

牛羊乳混掺检测鉴别技术研究进展

张晓旭¹, 葛武鹏^{1*}, 李宝宝¹, 杨静², 耿伟³, 袁亚娟³

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100; 2. 陕西杨凌质量技术监督局, 杨凌 712100;
3. 陕西咸阳质量技术监督局, 咸阳 712000)

摘要:近年来,羊乳以其较好的营养特性渐成流行趋势,由于季节波动的影响,其价格远高于牛乳。在经济利益的驱动下,羊乳中掺入牛乳的现象时有发生,且呈现日趋严重的趋势,制约了羊奶产业的良性发展,迫切需要建立快速准确的牛羊乳混掺定性定量检测技术体系。本文对牛羊乳的差异及据此建立的、业已报道的相关检测技术进行了比较分析。常用检测技术主要包括色谱技术(气相色谱、气相色谱-质谱联用、高效液相色谱-质谱联用、高效液相色谱)、电泳技术(聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点聚焦电泳、毛细管电泳)、酶联免疫技术、聚合酶链式反应技术等,介绍了各种检测技术的原理及特点,并分析其可行性,为探索新的高效检测方法提供了思路,为牛羊乳混掺检测分析提供文献参考。

关键词:羊乳;牛乳;混掺

Research advance in detection and identification of the adulteration of goat milk with cow milk

ZHANG Xiao-Xu¹, GE Wu-Peng^{1*}, LI Bao-Bao¹, YANG Jing², GENG Wei³, YUAN Ya-Juan³

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Yangling Bureau of Quality and Technical Supervision, Yangling 712100, China; 3. Institution of Inspection of Xianyang Bureau of Quality and Technical Supervision, Xianyang 712000, China)

ABSTRACT: In recent years, goat milk has gradually become the popular trend for its good nutritional properties. Due to seasonal fluctuations, the price of goat milk is much higher than cow milk. Driven by economic interests, the adulteration of goat milk with cow milk occurred, and seriously hampered the development of goat milk industry. So a rapid and accurate quantitative detection method for adulteration needs to be established. In this paper, the differences between goat milk and cow milk were analyzed, and the correlation detection techniques were compared. Analytical techniques mainly included chromatography (gas chromatography, gas chromatography-mass spectrometry, high performance liquid chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography), electrophoresis technology (polyacrylamide gelelectrophoresis, isoelectric focusing electrophoresis and capillary electrophoresis), enzyme-linked immunoassay, polymerase chain reaction technique and so on. The principle and characteristics of a variety of detection technologies were discussed and the feasibilities were analyzed, which would provide references for establishing a feasible and efficient detection method.

基金项目: 陕西省战略新兴产业重大产品项目(2015KTCQ03-08)

Fund: Supported by the Major Product Program of Emerging Industries of Strategic Importance of Shaanxi Province (2015KTCQ03-08)

*通讯作者: 葛武鹏, 博士, 副教授, 主要研究方向为乳制品科学及生物技术。E-mail: josephge@sina.com

*Corresponding author: GE Wu-Peng, Associate Professor, College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, NO.28, Xinning Road, Yangling 712100, China. E-mail: josephge@sina.com

KEY WORDS: goat milk; cow milk; adulteration

1 引言

羊乳在婴幼儿食品中优势明显, 具有营养丰富、易消化吸收、不易导致过敏等诸多优点。随着人们对羊乳认知水平的提高, 相关产品的流行已渐成趋势, 业已成为增长势头强劲的乳中新秀。现代营养学的相关研究表明, 羊乳中干物质含量比牛乳高约 10%, 比母乳高约 5%。羊乳从营养成分组成及基础结构、各营养元素配比到营养特性都与母乳最为接近^[1]。国内外专家经长期对比发现, 羊乳喂养的婴儿身高、体重、骨密度都优于同期牛乳喂养的婴儿, 其身体成长、智力发育更迅速、更健康^[2,3]。羊乳中蛋白质凝块细而软, 脂肪颗粒较小, 利于消化吸收, 人体对羊乳的吸收率高达 94% 以上^[4,5]。此外, 羊乳的蛋白质结构不同于牛乳, 因此, 被营养学家推荐为牛乳过敏人群的最佳替代乳品^[6,7]。西方一些营养学家称羊乳是一种天然抗生素, 常喝羊乳病不沾身, 体力充沛, 面色红润^[8,9]。

目前, 市场上羊乳产品种类越来越多, 由以前单一的鲜羊奶发展到羊奶粉制品、液态羊奶制品、果味羊奶、羊奶酪、羊奶片及化妆品羊奶脂等^[10]。羊乳的生产加工与销售在国际市场上也日渐风靡, 羊乳制品在欧美和澳大利亚等国家已成为人们生活中必不可少的食品, 其市场占有率高达 80%^[11,12]。乳羊是典型的短日照季节性繁殖动物, 3~10 月为其产奶期, 且一头乳羊的日产乳量远低于牛乳, 仅为 5 公斤左右, 因此羊乳价格远高于牛乳^[13,14]。在经济利益的驱动下, 一些不法商贩和企业在羊乳中掺入牛乳以降低成本, 牟取暴利。由于牛羊乳性质相似, 在羊乳中掺入一定量的牛乳很难从感官及常规指标上检测出来。这些掺假行为让消费者对本国产品失去信心, 让政府相关部门对食品安全更难把控, 从而也给正在高速发展的羊乳产业带来了沉重打击。为了保障羊乳及其产品品质, 确保生产厂家及消费者的利益, 建立快速准确检测牛羊乳混掺的技术体系越来越重要。本文对牛羊乳组成差异进行了比较, 并对国内外据此建立的牛羊乳混掺检测技术进行了综述。

