



酪蛋白质量分数作为乳品掺假检验指标的探讨

李宏梁¹, 黄峻榕¹, 李红², 吴小勇², 刘树兴¹

(1. 陕西科技大学生命科学与工程学院, 西安 710021; 2. 咸阳市产品质量监督检验所, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 论述了我国乳品掺假的原因、方式和危害, 以及掺假鉴定的必要性和重要性, 分析了酪蛋白是牛乳中的特征性成分, 根据乳品中酪蛋白占乳蛋白的质量比例(即酪蛋白质量分数)一般会稳定在77%~78%左右, 提出了酪蛋白质量分数 $\geq 73\%$, 可以作为乳品掺假检验的定量指标, 探讨了国内外酪蛋白定量检测方法的研究现状。结果表明, 等电点沉淀法无疑是一种适合我国国情的、操作简单的酪蛋白检验方法, 对防治乳品掺假具有重要的现实意义, 并通过分析提出了该检验方法所需研究的内容。

关键词: 牛乳; 掺假; 酪蛋白; 等电点沉淀法; 检验

中图分类号: TS252.7 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-2230(2008)01-0052-03

Discussion on mass fraction of casein as an index for adulteration testing in milk and milk products

LI Hong-liang¹, HUANG Jun-rong¹, LI Hong², WU Xiao-yong², LIU Shu-xing¹

(1. College of Life Science & Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China; 2. Xianyang Institute of Supervision & Testing on Product Quality, Xianyang 712000, China)

Abstract: The causes, manners and hazards of adulteration in milk and milk products in China, and essentiality and importance of adulteration assessment, were described and discussed. It is well known that casein is a characteristic component of milk. The mass proportion of casein in milk proteins, namely Mass Fraction of Casein, is generally within the range of 77%~78%. Therefore, Mass Fraction of Casein(g/g protein)($\geq 73\%$), may become a quantitative index for adulteration testing in milk and milk products. The research status of the quantitative testing methods of casein at home and abroad was discussed. The results showed that isoelectric precipitation was a reliable method for casein testing fitting to Chinese status and having a simple operation which have important realism significance for preventing adulteration in milk and milk products. The study contents about this testing method had been put forward through analysis.

Key words: milk; adulteration; casein; isoelectric precipitation; testing

0 引言

乳品掺假已成为困扰我国乳品工业发展的一个突出问题。2007年4月11日, 中央电视台“焦点访谈”栏目曝光了陕西省杨凌部分奶站在原奶中的掺杂使假。乳品掺假的主要方法为: 用低成本的蛋白和脂肪原料, 代替牛乳中的乳蛋白和乳脂肪, 从而降低成本, 获得高额利润。在我国乳品相关产品标准中, 一般都规定了营养成分乳蛋白和乳脂肪的含量及检验方法, 但是没有验证营养成分是否掺假的指标和检验方法, 因此为了防止乳品营养成分掺假欺诈行为的发生, 为了防止消费

者受欺骗, 为了乳品企业免受不正当竞争的威胁, 为了方便国家技术监督检验部门依法进行乳品掺假鉴定, 为了保证我国乳牛养殖业和乳品加工业健康持续发展, 政府急需制定乳品掺假鉴定的指标和检验方法。

1 酪蛋白是牛乳中的特征性成分

牛乳最主要的成分是水(约为87.5%), 其余的主要成分还有乳脂肪、乳蛋白和乳糖, 以及微量的无机盐、非蛋白氮化合物和维生素, 乳及相关制品的平均组分如表1所示^[1]。尽管牛乳的组分会因饲养方式、乳牛品种、泌乳期及气温等因素的影响而发生一定的变化, 但由于绝大部分商品乳是来自不同乳牛的混合牛乳, 各种因素平均后差异就会减少, 因此牛乳的平均组分变化不大^[1,2]。由表1可以看出, 在4种乳品中酪蛋白占乳蛋白的质量分数稳定在77%~78%左右。

