真蛋白含量。这种检测能够有效地筛查出掺入非含氮物质和非蛋白含氮物质(尿素、甘氨酸、硝酸铵、亚硝酸钠和水解蛋白等)导致的蛋白营养成分不足量的掺假乳品。

然而,刘莹等<sup>[28]</sup>在研究添加三聚氰胺对液态乳中蛋白质含量测定方法的影响时,发现三氯乙酸-凯氏定氮法测定添加了三聚氰胺的液态奶中蛋白氮含量比理论值偏高,原因是由于三聚氰胺不溶于 15% 的三氯乙酸溶液,使得三聚氰胺在三氯乙酸作用下无法与液态乳蛋白

质分离。可见,三氯乙酸-凯氏定氮法的局限性在于其不适用于人为添加了不溶或微溶于三氯乙酸溶液的非蛋白含氮物质的乳品中的蛋白氮测定。

双缩脲分光光度法原理是:在碱性溶液中,蛋白质分子的肽键结构与  $\text{Cu}^{2+}$  结合,生成紫红色络合物,此络合物在 540nm 波长处有吸收峰,其颜色深浅与蛋白质浓度成正比而与蛋白质分子量及氨基酸组成无关<sup>[29]</sup>。所以双缩脲分光光度法可认为是肽键的特征性反应,而三聚氰胺中没有肽键,其不能与双缩脲试剂反应产生有色物质;但其缺陷是不能区分真蛋白与水解蛋白等小肽类非蛋白含氮物。

所以,NY/T 1678—2008《乳及乳制品中蛋白质的测定 双缩脲比色法》<sup>[30]</sup>建立了三氯乙酸沉淀与双缩脲反应相结合的乳及乳制品中蛋白质的测定方法。这样就大大扩展了基于乳品中真蛋白分析的非特异性检测适用性。刘莹等<sup>[28]</sup>的实验中采用三氯乙酸-双缩脲法测定添加了三聚氰胺、尿素、甘氨酸和水解蛋白的液态乳蛋白质,结果显示该法有效排除以上非蛋白含氮物对乳蛋白质测定的影响。

为了寻求尽可能简便、快捷的乳品真蛋白分析方法,中国农业大学食品科学与营养工程学院将现代信息技术与上述三氯乙酸-双缩脲法有机结合,用数字图像的信息采集方式替换分光光度比色的信息采集方式,建立了乳粉蛋白质数字图像检测方法(CCMP)<sup>[31]</sup>,其原理是根据经双缩脲显色反应后,乳品中真蛋白的含量与计算机的 RGB 表色系统中的 G 值存在良好的线性关系。CCMP 除了具有三氯乙酸-双缩脲法的优越性外,其可以同时完成多个样品的信息采集与分析;与分光光度计比色法相比,该法具有操作简便、结果准确、快速高效的优点,尤其适宜于流通领域中乳品质量的检测与评价<sup>[32]</sup>。

### 2.3 基于乳源蛋白质分析的非特异性检测

乳品中真蛋白的精确检测导致非蛋白含氮物的掺入已不能为掺假者赚取非法利润,这将使掺假者去寻找新的掺假物来取代非蛋白含氮物,这种物质要满足两个条件:一要廉价;二要能避开真蛋白检测。显然,廉价的外源真蛋白(非乳源性蛋白)必将会成为首选的掺假物。基于乳品中真蛋白分析的掺假检测并未区别乳源蛋白质和非乳源蛋白质,如果在乳品中掺入大豆蛋白等非乳源蛋白质,将导致检测的乳蛋白结果呈现虚高。

基于乳源蛋白质分析的非特异性检测是将牛奶本身含有的某一个蛋白质作内标,检测这个内标的含量或其在总蛋白中的比例以间接检测乳品中乳源蛋白质纯度,内源标记蛋白可以是乳酪蛋白和乳清蛋白,或更具体的蛋白分子。

乳中蛋白质的数量与种类繁多,结构复杂,天然

乳中各种蛋白质的含量与比例难以人为模拟,非蛋白质(水、糖、油脂、糊精、无机盐等)的掺入必然会引起蛋白质含量的降低,异源蛋白质(明胶、豆粉、水解蛋白)及奶源性乳清粉掺假必然会引起蛋白质组分的变化。通过对乳固有的总蛋白、乳酪蛋白和乳清蛋白质的种类、含量和相对比例的多指标分析检测,作为评价乳品质量的方法具有优越性<sup>[33]</sup>。

