

考马斯亮蓝法检测不同乳中乳清蛋白含量

聂昌宏, 郑欣, 阿依居来克·卡得尔, 李欣荣, 阿地力江·依米提, 郭伟, 高晓黎*
(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 建立考马斯亮蓝法(coomassie brilliant blue method, CCB)检测乳品中蛋白质的方法, 并对几种常见乳中总蛋白质含量及乳清蛋白含量进行检测比较。**方法** 用考马斯亮蓝 G-250 显色, 以牛血清蛋白为对照品, 采用可见分光光度法在检测波长 595 nm 处测定各种乳中蛋白质的含量。**结果** 该方法在 0.005~0.1 mg/mL 范围内与吸光度呈现良好的线性关系($r=0.9995$), 回收率为 99.45%、相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.03%; 不同种类乳中蛋白质含量存在差别, 乳清蛋白占比也有很大的不同。**结论** 考马斯亮蓝法检测蛋白, 显色灵敏, 具有简便, 快捷, 成本低等特点。各种乳蛋白检测比较中, 马乳的乳清蛋白占比最接近母乳, 这为马乳的进一步开发提供了新的理论基础。

关键词: 考马斯亮蓝法; 蛋白质; 乳清蛋白

Determination of whey protein content in different kinds of milk by coomassie brilliant blue method

NIE Chang-Hong, ZHENG Xin, AYIJULAIKE Ka-De-Er, LI Xin-Rong, ADILJIANG Yi-Mi-Ti, GUO Wei, GAO Xiao-Li*

(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of protein in dairy products by coomassie brilliant blue method (CCB), and to compare the total protein content and whey protein content of several common milks. **Methods** Coomassie brilliant blue G-250 was used for color development, and bovine serum albumin was used as a reference. The content of protein in various milk was determined by visible spectrophotometry at the detection wavelength of 595 nm. **Results** The method showed a good linear relationship with absorbance in the range of 0.005-0.1 mg/mL ($r=0.9995$), the recovery rate was 99.45%, and the relative standard deviation (RSD) was 2.03%. There were differences in the protein content of different types of milk, and the proportion of whey protein was also very different. **Conclusion** The coomassie brilliant blue method is sensitive to color, which is simple, fast and low cost. In the comparison of various milk protein tests, the proportion of whey protein in horse milk is the closest to breast milk, which provides a new theoretical basis for the further development of horse milk.

KEY WORDS: coomassie brilliant blue method; protein; whey protein

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目(2017A01002-4)

Fund: Supported by Xinjiang Uygur Autonomous Region Major Science and Technology Project (2017A01002-4)

*通讯作者: 高晓黎, 教授, 主要研究方向为新药与新剂型。E-mail: xli_g@sina.com

*Corresponding author: GAO Xiao-Li, Professor, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China. E-mail: xli_g@sina.com

1 引言

蛋白质是组成细胞及组织的重要成分,也是生命活动的基础物质,具有许多生物学功能^[1]。食物中的蛋白质作为人体氮的重要来源,具有糖类和脂肪所不能取代的作用^[2]。乳与乳制品是一类营养较丰富且全面的理想食品,其蛋白质含量及组成是乳与乳制品质量的一项重要指标。乳品中的蛋白质主要包括酪蛋白、乳清蛋白、乳脂球膜蛋白以及乳外泌体蛋白等^[3]。其中乳清蛋白属于易溶性蛋白,在婴儿肠道中能够形成细小的凝块,有较高的消化吸收率;而酪蛋白为难溶性蛋白,在肠道中易形成较硬的结块,不易于吸收^[4]。因此乳清蛋白也是婴儿配方奶粉的重要组成部分。