收稿日期: 2007-06-26

基金项目: 陕西科技大学自然科学基金项目(ZX07-18)。

作者简介: 李宏梁(1967-), 男, 副教授, 研究方向为食品安全和乳制品加工。

表1 乳及相关制品的平均组分 %

组分	全脂乳	脱脂乳	酪乳	稀奶油(含脂40%)
乳脂肪	3.82	0.06	0.50	40.0
乳蛋白(6.38N)	3.25	3.35	3.35	2.00
酪蛋白	2.50	2.60	2.60	1.56
乳清蛋白	0.60	0.62	0.62	0.37
乳糖	4.80	4.95	4.95	2.90
无机盐	0.70	0.73	0.73	0.44
水分	87.4	91.0	90.5	54.6
酪蛋白	77	78	78	78

注:均为质量分数

乳蛋白主要分为酪蛋白和乳清蛋白两大类,通常的定义是:在pH值为4.6时从牛乳中沉淀的蛋白质称为酪蛋白;在同样条件下不沉淀的称为乳清蛋白。牛乳所含有的蛋白总量大约为3.3%,其中2.5%左右是酪蛋白,0.6%是乳清蛋白,剩余的0.2%为一些含氮化合物,属于非蛋白氮^[1]。

酪蛋白是一类磷酸蛋白,占牛乳真蛋白的80%左右,它主要以5种形式存在: α_1 -酪蛋白、 α_2 -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白和 γ -酪蛋白,它们分别占酪蛋白总量的38%,10%,36%,13%和3%^[1]。酪蛋白通过酸化和凝乳作用会沉淀或凝固。乳中主要的乳清蛋白有 β -乳球蛋白、 α -乳球蛋白、血清白蛋白、免疫球蛋白和脐脐,它们分别占乳清蛋白总量的50%,20%,6%,12%和12%^[1]。乳清蛋白不会因为酸化和凝乳作用而沉淀。牛乳蛋白质包括6种特异性蛋白,其中有4种酪蛋白: α_1 -酪蛋白、 α_2 -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白;两种乳清蛋白: β -乳球蛋白和 α -乳球蛋白^[1]。

按照人类所需的营养,乳中最有价值的成分是蛋白质,乳蛋白提供的氨基酸比例相当平衡,在评价食物蛋白质质量时,酪蛋白通常被作为参照蛋白质来对照。乳和乳制品提供的蛋白质占世界人口蛋白消费总量的20%左右^[1]。

综上所述,酪蛋白可以作为牛乳中特征性成分进行检测。

2 掺假鉴定的最有效方法

在乳品中掺入廉价的组分,也被称作经济掺假,通常不会对消费者的健康产生危害。但是也有例外,如消费者有可能会对掺入绵羊乳或山羊乳的牛乳或乳清过敏。因此,大多数国家都已制定了相应的法律条例来保护消费者的利益和规范公平的市场交易行为^[2]。我国GB7718《预包装食品标签通则》规定,食品的包装标签必须能明确地告诉消费者产品的成分,对在食品标签上有欺骗性行为的生产者,将可以对其进行法律制裁。通常,乳品的掺假方式至少包括下列其中一类^[3]:

(1)不符合法律要求的产品标准。特定乳产品(乳

油、干酪、酸乳等)中最大/最低水分,非脂乳固体,脂肪含量地域差异。(2)错误地在乳中掺入其他乳成分或非乳成分,如:掺水,掺入其他乳,掺入非乳蛋白,改变酪蛋白/乳清蛋白比率,在乳粉中加入乳油或乳清粉,在乳脂中加入植物油脂或动物脂肪,在液态乳中添加还原乳,添加不合标准的防腐剂。(3)非标准工艺,如热处理、干酪成熟、膜技术^[3]。

在乳品掺假过程中,如果产品进行了乳脂肪替代品掺假,为了使产品成分标准化,相应必须要进行乳蛋白替代品掺假,反之亦然。因此,只要能够检测乳品是否存在乳蛋白掺假问题,基本上就能判定乳品是否存在营养成分掺假问题。非乳成分掺假主要会使以下3种检验指标发生变化:脂肪/蛋白质比率,蛋白质含量,酪蛋白质量分数,对于前两个指标,常规的脂肪和蛋白质检验指标能够保证产品的真实可靠性,由于酪蛋白是特征性乳蛋白,价值大,掺假者进行酪蛋白掺假一般会得不偿失,因此只要进行酪蛋白质量分数检测,就能判断是否存在非乳成分掺假。