2 牛羊乳组成差异及鉴别

羊乳中含有 200 多种营养物质和生物活性因子, 其蛋白质、矿物质和维生素的总含量均高于牛乳。羊乳中乳固体含量、脂肪含量和蛋白质含量比牛乳高约 5%~10%。羊乳 pH 约为 7.0 左右, 酸度为 12~15°T, 而牛乳略偏酸性, 其 pH 为 6.6~6.8, 酸度为 17~18°T, 所以对于胃溃疡患者及胃酸分泌过多的人来说, 羊乳是一种有保健治疗作用的饮品^[15]。羊乳与牛乳基本组成差异见表 1^[16,17]。

表 1 羊乳与牛乳成分比较

Table 1 Comparison of goat and cow milk composition

营养成分	羊乳	牛乳
比重(20 °C/4 °C) ^[16]	1.027	1.031
干物质(%) ^[16]	14.36	10.48
脂肪(%) ^[17]	3.80	3.60
蛋白质(%) ^[17]	3.50	3.30
乳糖(%) ^[16]	4.12	4.94
灰分(%) ^[17]	0.80	0.70

2.1 蛋白质种类及含量差异

Ceballos 等^[18]在相同条件下研究了牛羊乳的化学组成, 得出羊乳中蛋白质含量高于牛乳, 主要蛋白质种类与牛乳相似。Recio 等^[19]研究认为, 羊乳酪蛋白等电点为 4.1, 而牛乳酪蛋白等电点为 4.6, 牛乳和羊乳在其各自等电点所测得的酪蛋白含量相近, 但牛乳中 α -酪蛋白的含量较多, 而羊乳中 β -酪蛋白的含量较多。羊乳与牛乳中蛋白质种类及含量见表 2^[20]。已有报道显示, 根据牛羊乳中蛋白质种类和含量的差异, 可以牛乳中 α_{S1} -酪蛋白, 羊乳中 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白等作为检测指标, 定量定性分析牛羊乳混掺的比例^[21]。

表 2 羊乳与牛乳中蛋白质种类及含量^[20]

Table 2 Species and content of goat and cow milk protein^[20]

种类	羊乳(g/100 g 蛋白质)	牛乳(g/100 g 蛋白质)
酪蛋白	82.70	82.65
α_{S1} -酪蛋白	18.92	30.80
α_{S2} -酪蛋白	8.52	7.50
$\beta + \kappa$ -酪蛋白	55.26	44.35
乳清蛋白	17.30	17.35

2.2 脂肪酸组成及含量差异

牛羊乳中脂肪酸种类丰富, 均在 20 种以上, 且超过 90% 的为偶数碳脂肪酸。羊乳中短链脂肪酸含量显著高于牛乳。短链脂肪酸比长链脂肪酸更易消化, 对肠功能紊乱、胆结石、冠心病等疾病具有预防作用^[22-24], 同时还具有调节肠道菌群、维持体液和电解质平衡等保健功效^[25,26]。牛乳和羊乳中脂肪酸含量见表 3^[27]。依据羊乳和牛乳中辛酸、癸酸、月桂酸和硬脂酸含量的差异, 可以这几种脂肪酸的丰度比为指标进行检测, 定性定量分析牛羊乳混掺比例。

表3 羊乳与牛乳中主要脂肪酸种类及含量(%)^[27]Table 3 Species and content of main fatty acids in goat and cow milk (%)^[27]

脂肪酸	羊乳	牛乳
己酸 C6:0	1.76	1.73
辛酸 C8:0	2.40	1.05
癸酸 C10:0	9.20	2.33
月桂酸 C12:0	4.79	2.54
豆蔻酸 C14:0	9.76	10.05
棕榈酸 C16:0	28.25	29.55
棕榈油酸 C16:1	1.13	1.34
硬脂酸 C18:0	9.42	15.88
油酸 C18:1	22.39	25.53
亚油酸 C18:2	3.62	3.09

2.3 维生素种类及含量差异

牛羊乳中维生素种类相似,但羊乳中维生素 A、硫胺素、尼克酸、叶酸、维生素 C、维生素 B6、维生素 D 等多种主要维生素含量均高于牛乳。由于乳羊把 β -胡萝卜素转化为无色维生素 A 的能力较强,故羊乳中 β -胡萝卜素含量甚微,远远低于其在牛乳中的含量^[28,29]。牛羊乳中维生素的组成和含量见表 4^[30],依据牛羊乳中 β -胡萝卜素和维生素 C 含量的较大差异,可以 β -胡萝卜素和维生素 C 作为特异性指标来检测牛羊乳混掺比例。

表4 羊乳与牛乳中主要维生素的种类及含量^[30]Table 4 Species and content of main vitamins in goat and cow milk^[30]