食品安全国家标准 GB 5009.5-2010^[5]给出的蛋白的测定方法主要有凯氏定氮法和分光光度法,但是由于凯氏定氮法实际上测的是蛋白质和非蛋白质含氮物的总量,因此会存在一些误差,此外凯氏定氮法在实验过程中会产生大量有害气体且加热过程中也较为危险^[6]。文献中记载的方法有很多,如 SDS 电泳法、高效液相色谱法、双缩脲法、Lowry 法、考马斯亮蓝法(coomassie brilliant blue method, CCB)等^[7,8]。SDS 电泳法对仪器的要求更高,测定时间较长;高效液相色谱法测定样品所用时间较长,样品的前处理步骤也比较繁琐,不适宜用于实验室大量试验;双缩脲法对时间的掌控尤为重要,样品需要在短时间内进行快速测定;Lowry 法虽然较为简便,但是会受到多种因素的干扰^[7];相比较而言,考马斯亮蓝法拥有灵敏度高、测定快速、简便、干扰物质少等特点^[8]。考马斯亮蓝比色法是 1976 年建立的一种测定微量蛋白质的方法^[1]。蛋白质分子多肽链中具有酰胺基结构,这些结构可以与棕红色的考马斯亮蓝 G-250 染料的阴离子相互作用形成染色复合物,使溶液的颜色由棕红色变为蓝色,其最大吸收波长也由 465 nm 变化为 595 nm,当待测溶液中蛋白质含量在 1~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,蛋白质-考马斯亮蓝复合物在 595 nm 波长下的吸光度与蛋白质含量成正比,据此可用于蛋白质含量分析^[6,9]。

本研究采用考马斯亮蓝法(Bradford 法)对不同种类乳粉中总蛋白和乳清蛋白进行检测对比,以期为母乳补充剂的选择提供研究基础。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

驼乳 3 份,采自新疆乌鲁木齐达坂城,南山区;羊乳 3 份,采自新疆乌鲁木齐南山区;牛乳 3 份,采自新疆昌吉呼图壁及乌鲁木齐南山;马乳 3 份,采自新疆伊犁新源县;

母乳 3 份,由处于泌乳期的 3 位志愿者提供;磷酸($\geq 85\%$,分析纯,国药集团化学试剂有限公司);95%乙醇、盐酸(36%~38%,分析纯,天津市大茂化学试剂厂);考马斯亮蓝 G250(91.4%,进口分装,上海蓝季生物公司);牛血清白蛋白($\geq 98\%$,赛国生物科技有限公司)。

2.2 仪器与设备

MULTIFUGE X3R 高速低温台式离心机、VLP200 冷冻干燥机(美国 Thermo Fisher 公司);KQ-5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AB135-S 型分析天平($d=0.01$ mg,瑞士 Mettler-Toledo 公司);岛津 2700 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);EDWARDS 油泵(英国爱德华电子有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品的干燥

取各种鲜乳适量于玻璃培养皿中,低温下预冻,待液体冷冻成冰后,将玻璃皿置于冷冻干燥机中进行干燥处理,24 h 后,得到各种乳粉。

2.3.2 溶液的配制

CBB G-250 染料试剂:称 50 mg CBB G-250 于 1 L 容量瓶中,加入 40 mL 95%的乙醇溶解,再加入 120 mL 85%的磷酸,加入蒸馏水定容^[7],充分混匀后,抽滤去除残渣,备用。

标准品溶液:取牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)10 mg 于 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,得到浓度为 0.1 mg/L 的 BSA 标准品溶液。

0.1 mol/L 盐酸:加入适量蒸馏水于 1 L 容量瓶中,取盐酸 8.3 mL 于容量瓶中,继续加蒸馏水定容混匀,得 0.1 mol/L 的盐酸溶液。

2.3.3 标准曲线系列浓度溶液

准备 7 只洁净容量瓶,取上述标准储备液 0.5、1、2、4、6、8、10 mL 于容量瓶中,分别加水定容,得到 0.005、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/L 系列浓度的标准品,分别取 1 mL 于洁净试管中,加入上述 CBB G-250 染料试剂 4 mL,小心涡旋混匀,室温下反应 5 min^[1],以空白溶液作参比溶液,于分光光度计 595 nm 波长处测定样品组的吸光度。

2.3.4 样品的处理

分别取各种乳冻干粉约 50 mg 于 100 mL 洁净容量瓶中,加适量蒸馏水(40 $^{\circ}\text{C}$)于超声振荡器中使乳粉充分分散,继续加蒸馏水定容。混匀后取 1 mL 于洁净试管中按照 2.3.3 的显色方法进行操作,得到总蛋白含量。取适量样品溶液用 0.1 mol/L 的盐酸调 pH 至 4.6,于 14500 r/min 转速下离心 10 min,取上清液 1 mL 于洁净试管中按照 2.3.3 的显色方法进行操作,得到乳清蛋白含量。