针对现阶段我国乳品掺假的现状,可以将酪蛋白质量分数作为一项强制检验指标进行掺假检验,可以通过测定大量的乳品,并根据测定结果建立一组样品数据库,根据被测原料或产品的酪蛋白质量分数数据与样品数据库数据进行比较,判定原料或产品是否存在掺假以及判定掺假的大小。乳是一种非常复杂的理化体系,每一种成分都很重要,均需保证其未掺假。明确的划分掺假乳和未掺假乳在鉴定技术上是比较困难的,因此,不能制定十分严格的标准来判定乳制品中是否掺假,不然就有可能出现误判^[3]。通过从经济和名誉两方面对非乳蛋白掺假结果进行权衡,不难发现低于5%的非乳蛋白掺假结果是得不偿失的,又由于乳品中酪蛋白质量分数一般会稳定在77%~78%左右。因此,从理论上讲,可以将酪蛋白质量分数 $\geq 73\%$,作为乳品掺假检验的定量指标。

酪蛋白质量分数检验指标的设立,能够有效地鉴定并遏制乳品中添加水、蔗糖、葡萄糖、麦芽糊精类物质、淀粉、豆浆、面粉类物质、棕榈油、油脂粉、植脂末类物质、乳清粉、明胶、水解动物蛋白粉、尿、尿素等非乳成分,其缺陷是无法判定是否掺入其他乳,以及为延长产品保质期,而加入原料中的碱、抗生素、双氧水、不合标准的防腐剂等对人体健康有危害的物质。

针对巨大利益驱使下的乳品掺假,在复杂的乳品成分中设立酪蛋白质量分数检验指标,用来指示乳品是否掺假,并建立一种易于掌握、能广为接受的快速定量检验方法,无疑是乳品掺假鉴定的最有效方法。

3 酪蛋白定量检测方法的研究现状

国外有关酪蛋白检测方法的报道很多,包括大量的电泳法、色谱层析法、免疫化学法、极谱法等定量分

析法^[9]。国内文献也发表了有关酪蛋白检测的许多研究报道,有等电点沉淀法^[4-7]、双缩脲检测法^[8]、毛细管电泳法^[9]、酶联免疫吸附^[10]等许多方法。它们各有优缺点,等电点沉淀的是粗酪蛋白,但方法简单,易于操作;双缩脲法能够更精确的定量检测等电点沉淀的粗酪蛋白,测定过程相对繁琐;而层析法和电泳法能够精确鉴定非乳成分掺假,甚至能进行不同种类乳的掺假检测^[9],但是其所需仪器设备昂贵,操作复杂,而且操作时需要专门的技术人员,不适合中小型奶站^[9,10];现在有一些大型的乳品企业采用Foss120乳成分分析仪来控制原料奶质量,该仪器检测快速,平均两分钟即可出结果,而且可以同时检测多项指标,如蛋白质含量、乳脂率、冰点、酸度等,但是这种仪器一台就需三十多万元,这是中小企业无力承担的,而且需要专门人员检测和维护^[10],并且该仪器不能检测酪蛋白含量,不能鉴别高级掺假;酶联免疫吸附法(ELISA)具有专一、灵敏、准确的特点,不需要特殊的仪器设备,操作也较为简便,而且能够同时对几十个甚至上百个样品进行检测,不仅适合于中小企业,也适合于原料乳的现场快速检测^[10],但是该方法属于半定量检测方法,只有当商业上可以获得免疫法所需的特异性抗体的时候,这项技术才可能得到常规应用,其所需的快速检测试剂盒在我国还处于研发阶段,没有工业化生产,现在还无法实际推广。

有关等电点沉淀法的国内研究报道包括:杨丹毅等^[9]研究了鉴别奶粉与乳清粉的方法;程涛等^[8]研究了双缩脲法测定乳中酪蛋白含量的方法;陈忠平^[7]、邵锦震等^[10]研究了酪蛋白的分离方法。

张芳等^[10]研究了不同温度、pH值及搅拌强度对牛乳中酪蛋白得率的影响。试验结果表明,温度控制在55℃(pH值为4.6)时,酪蛋白得率最高为2.55 g/100 mL;pH值为4.6~4.8时酪蛋白分离效果最好;边滴加酸边缓慢搅拌酪蛋白得率较高。