维生素	羊乳	牛乳
硫胺素($\mu\text{g}/\text{kg}$)	500	400
核黄素($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1200	1500
尼克酸($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2000	800
泛酸($\mu\text{g}/\text{kg}$)	3500	3500
叶酸($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2	1
生物素($\mu\text{g}/\text{kg}$)	15	20
维生素 B6($\mu\text{g}/\text{kg}$)	500	350
维生素 B12($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1	5
维生素 C($\mu\text{g}/\text{kg}$)	200	20
维生素 D(IU/kg)	23	18
β -胡萝卜素($\mu\text{g}/\text{kg}$)	微量	120

2.4 矿物质种类及含量差异

羊乳中矿物质含量丰富,钙、磷、钾、氯、镁、铁、铜、碘等矿物质含量均高于牛乳;同时,羊乳中矿物质元素比例适当,对婴幼儿、孕妇、哺乳期妇女、青少年和老年人的身体健康都有积极意义。羊乳和牛乳中矿物质种类及含量如表 5 所示^[31,32]。由于牛乳和羊乳中矿物质含量差异显著性较小,所以目前的研究报道很少有以牛羊乳中矿物质含量的差异为指标进行牛羊乳混掺的定量检测。

表5 羊乳与牛乳中主要矿物元素的种类及含量^[31,32]Table 5 Species and content of main minerals in goat and cow milk^[31,32]

矿物元素	羊乳	牛乳
钙 Ca (mg/kg)	1260	1200
磷 P (mg/kg)	970	920
钾 K (mg/kg)	1900	1500
钠 Na (mg/kg)	380	450
氯 Cl (mg/kg)	1600	1100
镁 Mg (mg/kg)	130	110
锌 Zn ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	3400	3800
铁 Fe ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	550	460
铜 Cu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	300	220
锰 Mn ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	80	60
碘 I ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	80	70
硒 Se ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20	30

3 牛羊乳混掺检测鉴别方法

由于羊乳早已风靡欧美等发达国家,西方科学家早在几十年前就开始对牛羊乳混掺的检测方法进行研究,我国对此方面的研究起步较晚,研究内容相对较少。近些年来,我国港、澳、台及大陆科学家也开始针对这一问题从乳源到乳制品成品探寻解决方法。现有的检测方法多是依据羊乳和牛乳化学组成上的差异,以牛羊乳中蛋白质、脂肪、DNA、维生素等为特征指标进行检测,常用检测方法见表 6。

3.1 基于蛋白质差异的检测方法

依据牛羊乳蛋白质分子的构成差异来进行定性定量检测是确定牛羊乳混掺比例的主要技术方法。据报道,目前已得到应用的基于蛋白质差异的检测方法有:聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点聚焦电泳、毛细管电泳、高效液相色谱技术、质谱技术、酶联免疫技术等。

表 6 牛羊乳混掺检测技术
Table 6 Different methods to detect the adulteration of goat milk with cow milk

检测技术	原理	特点
聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gelelectrophoresis, PAGE)	根据牛羊乳中酪蛋白组分具有不同 PAGE 迁移率及等电点进行检测	成本低, 操作简单; 耗时, 不适合现场定量分析
等电点聚焦电泳 (isoelectric focusing electrophoresis, IEF)	以酪蛋白组分的水解产物为检测指标进行检测	重复性好, 操作方便, 已作为欧盟(EU)的参考方法, 要求检出限为 1%
毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE)	以乳清蛋白的定量分析为基础检测	重复性好, 检测迅速, 使用方便, 适合现场分析
高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC)	以牛羊乳中所含脂肪酸的不同为依据进行检测分析	迅速, 高效; 仪器操作复杂, 费用高, 不适合现场分析
质谱技术 (mass spectroscope, MS)	通过测定离子化生物分子的质荷比得到相关分子的质量	应用范围广, 分析速度快, 用量小, 灵敏度高
酶联免疫技术 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)	利用抗原抗体特异性结合来进行检测	特异性强、灵敏度高且能做成检测试剂盒, 操作简单、快速可靠、便于携带, 适合现场定量分析
聚合酶链式反应技术 (polymerase chain reaction, PCR)	以牛羊线粒体 DNA 的保守序列为基础定量检测羊乳中掺入的牛乳	快速、灵敏, 可靠, 特异性强, 应用范围广, 适合现场分析; 专业技术较强, 试剂昂贵

3.1.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术

在聚丙烯酰胺凝胶电泳技术中, 蛋白质的迁移速率取决于蛋白质的分子量大小、蛋白质所带电荷及空间结构。根据牛乳中 α_{S1} -酪蛋白的 PAGE 迁移速率显著高于羊乳的原理可检测出羊乳中掺入的牛乳, 牛乳检测限为 1%。在 SDS-PAGE 中蛋白质的迁移速率主要取决于蛋白质分子量大小, 电荷及空间结构对其影响较小。据 Tamine 等^[33]报道, 当羊乳中掺入 25%以上的牛乳时, 通过检测牛乳中的 α_{S1} -酪蛋白可以有效检测出混合乳中的牛羊乳比例; Kaminarides 等^[34]以 para- κ -酪蛋白为特征指标, 检测出羊乳中掺入的 1%的牛乳。在 urea-PAGE 中, 蛋白质的迁移速率不仅取决于分子量, 还取决于其所带电荷的多少, 对于分子量较小的蛋白质有更好的分离效果。Veloso 等^[35]用 urea-PAGE 通过分析牛乳中 α_{S1} -酪蛋白检测出羊乳中掺入的 5%以上的牛乳。