3 结果与分析

3.1 线性范围

以 BSA 对照品溶液的浓度(mg/mL)为横坐标, 吸光度值 A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 见图 1。回归方程为: $Y=7.5266X+0.0454(r=0.9995)$, BSA 对照品含量在 0.005~0.1 mg/mL 的浓度范围内线性关系良好, 表明蛋白质在此浓度范围内与吸光度之间符合 Lamber—Beer 定律。

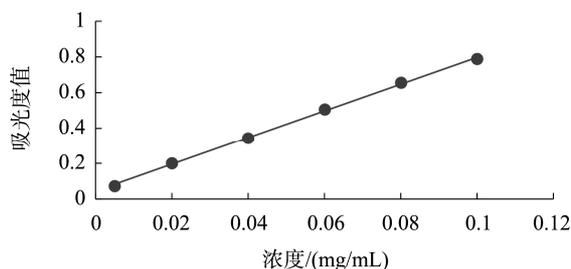


图 1 BSA 对照品含量(mg/mL)随吸光度变化标准曲线

Fig. 1 BSA reference content (mg/mL) with absorbance change standard curve

3.2 精密度

取马乳粉适量, 按照 2.3.4 的样品处理方法, 连续进

行 6 次分析, 由表 1 数据可知仪器精密度良好。

3.3 重复性

平行取 6 份马奶粉, 按照 2.3.4 的样品处理方法, 分别进样检测, 记录吸光度值, 计算含量及相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 值, 由表 2 数据可知方法重复性良好。

3.4 稳定性

取马奶粉适量, 按照 2.3.4 的样品处理方法, 每隔 5 min 进行一次检测, 记录吸光度值变化, 计算 RSD 值, 由表 3 数据可知该方法在 30 min 内样品显色稳定。

3.5 准确度

称取 100 mg 牛血清蛋白标准品稀释至 100 mL, 得 1 mg/mL 标准品储备液, 取已知含量的马奶粉 6 份于 100 mL 容量瓶中, 加适量的水, 溶解混匀, 移入上述与样品含量相当的标准品, 继续加入蒸馏水稀至刻度^[9]。按照 2.3.4 的方法检测吸光度, 依照下式计算回收率。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{检测值} + \text{本底值}}{\text{加标量}} \times 100\%$$

由表 4 可知, 该方法回收率可以达到 99.45%, 说明其准确度良好。

表 1 精密度试验结果($n=6$)

Table 1 Precision experiment results ($n=6$)

样品号	1	2	3	4	5	6	RSD
吸光度	0.526	0.524	0.523	0.524	0.525	0.525	0.20%

表 2 重复性试验结果($n=6$)

Table 2 Repeatability test results ($n=6$)

样品号	1	2	3	4	5	6	RSD
含量/(mg/g)	142.38	146.22	143.53	143.42	142.24	142.66	1.03%

表 3 稳定性试验结果($n=8$)

Table 3 Stability test results ($n=8$)

时间	0	5	10	15	20	25	30	RSD
吸光度	0.216	0.209	0.211	0.212	0.207	0.208	0.206	1.64%

表 4 回收率试验结果($n=6$)

Table 4 Recovery rate test results ($n=6$)

样品序号	本底值/mg	加标量/mg	检测值/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	3.89	4	7.79	97.58	99.45	2.03
2	3.96	4	8.03	101.9		
3	3.96	4	7.83	96.78		
4	3.94	4	7.9	98.98		
5	3.95	4	7.97	100.42		
6	3.91	4	7.95	101.02		

3.6 样品检测

精密称取不同乳粉样品适量, 按照 2.3.4 实验方法操作, 分别检测吸光度值, 计算各种乳粉样品中总蛋白含量以及乳清蛋白含量以及乳清蛋白占总蛋白的百分比, 结果如表 5 所示。

表 5 乳粉样品含量检测结果($n=3$)
Table 5 Milk powder samples content test results ($n=3$)

乳粉种类	总蛋白含量 (mg/g)	乳清蛋白含量 (mg/g)	乳清蛋白 占比/%
驼乳粉	171.14±28.76	25.76±4.42	15.17±2.25
羊乳粉	161.44±32.82	8.13±1.86	5.07±0.79
牛乳粉	179.86±5.61	14.95±1.69	8.31±0.9
马乳粉	141.61±8.15	68.89±0.67	48.75±2.57
母乳粉	91.21±19	44.8±11.09	52.92±2.68