### 2.3.1 基于酪蛋白的检测方法

正常乳中酪蛋白占乳蛋白的质量比例一般会稳定在77%~78%左右,提出酪蛋白质量分数73%可以作为乳品掺假检验的定量指标<sup>[34]</sup>。

#### 2.3.1.1 等电点沉淀法测定酪蛋白含量

根据酪蛋白在等电点大量沉淀,得以分离并测其含量。邵锦震等<sup>[35]</sup>与张芳等<sup>[36]</sup>还专门研究了沉淀分离酪蛋白的pH值和温度条件,发现pH4.8、温度55℃时,酪蛋白得率最高。王丹慧等<sup>[37]</sup>通过向牛乳中加入乙酸-乙酸钠缓冲液调pH值到酪蛋白等电点(pI4.6),过滤去除牛乳中酪蛋白,再用凯氏定氮法测定去除酪蛋白前后的蛋白质含量,计算差值推算牛乳中酪蛋白含量,进而计算出酪蛋白在粗蛋白中的百分比。程涛等<sup>[29]</sup>通过pH4.6的HAc-NaAc缓冲液沉淀酪蛋白,经离心洗涤后,收集沉淀;然后用双缩脲法测定沉淀物中蛋白含量,即为酪蛋白含量。结果,此法测定牛乳中酪蛋白含量具有准确、快速、仪器简单和重现性好的优点。但此法不能排除与酪蛋白共沉淀的大豆蛋白的干扰,这也是沉淀法测酪蛋白的共同缺陷。

#### 2.3.1.2 毛细管电泳法测定酪蛋白占总蛋白的百分比

张东送等<sup>[15]</sup>利用毛细管区带电泳(CZE)测定牛乳中的酪蛋白含量,根据样品分离图谱,运用电泳仪自带的分析软件(32Karat Software),积分各峰面积,计算出酪蛋白占总蛋白比例,结果如表3所示。

表3 不同样品中酪蛋白占乳总蛋白的比例(n=20)

Table 3 Ratio between casein and total milk proteins in different samples (n=20)

样品	平均值/%	最大值/%	最小值/%	RSD/%
原料乳	82.9	85.6	77.3	7.8
巴氏乳	83.4	86.4	81.8	8.2
超高温乳	83.2	86.2	79.3	8.4

#### 2.3.1.3 免疫方法测酪蛋白含量

宋宏新等<sup>[38]</sup>将从干酪素中提取的牛 $\kappa$ -酪蛋白对新西兰白兔进行多次皮下免疫注射。采集血清并用硫酸铵沉淀法进行抗体纯化,以制备兔抗牛 $\kappa$ -酪蛋白的多克隆抗体。最后将纯化的抗体用于间接ELISA法检测牛乳 $\kappa$ -酪蛋白的含量。

### 2.3.2 基于乳清蛋白的检测方法

Miralles等<sup>[39]</sup>使用毛细管电泳(CE)、十二烷基磺酸钠毛细管电泳(SDS-CE)、四阶紫外分光法(UV-4th Der)3种方法测定生鲜乳(n=21)、巴氏杀菌乳(n=5)、UHT灭菌乳(n=18)的乳清蛋白与乳总蛋白比值,结果:生鲜乳分别为17.1%、18.5%和17.2%;巴氏杀菌乳分别为16.6%、17.7%、和18.8%;UHT灭菌乳分别为16.8%、17.0%和17.2%。结果表明,这种检测方法不受牛奶加工过程中热处理的影响。

Miralles等<sup>[40]</sup>还研究了乳蛋白的水解对乳清蛋白与乳总蛋白比值的影响。对储存0、2、4d的生鲜乳用毛细管电泳(CE)测定乳清蛋白和乳总蛋白比值,发现比值随储存时间而升高,主要是酪蛋白中的 $\beta$ -酪蛋白和 $\alpha$ -酪蛋白的快速降解导致。对储存0、30、60、90d的UHT灭菌乳进行检测,乳清蛋白与总蛋白的比值也随储存时间的推移而升高,但明显比生鲜乳升高的慢,因为灭菌后微生物数量减少,蛋白降解酶也减少。这个实验给出了乳蛋白质在保存过程中自身的变化规律的相关数据,为基于乳清蛋白检测提供依据。