3.1.2 等电点聚焦电泳技术

等电点聚焦电泳方法是欧盟推荐的一种定性检测牛羊乳混掺的方法, 分离效率高。该技术以 γ -酪蛋白和 β -酪蛋白水解产物为检测指标, 依据 γ_2 -酪蛋白和 γ_3 -酪蛋白的等电点在 6.5~7.5 之间, 可以定性检测出混合乳中含有 1%以上的牛乳^[36]。当样品中 γ_3 -酪蛋白和 γ_2 -酪蛋白所对应的峰面积大于等于含 1%牛乳的标准样品所对应的峰面积时, 该样品可被判定为掺入了牛乳。目前已有不少科学家致力于研究改善该方法, 使其可用于定量检测羊乳中掺入的牛乳。Suhaj 等^[37]的研究表明, 以牛乳和羊乳中 γ_3 -酪蛋白为

特征指标检测羊乳中掺入牛乳的最低检测限和定量限分别为 6.9%和 11.2%; 以 γ_2 -酪蛋白为特征指标的最低检测限和定量限分别为 5.4%和 8.6%。该技术适合于检测羊乳中掺入原始牛乳或热处理过的牛乳, 但在羊乳中掺入牛乳清蛋白的情况下这种方法不适用。

3.1.3 毛细管电泳技术

毛细管电泳方法是一种快速发展的技术, 该检测方法的自动化程度较高且样品和缓冲液的用量很小。De Jong 等^[38]用毛细管电泳方法分析了牛乳和羊乳中的酪蛋白和乳清蛋白, 并且成功检测出了掺有 1%牛乳的牛羊混合乳。Cattaneo 等^[39]以 α_{S1} -酪蛋白为特征指标, 可检测出羊乳中掺入 8%以上的牛乳。Lee 等^[40]通过对 Cattaneo 等^[39]所报道的方法的改进, 实现了检测出羊乳中掺入 1%含量的牛乳。有研究显示, 羊乳中的 α -乳白蛋白和牛乳中的 β -乳球蛋白 A 也可以用来检测羊乳中掺入的牛乳, 该方法检测的羊乳中掺入牛乳的最小含量在混合乳和乳酪中分别为 2%和 4%^[41]。石燕等^[42]采用毛细管区带电泳方法, 采用聚丙烯酰胺涂层毛细管对混合牛羊乳中的蛋白进行图谱研究, 建立了定性定量检测混合乳的方法, 以 α_{S1} -CN/(β_1 -CN + α_{S1} -CN)的峰面积比值作为定量检测指标的最低检测限为 2%, 以 β -CN A/(β -CN + β -CN A)的峰面积比值作为定量检测指标的最低检测限为 3%。随着检测技术的发展, 毛细管电泳-质谱联用(CE-MS)技术也在牛羊乳混掺检测中得到了应用。据 Müller 等^[43]报道, 以 β -乳球蛋白为特征指标, 根据测得的不同乳中 β -乳球蛋白的峰面积值可定量检测羊

乳中掺入的牛乳。

3.1.4 色谱-质谱相结合的技术

色谱技术是分离蛋白质、定量检测牛羊乳混掺的重要方法。常用的色谱检测技术有反相高效液相色谱方法(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)和离子交换高效液相色谱法(ion exchange high performance liquid chromatography, IE-HPLC)。据 Ferreira 等^[44]报道,牛羊混合乳中 β -乳球蛋白的含量与牛乳在牛羊混合乳中的比例之间存在线性关系,该方法以 β -乳球蛋白为特征指标,使用 Chrompack P 300 RP 色谱柱,用两种流动相进行梯度洗脱,在 215 nm 波长下进行检测。研究结果显示,该方法鉴别羊乳中掺入牛乳的最小检测限和定量限分别为 2%和 5%。也有研究表明,以混合乳中 β -乳球蛋白为特征指标,使用高效液相色谱和质谱联用方法可以有效检测羊乳中掺入的牛乳,该方法前处理极为简单,可以实现牛羊乳混掺的快速检测,所能检测牛羊混合乳中牛乳含量的最低水平为 5%^[45]。离子交换高效液相色谱技术在牛羊乳混掺检测中的应用使得以牛乳中 α_{S1} -酪蛋白为特征指标来定量检测牛羊混合乳中牛乳含量的方法得以实现^[33]。

近些年来,一些新的分析蛋白质结构的方法在质谱技术的基础上发展了起来。基质辅助激光解吸电离质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, MALDI-MS)技术已用于鉴别牛羊乳混掺。Cozzolino 等^[46]以牛乳中 β -乳球蛋白 A 和 β -乳球蛋白 B 为特征指标,定量检测出掺入 5%以上牛乳的掺假羊乳。Nicolaou 等^[47]的研究表明,使用 MALDI-MS 技术可以精确检测出羊乳中掺入牛乳的含量范围为 2%~10%。