综上所述,不难看出,在我国现阶段下,等电沉淀法是适合我国国情的一种酪蛋白定量检测方法,其所用仪器简单,主要包括离心机(3000 r/min),恒温水浴锅,酸度计,布氏漏斗,真空抽滤机,电热干燥箱,电子天平等,这些条件是每个通过QS认证的乳制品企业已基本具备的实验室条件,其检验方法容易推广。

4 等电点沉淀检测方法

等电点沉淀法检测酪蛋白质量分数的试验方法包括下面3个步骤:①按照GB/T 5009.5规定的检验方法测定乳品中的蛋白质含量 $M_1(\text{g/g})$;②按照等电点沉淀法测定乳品中的酪蛋白含量 $M_2(\text{g/g})$;③计算乳品中的酪蛋白质量分数:酪蛋白质量分数 $(\text{g/g蛋白质})=M_2/M_1 \times 100\%$ 。

国家标准GB/T 5009.5是《食品中蛋白质的测定》

规定的检验方法,由于其采用常规的凯氏定氮法,测定的总蛋白含量比较精确可靠。

等电点沉淀法测定乳品中的酪蛋白含量的试验方法拟采取以下步骤:①样品准备:若样品为液态的牛奶或乳制品,直接称取样品100 g;若样品为粉状的奶粉或还原奶,称取样品10 g,然后用蒸馏水定溶到100 mL。②加酸调pH值为4.8。③离心15 min(3000r/min),弃上清液,得到粗品酪蛋白。④水洗三次,每次离心10min(3000r/min),弃上清液。⑤用无水乙醇洗沉淀一次,抽滤;再用乙醇-乙醚(体积比为1:1)洗两次,分别抽滤;然后用乙醚洗两次,分别抽滤。⑥80℃烘干沉淀物至恒重,用天平称量所得纯品酪蛋白。针对上述步骤,还需开展以下方面的研究工作。

①采用样品液首先直接离心(3000 r/min)分离稀奶油,再进行加酸沉淀,会对测定结果有何影响;②加酸调pH值对测定结果的影响包括哪些因素?需要做验证试验;③洗涤的方式和次数对测定结果有何影响?需要做对比试验;④添加非乳成分对测定结果有何影响?需要做对比试验;⑤在确定了检验方法的基础上,需要对市场上大量的乳品进行酪蛋白质量分数的检验,并根据检验结果建立一组样品数据库,用于验证检验指标和检验方法的可行性;⑥利用该方法作鲜奶掺假现场鉴定时,能否通过试管中加酸后的絮凝沉淀量进行合格判断。

5 结束语

通过对酪蛋白质量分数作为乳品掺假检验指标及其检验方法的探讨,表明了等电点沉淀法无疑是一种适合我国国情的、操作简单的酪蛋白检验方法。有了针对乳品掺假的酪蛋白定量检验方法,以及其他的常规检验方法,加上技术监督部门对企业的现场监管,相信一定能解决好我国现阶段较严重的乳品掺假问题。

参考文献:

- [1] RANKEN M D, KILL R C, BAKER C G J. 食品工业手册 [M]. 张懿等译.第24版.北京:中国轻工业出版社,2002:88-91.
- [2] NORMAN N P, JOSEPH H H. 食品科学[M]. 王璋,钟芳等译.第5版.北京:中国轻工业出版社,2001:251.
- [3] GERRIT S. 现代乳品加工与质量控制[M]. 任发政,韩北忠,罗永康,等译.北京:中国农业出版社,2006:16,200-212.
- [4] 邵锦震,易理清.等电沉淀分离酪蛋白方法的探讨—兼对黄石市场鲜牛奶质量分析[J].湖北师范学院学报(自然科学版),2004,24(1):19-22.
- [5] 杨丹毅,林志斌,罗玉玮.酪蛋白等电点沉淀法快速鉴别奶粉和乳清粉[J].珠海检验检疫科学,1999,9(6):38-39.
- [6] 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.