## 3 结 语

乳制品蛋白掺假特异性检测和非特异性检测各有优缺点,二者相互补充。总的来说,特异性检测追求高精度性,可以定性、定量检测,但一次检测只针对某一种蛋白掺假物;而非特异性检测追求高效性,一次检测可筛查出某一类蛋白掺假物,但不能准确的定性和定量检测,误判率也较特异性检测高。乳品在整个流通过程中,前期应多采用非特异性检测,将大量具有明显掺假特征的生鲜乳销毁在进入流通领域之前(前期要适当放宽标准,防止误判)。后期多采用特异性检测,加工后的乳制品一般保质期较长,有充足的时间进行各种精确的特异性掺假检测,形成宽进严出的乳制品市场。

多肽链上各种氨基酸残基的排列顺序被称为蛋白质的一级结构,一级结构进而决定蛋白质的高级结构。结构的不同导致各种蛋白质具有千差万别的物理化学性质。结构和性质的差异一起构成了蛋白质之间的差异性。正是基于这些差异性才得以分离、区别、鉴定、认识各种蛋白质分子。乳品中蛋白质掺假物检测的实现同样离不开这些差异性,没有任何差异性作为检测依据的乳品蛋白掺假检测是不可能实现的。乳品蛋白掺假方法的建立一定要以某一特定的蛋白质差异性为依据。

### 参考文献:

[1] 桥本用久,郭晓风,邹胜祥.水产利用化学[M].北京:中国农业出版社,1994:50.