3.1.5 酶联免疫技术

酶联免疫学技术是依据抗原抗体特异性结合,制备抗牛酪蛋白或乳清蛋白抗体来特异性检测牛乳蛋白成分。双抗体夹心酶联免疫法和竞争酶联免疫法都已应用于定量检测牛羊乳混掺。大量研究资料表明,酶联免疫检测方法特异性强、灵敏度高且能做成检测试剂盒,操作简单、快速可靠、便于携带,适合现场定量分析^[48]。Hurler 等^[49]以抗牛免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体采用直接竞争酶联免疫法定量检测出羊乳中掺入牛乳含量的最低水平为 0.1%,且变异系数小于 10%。在此研究基础上,他们又建立了双抗体夹心酶联免疫法对牛羊乳混掺进行检测,灵敏度提高了 10 倍。该方法使用羊抗牛 IgG 多克隆抗体结合抗牛 IgG 单克隆抗体进行检测,最低检测限达到 0.01%,特异性和灵敏度极高^[50]。据 Colak 等^[51]报道,酶联免疫方法可用于检测掺入牛乳含量范围为 0.5%~50%的掺假羊乳,但不能用于检测羊乳乳酪中是否掺入牛乳。薛海燕等^[52]以牛乳中 β -酪蛋白为抗原制备多克隆抗体,并对抗体加以修饰,建立了适合现场快速检测羊乳中掺入牛乳的含量的酶联免疫方法,该方法变异系数小于 5%,可定量检测的羊乳中掺入牛乳含量范围为 4%~50%,最低检出量为 4%。张小苗^[53]以牛

α -乳白蛋白和 α -酪蛋白为目标蛋白建立了检测羊乳中掺入羊乳含量的直接竞争 ELISA 检测法,该方法的检测线性范围为 0%~50%,最低检测限分别为 2.5%和 4%,变异系数均小于 5%,特异性、重复性和敏感性都较高。德国拜发 R-Biopharm 公司已生产出多种型号的羊奶掺假检测试剂盒,适用于原乳及各种乳制品,检测限最低可达到 0.1%,定性检测时间最短只需 5 min。

3.2 基于脂肪差异的检测方法

牛羊乳脂肪酸种类大致相同,但含量差异较大,羊乳中短链脂肪酸含量高于牛乳,尤其是 C10:0 含量约是牛乳的 5 倍。一些研究者依据牛乳和羊乳中脂肪酸含量的差异建立了定量检测牛羊乳混掺的色谱方法。Iverson 等^[54]以羊乳和牛乳中 C₁₂/C₁₀ 的比率关系建立了气相液相色谱检测方法,研究结果表明,纯羊乳中 C₁₂/C₁₀ 的比率为 0.46,纯牛乳中 C₁₂/C₁₀ 的比率为 1.16,随着羊乳中掺入牛乳含量的增加,掺假羊乳的 C₁₂/C₁₀ 的比率也逐渐变大。Benassi^[55]也以 C₁₂/C₁₀ 比率关系建立了检测方法,结果表明当羊乳中掺入牛乳的含量在 15%~20%的范围内时可被检测出来。Sadini^[56]的研究结果显示,利用色谱技术,以 C₄/(C₆+C₈)和 C₁₂/C₁₀ 的关系能够很好地定量检测羊乳及其制品中掺入的牛乳。基于脂肪差异所建立的检测方法灵敏度较低,重复性较差,误差较大,且不能检测羊乳中掺入的脱脂牛乳,所以后来学者很少继续这方面的研究。

3.3 基于 DNA 的检测方法

随着聚合酶链式反应技术的发展,20 世纪末,科研工作者们已开始探寻以动物组织中所存在的特异性 DNA 序列为基础定量检测羊乳中掺入的牛乳。近几年来,科学家们依据牛羊线粒体 DNA 的保守序列设计相应引物,建立了聚合酶链式反应技术检测乳中牛羊源性成分的快速检测方法。Lopez-Calleja 等^[57]以牛特异性基因-线粒体 12S rRNA 基因中的 223 bp 片段为靶基因检测原乳、巴氏杀菌和灭菌后的牛羊混合乳,检测限达到 0.1%;随后,他们又在此基础上对羊乳奶酪制品中掺入的牛乳成分进行了检测,最小检测限达 1%^[58]。Mayer 等^[59]以牛的特异性 DNA 序列为基础建立了酶联免疫反应检测方法,结果表明在 0.1%~75%范围内,牛乳 DNA 浓度与混合乳中掺入牛乳的含量呈良好的线性关系,线性相关系数为 0.998,最低检测限为 0.1%。以 DNA 为基础检测混合乳中的牛源性成分虽然灵敏度极高,但该方法局限性在于难以准确检测混合乳中牛乳含量。这是因为 DNA 来源于乳体细胞,而体细胞的计数又会受到许多不可控因素的影响。牛乳中体细胞的含量变化范围极大,正常牛乳中体细胞含量约为 10~40 万/mL,当牛患有乳房炎时,每毫升牛乳中体细胞的含量会增长至几百万^[60],并且乳在加工过程中,均质、离心、过滤、搅拌、加热、酸化等各种过程或多或少都会对体细胞

数目造成影响, 进而影响牛特异性 DNA 的浓度。由于聚合酶链式反应技术灵敏度极高, 因此混合乳中牛特异性 DNA 浓度的微小变化都会导致检测结果产生较大的偏差。