(下转第62页)

2.6 共存物质的干扰

四环素及其降解产物与金属离子有很强的络合性,产生有色络合物,从而在四环素的测定过程中产生干扰。本研究在最佳测定条件下,当TC质量浓度为500 $\mu\text{g/L}$,相对误差为 $\pm 5.00\%$ 时,考察了牛奶中下列常见金属离子对TC测定的最大允许倍数: Fe^{3+} (4.9×10^5), Ca^{2+} (1.8×10^5), Mg^{2+} (3.6×10^4), Zn^{2+} (1.94×10^3), K^{+} (6.5×10^7), Cu^{2+} (10), Cl^{-} (4.83×10^3 , 6.64×10^3)。此允许倍数均大于其在牛奶中的浓度值,因此可以预期本法用于牛奶测定时,常见的金属离子不产生干扰。

2.7 样品分析

牛乳是一种复杂的生物样品,在分析测定前必须经过除蛋白、脱脂处理。重金属盐和一些有机溶剂乙腈、甲醇、乙醇是牛乳中抗生素常用的提取溶剂,参考文献^[3]的提取方法,建立了乙腈脱蛋白、正己烷脱脂的方法。由于TC在生物样品中易与蛋白质强烈结合。因此,须用强酸或酸性脱蛋白剂从生物样品中提取,然而在 $\text{pH} < 2.0$ 的强酸性条件下,TC可降解为脱水四环素^[4],故本研究选择乙酸盐缓冲液(pH 值为4.0)—乙腈混合溶液脱蛋白,从而提高了TC的回收率。

表1 加标样品的回收率($n=3$)

序号	加入量 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收量 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD /%	回收率 /%	RSD /%
1	100.00	86.72	3.73	86.72	3.73
2	500.00	450.32	2.09	90.06	2.09
3	1 000.00	850.46	3.18	85.04	3.18
4	1 500.00	1 283.78	4.25	85.58	4.25
5	2 000.00	1 691.24	2.53	84.56	2.53

应用本法对市售超高温灭菌处理的袋装乳样品进行了测定,未检出残留的TC。对样品进行了5个浓度水平的加标回收率测试,结果如表1所示。由于牛奶

样品中未沉淀完全的酪蛋白和水溶性的B族维生素可能对四环素的提取、测定产生一定的干扰,故平均回收率为86.39,但由于本法的检出限很低,不会影响到对实际样品的检出要求。

3 结论

采用荧光分光光度法测定了牛奶中四环素的残留,牛奶中的四环素经碱解,并用CTAB增敏,线性动态范围为50~2500 $\mu\text{g/L}$,检出限2.06 $\mu\text{g/L}$,样品加标回收率为84.56%~90.06%。该方法具有灵敏度高,选择性好,能快速、简便的测定出牛奶中四环素的含量。

参考文献:

- [1] 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002: 365-368.
- [2] 朱坚,王国全,陈正夫,等. 食品中危害残留物的现代分析技术[M]. 上海:同济大学出版社,2003: 129-148.
- [3] 田益玲,贾英民,祝彦忠,等. 牛乳中四环素和氯霉素残留的快速测定方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(4): 423-424.
- [4] 黎朝,王尊本. 四环素化学发光分析法研究[J]. 厦门大学学报, 1999, 36(5): 805-811.
- [5] CARSON M C, BRESLYN W L. Simultaneous Determination of Multiple Tetracycline Residues in Milk by Metal Chelate Affinity Chromatography: Collaborative Study [J]. AOAC Int, 1996, 79 (1): 291.
- [6] CHAO L C, XUELIN G. Determination of Tetracycline Residues in Bovine Milk, Serum, and Urine by Capillary Electrophoresis [J]. J AOAC Int, 1995, 78 (6): 1369 - 1377.
- [7] 查建莲,林颖,杨星惠,等. 十六烷基三甲基溴化铵对脱水四环素和异四环素荧光增强作用研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2002, 22(3): 430-432.
- [8] 中华人民共和国农业部. 动物性食品兽药残留限量[EB/OL]. (2002). <http://www.agri.gov.cn/>.

(上接第54页)

- [7] 陈忠平. 牛奶中酪蛋白和乳糖的分离 [J]. 安徽技术师范学院学报, 2001, 15(4): 58-59.
- [8] 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.

- [9] 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, 30(1): 130-132.
- [10] 张涛,庞广昌. 酶联免疫法快速测定原料乳中 α_1 -酪蛋白质量浓度[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(2): 56-58.