- [2] 李景红, 杨再山, 孟祥晨. 比色法检测乳中掺假的动物胶原水解蛋白[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(9): 50-57.
- [3] 田艳玲. 乳与乳制品中动物水解蛋白鉴定方法[J]. 中国食品添加剂, 2008(3): 145-147.
- [4] 刘婷, 姜金斗, 刘宁. HPLC-OPA 柱后衍生离子交换法对乳粉中掺假动物蛋白检测方法的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(7): 207-239.
- [5] 王竹, 杨月欣, 周瑞华, 等. 牛皮水解蛋白氨基酸评分及其危害分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(2): 108-111.
- [6] 蒋儒林, 张金丽. 关于原奶掺假提高脂肪和蛋白质含量的检验方法[J]. 乳品加工, 2005(3): 37-39.
- [7] GARCÍA T, MARTÍN R, RODRÍGUEZ E, et al. Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Dairy Sci, 1990, 73: 1489-1493.
- [8] RODRÍGUEZ E, MARTÍN R, GARCÍA T, et al. Detection of cows' milk in Ewes' milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. J Dairy Res, 1990, 57(2): 197-205.
- [9] ROLLAND M P, BITRI L, BESANCON P. Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine alpha s1-casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese[J]. J Dairy Res, 1993, 60(3): 413-420.
- [10] ANGUITA G, MARTÍN R, GARCÍA T, et al. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine beta-casein[J]. J Food Prot, 1997, 60(1): 64-66.
- [11] HURLEY P I, COLEMAN R C, IRELAND H E, et al. Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration[J]. J Dairy Sci, 2004, 87: 543-549.
- [12] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 297-298.
- [13] 吴茹怡. 牛奶掺假物检验方法研究[J]. 大众科技, 2005(9): 91-92.
- [14] CARTONI G, COCCIOLI F, JASIONOWSKA R, et al. Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 846(1/2): 135-141.
- [15] 张东送, 庞广昌, 高法国, 等. 毛细管电泳在牛乳中酪蛋白含量测定及掺假检测方面的应用[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 130-132.
- [16] MAUER L J, CHERNYSHOVA A A, HIATT A, et al. Melamine detection in infant formula powder using near- and mid-infrared spectroscopy [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57: 3974-3980.
- [17] LÓPEZ-CALLEJA I, GONZÓLEZ I, FAJARDO V, et al. Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique[J]. J Dairy Sci, 2004, 87(9): 2839-2845.
- [18] LÓPEZ-CALLEJA I, GONZÓLEZ I, FAJARDO V, et al. Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep' s milk with goats' milk[J]. J Dairy Sci, 2005, 88(9): 3115-3120.
- [19] KOTOWICZ M, ADAMCZYK E, BANIA J. Application of a duplex-PCR for detection of cows' milk in goats' milk[J]. Ann Agric Environ Med, 2007, 14(2): 215-218.
- [20] 左士菊. 牛奶中掺假物的鉴别[J]. 山东畜牧兽医, 2008, 29(2): 48.
- [21] 于琴, 董文宾, 赵旭博, 等. 鲜奶中铵盐快速检测新方法研究[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(8): 35-37.
- [22] 李海英, 闫斌斌, 姚新奎, 等. 牛奶中掺入铵盐的两种快速检测方法的比较研究[J]. 新疆农业科学, 2009, 46(2): 438-442.
- [23] 秦立虎, 韩起文, 孙武斌. 鲜奶掺假的快速检验技术[J]. 四川食品与发酵, 2005, 41(2): 56-61.
- [24] 姚俊卿, 丁伟. 牛奶中掺入尿素、白明胶等非电解质及病理乳的检验方法[J]. 中国畜牧兽医, 2005, 32(7): 19-20.
- [25] 中华人民共和国国家质量技术监督局. GB/T 5413.1—1997 婴幼儿配方和乳粉蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社.
- [26] 陈婧, 侯彩云, 牛巍, 等. 乳粉蛋白氮数字图像检测方法的研究[J]. 食品科技, 2007(9): 210-212.
- [27] BARBANO D M. ISO 8968-5:2001/ IDF 20-5:2001, Milk -determination of nitrogen content-part 4: determination of protein -nitrogen content [S]. American: The International Organization for Standardization and International Dairy Federation, 2001.
- [28] 刘莹, 傅泽田, 侯彩云, 等. 人为添加三聚氰胺液态乳中蛋白质含量测定方法的研究[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(2): 22-26.
- [29] 程涛, 孙艳波, 李健. 双缩脲法测定乳中酪蛋白含量[J]. 中国乳品工业, 2000, 28(3): 33-35.
- [30] 侯彩云, 王加启, 刘凤岩, 等. NY/T 1678—2008 乳及乳制品中蛋白质的测定双缩脲比色法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [31] 王旭, 孙建平, 陈婧, 等. 数字图像法在乳粉蛋白质检测中的应用研究[J]. 食品科技, 2006(10): 243-246.
- [32] 孙建平, 侯彩云, 常国华. 信息采集方式对蛋白质检测的影响与分析[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 179-182.
- [33] 宋宏新, 柏红梅, 薛海燕, 等. 基于乳源蛋白质分析的乳品质量检测技术探讨[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 298-301.
- [34] 李宏梁, 黄峻榕, 李红, 等. 酪蛋白质量分数作为乳品掺假检验指标的探讨[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(1): 52-62.
- [35] 邵锦震, 易理清, 等. 电沉淀分离酪蛋白方法的探讨[J]. 湖北师范学院学报, 2004, 24(1): 19-22.
- [36] 张芳, 李红旭. 影响牛乳酪蛋白分离因素的研究[J]. 保鲜与加工, 2006, 34(3): 29-31.
- [37] 王丹慧, 李梅, 刘卫星. 用改良方法检测牛乳中酪蛋白含量, 简单易行[J]. 食品安全导刊, 2008(2): 48.
- [38] 宋宏新, 韩燕, 孟静. 牛乳 - 酪蛋白检测的间接 ELISA 方法[J]. 食品科技, 2008(8): 213-215.
- [39] MIRALLES B, BARTOLOMB, AMIGO L, et al. Comparison of three methods to determine the whey protein to total protein ratio in milk[J]. J Dairy Sci, 2000, 83(12): 2759-2765.
- [40] MIRALLES B, RAMOS M, AMIGO L. Influence of proteolysis of milk on the whey protein to total protein ratio as determined by capillary electrophoresis[J]. J Dairy Sci, 2003, 86(9): 2813-2817.