3.4 基于矿物质和维生素的检测方法

由于羊乳和牛乳中矿物质和维生素种类丰富, 且多种矿物质和维生素的含量也有一定差异, 因此以某些矿物质或维生素为特征指标也可用来检测牛羊乳混掺状况。Kuzdzal-Savoie 等^[61]测定了牛乳和羊乳中 β -胡萝卜素的含量, 利用羊乳中缺乏 β -胡萝卜素的特点建立了牛羊乳混掺的定量检测方法。结果显示, 纯牛乳中 β -胡萝卜素含量约为 17.4 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 纯羊乳中 β -胡萝卜素含量几乎为 0。当混合乳中牛乳含量在 10% 以上时, 混合乳中 β -胡萝卜素含量与牛乳在混合乳中所占的比例成良好的线性关系。李宝宝等^[62]以 β -胡萝卜素的含量为特征指标建立了用高效液相色谱法检测牛羊乳混掺的定量分析方法。结果表明, 当羊乳中掺入牛乳比例在 0%~100% 范围内时, 混合乳中 β -胡萝卜素的含量与牛乳所占比例呈良好的线性关系, 线性相关系数在 0.9958~0.9988 范围内, 盲样验证的相对误差在 2.20%~4.75% 之间, 可较准确定量检测羊乳中掺入牛乳比例。由于 β -胡萝卜素为脂溶性维生素, 所以以 β -胡萝卜素为特征指标建立的检测方法仅适用于检测鲜羊乳和鲜牛乳的混掺情况, 不能用来检测羊乳与脱脂牛乳的混掺比例。目前基于牛羊乳中矿物质和维生素来检测牛羊乳混掺的研究还相对较少, 这可能是由于其含量差异还不足以定量检测混掺水平, 且随着季节、地域、饲料、乳羊、乳牛的品种等变化, 牛羊乳中矿物质和维生素含量也会产生一定的波动。

4 展 望

目前, 常用于定量检测牛羊乳混掺的方法都是以牛羊乳中蛋白质、脂肪、DNA、维生素等为特征指标建立的, 其中以牛羊乳蛋白质差异建立的检测技术最为多样化, 也更适宜于检测掺假羊乳。本文所述的各种检测方法中, 最具发展潜力的是酶联免疫检测技术, 该检测方法快速, 操作简单, 成本较低, 且特异性强, 灵敏度高, 适宜于现场分析检测。随着研究的深入和检测技术的发展, 将会有更多准确可靠的检测方法应用于牛羊乳混掺的定量检测。

参考文献

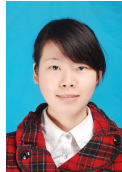
- [1] 焦凌梅, 袁唯. 改善山羊乳风味的方法研究[J]. 中国乳业, 2006, (6): 56-58.
Jiao LM, Yuan W. Identify ways to improve the flavor of goat milk [J]. China Dairy, 2006, (6): 56-58.
- [2] 王逸斌, 朱晗, 朱凌燕, 等. 全羊乳蛋白配方羊奶粉对婴儿生长发育的影响研究[J]. 中国食物与营养, 2013, 08: 78-81.
Wang YB, Zhu H, Zhu LY, *et al.* Effect of full goat lactoprotein formula on the growth and development of infants [J]. Food Nutr China, 2013, 08: 78-81.
- [3] Grant C, Rotherham B, Sharpe S, *et al.* Randomized, double-blind comparison of growth in infants receiving goat milk formula versus cow milk infant formula [J]. J Paediatr Child Health, 2005, 41(11): 564-568.
- [4] Brown JR, Law AJR, Knight CH. Changes in casein composition of goats' milk during the course of lactation: physiological inferences and technological implications [J]. J Dairy Res, 1995, 62(03): 431-439.
- [5] 岳涛. 浅谈羊奶与牛奶的营养价值[J]. 新疆畜牧业, 2013, (z4): 9-10.
Yue T. The nutritional value of goat milk and cow milk [J]. Xinjiang Animal Husb, 2013, (z4): 9-10.
- [6] 刘畅, 许晓丹, 史永翠, 等. 羊奶的营养保健功能与研究现状[J]. 乳业科学与技术, 2013, 01: 25-28.
Liu C, Xu XD, Shi YC, *et al.* Research status of the nutrition and health function of goat milk [J]. J Dairy Sci Technol, 2013, 01: 25-28.
- [7] 王飞. 揭开羊奶营养的面纱[J]. 广西质量监督导报, 2011, 05: 42-43.
Wang F. Uncover the veil of goat nutrition [J]. Guangxi Qual Superv Guide Period, 2011, 05: 42-43.
- [8] 郭军, 张和平, 杨月欣, 等. 免疫乳的研究与开发利用[J]. 食品科学, 2003, 24(9): 152-159.
Guo J, Zhang HP, Yang YX, *et al.* Research and exploitation of immune milk [J]. Food Sci, 2003, 24(9): 152-159.
- [9] 刘洪波, 施兆红. 山羊奶—现代人类健康的营养佳品[J]. 中国畜牧杂志, 2005, 41(11): 52-53.
Liu HB, Shi ZH. Goat milk-Nourishment for human health [J]. Chin J Anim Sci, 2005, 41(11): 52-53.
- [10] 李景芳, 陆东林. 新疆发展羊乳产业初探[J]. 新疆畜牧业, 2013, (6): 4-6.
Li JF, Lu DL. The development of Xinjiang goat milk industry [J]. Xinjiang Anim Husb, 2013, (6): 4-6.
- [11] 程漱兰, 姚莉, 崔惠玲, 等. WTO 背景下的中国奶业发展前景[J]. 农业经济问题, 2002, 23(3): 9-16.
Chen SL, Yao L, Cui HL, *et al.* The prospect of China's dairy industry in the context of WTO [J]. Issues Agric Econ, 2002, 23(3): 9-16.
- [12] Aziz MA. Present status of the world goat populations and their productivity [J]. World, 2010, 861(1078. 2): 1.
- [13] 陈雪, 张富新, 贾润芳, 等. 山羊奶产品开发研究[J]. 农产品加工·学刊(中), 2013, (9): 46-48, 51.
Chen X, Zhang FX, Jia RF, *et al.* The development situation of goat milk products [J]. Acad Period Farm Prod Proc, 2013, (9): 46-48, 51.
- [14] 曹斌云, 罗军, 姚军虎, 等. 我国山羊奶开发现状及重点[J]. 畜牧兽医杂志, 2007, 26(1): 52-54.
Cao BY, Luo J, Yao JH, *et al.* Status quo and key points of the development of goat milk in China [J]. J Anim Sci Veter Med, 2007, 26(1): 52-54.
- [15] 李志成. 山羊乳酪蛋白酶解物制备及其抗氧化性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2010.
Li ZC. Enzymatic preparation and antioxidative activity of goat's milk casein hydrolysates *in vitro* [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2010.
- [16] 刘蒙佳, 周强. 羊乳与牛乳理化特性比较[J]. 饮料工业, 2010, 13(4): 11-13.
Liu MJ, Zhou Q. Comparison of physicochemical properties of goat milk