由表 5 可知, 驼乳粉、羊乳粉和牛乳粉虽然总蛋白含量较高, 但是乳清蛋白占比较低, 尤其是羊乳粉, 其乳清蛋白平均占比仅为 5% 左右, 绝大多数蛋白为酪蛋白; 母乳粉虽然蛋白质含量较低, 但是其乳清蛋白含量占比较高, 超过了 50%, 这种蛋白组成也充分证明了由于乳清蛋白含量较高, 因此母乳更容易被婴儿消化吸收。值得注意的是, 马乳粉中的总蛋白虽不及驼乳粉、羊乳粉和牛乳粉, 但其乳清蛋白也大约占到了总蛋白的 50%, 由此提示, 马乳相比较其他几种乳, 其蛋白组成更接近母乳, 这也为马乳进一步的开发利用提供了一定的研究基础。

4 结论与讨论

本研究通过对不同乳粉中总蛋白和乳清蛋白进行检测, 得出结论, 母乳蛋白质中占大多数的是乳清蛋白, 与母乳蛋白组成最接近的是马乳, 马乳也拥有较高的乳清蛋白, 该实验结果与文献报道^[10,11]一致, 拥有此天然优势, 今后有望将马乳作为原料开发成为母乳补充剂。

本研究通过考马斯亮蓝 G-250 的染色原理, 建立了蛋白质的检测方法, 该方法具有精密度高、重现性好、成本较低、快速便捷、灵敏度高优点。但该方法同样也存在缺点, 例如该方法中所使用的考马斯亮蓝 G-250 染液与去污剂也会发生显色反应^[12], 容易受到干扰, 因此在清洗器具和比色皿时, 应充分将洗涤剂冲洗干净。另外, 考马斯亮蓝 G-250 染液在配制完成后, 应添加过滤步骤, 因为未溶解的残渣也会影响到样品的检测。

乳清蛋白不仅是人体必需氨基酸的一个重要来源, 也是部分生命活动需要的活性物质, 在生长过程中有非常重要的作用^[13]。乳清蛋白主要是由 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白、血清蛋白、溶菌酶、乳铁蛋白等组成^[14]。食品安全国

家标准 GB 10765-2010 作出规定, 对乳基婴儿配方食品, 其中乳清蛋白的含量 $\geq 60\%$ 。有文献指出我国的乳清粉由于制备还不够成熟, 几乎全靠进口^[15]。因此, 我国婴儿配方奶粉的生产会受制于乳清粉的进口, 从而增加了成本^[16]。在此背景下, 寻找合适的天然乳清蛋白来源具有较大的意义。本研究的结果显示马乳具有加工乳清蛋白的潜力, 其蛋白组成与母乳也最为接近, 这也为马乳的进一步开发提供了基础。

参考文献

- [1] 冯昕, 王吉中, 尧俊英, 等. 考马斯亮蓝法测定乳与乳制品中蛋白质含量[J]. 粮食与食品工业, 2010, 17(3): 57-59.
Feng X, Wang JZ, Rao JY, et al. Determination of protein content in milk and dairy products by coomassie brilliant blue method [J]. Food Ind, 2010, 17(3): 57-59.
- [2] 刘正, 刘亚兵, 张进, 等. 乳及乳制品中蛋白质含量的测定[J]. 农业科技与信息, 2014, (7): 24-25.
Liu Z, Liu YB, Zhang J, et al. Determination of protein content in milk and dairy products [J]. Agric Sci Technol Inf, 2014, (7): 24-25.
- [3] 杨梅. 不同泌乳期人乳与牛乳中非酪蛋白差异蛋白质组学研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
Yang M. Differential proteomics study of non-casein in human milk and milk during different lactation [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017.
- [4] 陆东林, 刘朋龙, 王生俊, 等. 新疆马乳产业发展初探[J]. 中国乳业, 2012, (11): 16-19.
Lu DL, Liu PL, Wang SJ, et al. A preliminary study on the development of Xinjiang horse milk industry [J]. China Dair Ind, 2012, (11): 16-19.
- [5] GB/T 5009.5-2003 食品中蛋白质的测定[S].
GB/T 5009.5-2003 Determination of protein in food [S].
- [6] 孙士青, 王少杰, 李秋顺, 等. 考马斯亮蓝法快速测定乳品中蛋白质含量[J]. 山东科学, 2011, 24(6): 53-55.
Sun SQ, Wang SJ, Li QS, et al. Rapid determination of protein content in dairy products by coomassie brilliant blue method [J]. Shandong Sci, 2011, 24(6): 53-55.
- [7] 陈立红. 未变性乳清蛋白的测定及其对产品特性的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2015.
Chen LH. Determination of undenatured whey protein and its effect on product characteristics [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015.
- [8] 刘立新. 牛乳蛋白质检测技术的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2011.
Liu LX. Research on protein detection technology of milk [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2011.
- [9] 蒋大程, 高珊, 高海伦, 等. 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量中的细节问题[J]. 实验科学与技术, 2018, 88(3): 123-126.
Jiang DC, Gao S, Gao HL, et al. Details of the determination of protein content by coomassie brilliant blue method [J]. Exper Sci Technol, 2018, 88(3): 123-126.
- [10] 赵璐, 何婷, 丁文欢, 等. 考马斯亮蓝法(Bradford 法)测定驼乳中蛋白质的含量[J]. 应用化工, 2016, (12): 165-167, 171.
Zhao L, He T, Ding WH, et al. Determination of protein content in camel milk by coomassie brilliant blue method (Bradford method) [J]. Appl