- and cow milk [J]. *Bev Ind*, 2010, 13(4): 11–13.
- [17] 陆东林, 李景芳. 山羊乳的营养价值及风味改善技术[J]. *新疆畜牧业*, 2013, (6): 16–20.
Lu DL, Li JF. Nutritional value and flavor improvement of goat milk [J]. *Xinjiang Anim Husbandry*, 2013, (6): 16–20.
- [18] Ceballos LS, Morales ER, de la Torre Adarve G, *et al.* Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology [J]. *J Food Comp Anal*, 2009, 22(4): 322–329.
- [19] Recio I, Pérez-Rodríguez ML, Amigo L, *et al.* Study of the polymorphism of caprine milk caseins by capillary electrophoresis [J]. *J Dairy Res*, 1997, 64(4): 515–523.
- [20] 宋宏新, 张小苗, 薛海燕, 等. 牛羊乳蛋白组分比较研究[J]. *中国酿造*, 2012, 31(2): 21–23.
Song HX, Zhang XM, Xue HY, *et al.* The comparative studies of proteins of bovine and goat milk [J]. *China Brew*, 2012, 31(2): 21–23.
- [21] 张歌. 牛乳和羊乳蛋白质差异比较及检测方法的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2013.
Zhang G. Detection methods and comparison on protein difference of cow and goat milk [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2013.
- [22] 陈燕, 曹郁生, 刘晓华, 等. 短链脂肪酸与肠道菌群[J]. *江西科学*, 2006, 24(1): 38–40, 69.
Chen Y, Cao YS, Liu XH, *et al.* Short chain fatty acids and intestinal microflora [J]. *Jiangxi Sci*, 2006, 24(1): 38–40, 69.
- [23] Nandi S, Gangopadhyay S, Ghosh S. Production of medium chain glycerides from coconut and palm kernel fatty acid distillates by lipase-catalyzed reactions [J]. *Enzyme Mic Technol*, 2005, 36(5): 725–728.
- [24] Astrup A, Dyerberg J, Elwood P, *et al.* The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? [J]. *Am J Clin Nutr*, 2011, 93(4): 684–688.
- [25] Chilliard Y, Ferlay A, Rouel J, *et al.* A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis [J]. *J Dairy Sci*, 2003, 86(5): 1751–1770.
- [26] 李静, 邓泽元, 范亚苇, 等. 几种乳制品中脂肪酸的特点[J]. *食品工业科技*, 2007, (11): 221–223.
Li J, Deng ZY, Fan Y, *et al.* Characteristic of fatty acids of several dairy products [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2007, (11): 221–223.
- [27] 葛武鹏, 李元瑞, 陈瑛, 等. 牛、羊乳及其制品的脂肪酸组成分析[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2008, 36(7): 173–178.
Ge WP, Li YR, Chen Y, *et al.* Analysis and comparison of fatty acids composition in cow's & goat's milk and their products [J]. *J Northwest A F Univ (Nat Sci Ed)*, 2008, 36(7): 173–178.
- [28] Lucas A, Rock E, Chamba JF, *et al.* Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest [J]. *Le Lait*, 2006, 86(1): 21–41.
- [29] Ribeiro AC, Ribeiro SDA. Specialty products made from goat milk [J]. *Small Rum Res*, 2010, 89(2): 225–233.
- [30] 周强. 羊乳理化特性及其胶体稳定性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2007.
Zhou Q. Study on physicochemical properties and colloid stability of goat milk [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2007.
- [31] Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard P, *et al.* Composition of goat and sheep milk products: An update [J]. *Small Rum Res*, 2008, 79(1): 57–72.
- [32] Jandal JM. Comparative aspects of goat and sheep milk [J]. *Small Rum Res*, 1996, 22(2): 177–185.
- [33] Tamime AY, Barclay MNI, Law AJR, *et al.* Kishk—a dried fermented milk/cereal mixture. 2 Assessment of a variety of protein analytical techniques for determining adulteration and proteolysis [J]. *Lait*, 1999, 79(3): 331–339.
- [34] Kaminarides SE, Koukiassa P. Detection of bovine milk in ovine yoghurt by electrophoresis of para- κ -casein [J]. *Food Chem*, 2002, 78(1): 53–55.
- [35] Veloso A CA, Teixeira N, Ferreira I MPLVO. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis: Detection of milk adulterations [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 967(2): 209–218.
- [36] Commission Regulation (EC) No 273/2008. Reference method for the detection of cows' milk and caseinate in cheeses from ewes' milk, goats' milk and buffalos' milk or mixtures of ewes', goats' and buffalos' milk [S]. OJ L88, 5.3.2008: 53–61.
- [37] Suhaj M, Stankovska M, Kolek E. Quantification of ovine and bovine caseins in Slovakian bryndza ewes' cheese by isoelectric focusing [J]. *J Food Nutr Res*, 2010, 49(1): 45–52.
- [38] De Jong N, Visser S, Olieman C. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 1993, 652(1): 207–213.
- [39] Cattaneo TMP, Nigro F, Greppi GF. Analysis of cow, goat and ewe milk mixtures by capillary zone electrophoresis (CZE): Preliminary approach [J]. *Milchwissenschaft*, 1996, 51(11): 616–619.
- [40] Lee SJ, Chen MC, Lin CW. Detection of cows' milk in goats' by capillary zone electrophoresis [J]. *Aust J Dairy Technol*, 2001, 56: 24–27.
- [41] Cartoni G, Coccioni F, Jasionowska R, *et al.* Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 846(1): 135–141.
- [42] 石燕, 姜金斗, 刘宁, 等. 利用毛细管电泳测定牛乳和山羊乳混合乳的蛋白质[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(11): 119–124.
Shi Y, Jiang JD, Liu N, *et al.* Milk protein determination of cow's and goat's milk mixtures by capillary [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2010, 41(11): 119–124.
- [43] Müller L, Barták P, Bednář P, *et al.* Capillary electrophoresis-mass spectrometry—a fast and reliable tool for the monitoring of milk adulteration [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(10): 2088–2093.
- [44] Ferreira IM, Caçote H. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1015(1): 111–118.
- [45] Chen RK, Chang LW, Chung YY, *et al.* Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectr*, 2004, 18(10): 1167–1171.
- [46] 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 Spectr*, 2001, 36(9): 1031–1037.
- [47] Nicolaou N, Xu Y, Goodacre R. MALDI-MS and multivariate analysis for

- the detection and quantification of different milk species [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399(10): 3491–3502.
- [48] Hurley IP, Ireland HE, Coleman RC, *et al.* Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products [J]. *Inter J Food Sci Technol*, 2004, 39(8): 873–878.
- [49] Hurley IP, Coleman RC, Ireland HE, *et al.* Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration [J]. *J Dairy Sci*, 2004, 87(3): 543–549.
- [50] Hurley IP, Coleman RC, Ireland HE, *et al.* Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese [J]. *Int Dairy J*, 2006, 16(7): 805–812.
- [51] Colak H, Aydin A, Nazli B, *et al.* Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography [J]. *Food Control*, 2006, 17(11): 905–908.
- [52] 薛海燕, 胡围围, 宋宏新, 等. 羊乳中掺入牛乳的间接 ELISA 定量检测[J]. *食品科学*, 2011 (24): 370–373.
- Xue HY, Hu WW, Song HX, *et al.* Indirect ELISA for detection and quantification of bovine milk in goat milk [J]. *Food Sci*, 2011 (24): 370–373.
- [53] 张小苗. 羊乳和牛乳理化特性比较及其掺假检测研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2012.
- Zhang XM. Physicochemical properties of goat and cow milk and adulteration detection of cow milk in goat milk [D]. Xi'an: Shaanxi Univ Sci Technol, 2012.
- [54] Iverson JL, Sheppard AJ. 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.
- [55] Benassi R. Sulla composizione del grasso di latte di pecora [J]. *Latte*, 1963, 36: 468.
- [56] Sadini V. Contributo alla conoscenza della materia grassa del latte e dei formaggi di pecora italiani [J]. *Latte*, 1963, 36: 933.
- [57] Lopez-Calleja I, Gonzalez 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.
- [58] López-Calleja IM, González I, Fajardo V, *et al.* Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk cheeses [J]. *Int Dairy J*, 2007, 17(1): 87–93.
- [59] Mayer HK, Bürger J, Kaar N. Quantification of cow's milk percentage in dairy products—a myth? [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403(10): 3031–3040.
- [60] Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview [J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2011, 24(3): 429–438.
- [61] Kuzdzal-Savoie S, Kuzdzal W. La recherche du lait de vache ajouté au lait de chèvre. application au cas du fromage [J]. *Le Lait*, 1960, 40(397): 393–407.
- [62] 李宝宝, 葛武鹏, 耿伟, 等. 基于 β -胡萝卜素检测的牛羊乳混掺鉴别技术[J]. *现代食品科技*, 2014, 30 (8): 264–269.
- Li BB, Ge WP, Geng W, *et al.* Detection of adulteration of goat milk with cow milk based on β -carotene analysis [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2014, 30 (8): 264–269.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



张晓旭, 硕士研究生, 主要研究方向为乳品科学技术。

E-mail: zxiaoxu2012@163.com



葛武鹏, 博士, 副教授, 主要研究方向为乳制品科学及生物技术应用。

E-mail: josephge@sina.com