- Chem Ind, 2016, (12): 165-167, 171.
- [11] 陆东林, 刘朋龙, 王生俊, 等. 马乳的营养价值和开发利用[J]. 新疆畜牧业, 2012, (4): 4-9.
Lu DL, Liu PL, Wang SJ, *et al.* Nutritional value and development and utilization of horse milk [J]. Xinjiang Anim Husbandr, 2012, (4): 4-9.
- [12] 许家喜. 蛋白质的检测方法与乳制品中蛋白含量测定[J]. 大学化学, 2009, 24(1): 66-69.
Xu JX. Determination of protein and determination of protein content in dairy products [J]. Univ Chem, 2009, 24(1): 66-69.
- [13] 赖世云. 婴儿配方奶粉中乳清蛋白测定方法的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2015.
Lai SY. Study on the determination method of whey protein in infant formula [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2015.
- [14] Inglingstad RA, Devold TG, Eriksen EK, *et al.* Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes [J]. Dair Sci Technol, 2010, 90(5): 549-563.
- [15] 陈渝. 我国奶粉产业发展初探[J]. 中国乳业, 2007, (11): 10-13.
Chen Y. Preliminary study on the development of milk powder industry in China [J]. China Dair Ind, 2007, (11): 10-13.
- [16] 李春强. 婴儿配方奶粉中乳清蛋白替代品的开发[D]. 长春: 东北农业大学, 2008.
Li CQ. Development of whey protein substitutes in infant formula [D]. Changchun: Northeast Agricultural University, 2008.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



聂昌宏, 硕士, 主要研究方向为新药与新剂型。

E-mail: changhong_6666@sina.com

高晓黎, 教授, 主要研究方向为新药与新剂型。

E-mail: xli_g@sina.com

“现代分析仪器在食品检测中的应用”专题征稿函

食品不仅是维持人体生命活动所必需的各种营养物质和能量的最主要来源, 而且以其色、香、味、质地及口感给人们以愉悦的感官享受。随着食品工业和食品科学技术的不断发展, 民众对食品品质和卫生要求也越来越高。因此, 对食品质量的控制与安全保障尤为重要, 而这在很大程度上依赖于先进的分析检测技术。现代仪器分析技术在生命科学、环境科学、材料科学等领域发挥着越来越重要的作用, 在食品科学和食品安全领域同样有着不可替代的重要作用。

鉴于此, 本刊特别策划了“现代分析仪器在食品检测中的应用”专题, 主要围绕气相色谱、液相色谱、离子色谱、质谱、原子光谱、红外光谱、拉曼光谱、表面等离子共振等现代分析仪器在食品检测与质量安全控制领域的应用, 阐述现代仪器的原理、特点、适用范围、优势与局限性, 展示这些仪器技术在食品安全检测中的应用实例, 本专题计划在 2019 年 5 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编吴永宁研究员及学报编辑部特别邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2019 年 3 月 20 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(注明专题文章)

E-mail: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部