

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240401012

凯氏定氮法与杜马斯燃烧法检测三氯乙酸沉淀大豆和小麦蛋白中蛋白氮含量研究

范 震^{1,2}, 董子研², 纪秀玉¹, 张 波^{2*}, 李慧静^{1*}

(1. 河北农业大学食品科技学院, 保定 071000; 2. 中国农业科学院农产品加工研究所/农业农村部粮油加工综合利用技术集成实验室, 北京 100193)

摘 要: **目的** 检验尿素干扰下三氯乙酸沉淀分离大豆和小麦蛋白质的效果。**方法** 本研究以牛奶、大豆蛋白、小麦水溶性组分为参试样品, 分别在去离子水、尿素溶液 2 种溶液体系下分散样品, 参考国家标准采用三氯乙酸沉淀蛋白氮, 2 种蛋白检测方法(凯氏定氮法、杜马斯燃烧法)检测氮含量, 并计算氮检测回收率评估三氯乙酸对大豆蛋白、小麦水溶性组分等植物性蛋白的适用性。**结果** 去离子水(无外源氮)分散的上清液经三氯乙酸沉淀, 凯氏定氮法和杜马斯燃烧法检测牛奶的回收率分别为 114%、101%, 大豆的回收率分别为 96%、98%, 小麦的回收率分别为 104%、105%。尿素溶液(有外源氮)分散的上清液经三氯乙酸沉淀, 牛奶的回收率分别为 99%、94%, 大豆的回收率分别为 95%、92%, 小麦的回收率分别为 101%、92%。**结论** 有无尿素干扰时, 三氯乙酸均可以沉淀大豆蛋白、小麦水溶性组分中蛋白氮, 并可以采用凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测, 回收率较好。

关键词: 大豆蛋白; 小麦水溶性组分; 蛋白氮; 非蛋白氮; 三氯乙酸沉淀法

Study on the detection of protein nitrogen content in soybean and wheat protein precipitated with trichloroacetic acid by Kjeldahl nitrogen determination method and Dumas combustion method

FAN Zhen^{1,2}, DONG Zi-Yan², JI Xiu-Yu¹, ZHANG Bo^{2*}, LI Hui-Jing^{1*}

(1. School of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China; 2. Institute of Agricultural Products Processing, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Integrated Laboratory of Grain and Oil Processing and Utilization Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: Objective To test the effects of trichloroacetic acid precipitation on the separation of soybean and wheat proteins under urea interference. **Methods** This study used water-soluble components such as milk, soy protein, and wheat as reference samples. The samples were dispersed in 2 kinds of solution systems: Deionized water and urea solution. According to national standards, trichloroacetic acid was used to precipitate protein nitrogen, and 2 kinds of protein detection methods (Kjeldahl nitrogen determination method and Dumas combustion method) were

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-03)、中国农业科学院农产品加工研究所创新工程项目(CAAS-ASTIP-2023-IFST)

Fund: Supported by the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-03), and the Agricultural Science and Technology Innovation Program, Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP- 2023-IFST)

***通信作者:** 李慧静, 教授, 主要研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: huijingli2002@163.com

***Corresponding author:** LI Hui-Jing, Professor, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China. E-mail: huijingli2002@163.com

used to detect nitrogen content. The nitrogen detection recovery rate was calculated to evaluate the applicability of trichloroacetic acid to water-soluble components such as soy protein and wheat. **Results** The supernatant dispersed in deionized water (without external nitrogen) was precipitated with trichloroacetic acid. The recovery rates of milk using Kjeldahl nitrogen determination method and Dumas combustion method were 114% and 101%, respectively. The recovery rates of soybean were 96% and 98%, respectively. The recovery rates of wheat were 104% and 105%, respectively. The supernatant dispersed with urea solution (containing exogenous nitrogen) was precipitated with trichloroacetic acid. The recovery rates of milk were 99% and 94%, soybean was 95% and 92%, and wheat was 101% and 92%, respectively. **Conclusion** Trichloroacetic acid can precipitate protein nitrogen in soybean protein and wheat water-soluble components with or without urea interference, and can be detected by Kjeldahl method and Dumas combustion method, and the recovery rate is good.

KEY WORDS: soy protein; water-soluble components of wheat; protein nitrogen; non protein nitrogen; trichloroacetic acid precipitation method

0 引言

蛋白质相互作用是维持其空间结构的重要作用力,相互作用的占比影响着小麦和大豆蛋白的加工特性和制品质量^[1-6],其占比主要通过特定溶剂的溶解度表征^[7-12],其中在检测过程中可能会使用尿素^[13-15]。然而采用尿素溶液分散后尿素会存在于其提取液中,加上尿素中的氮元素属于非蛋白氮^[16],特别在采用凯氏定氮法和燃烧法检测氮含量时,将严重干扰提取液中蛋白氮的测定^[17-18]。

关于样品中蛋白氮的检测,GB/T 21704—2008《乳与乳制品中非蛋白氮含量的测定》中提及采用三氯乙酸沉淀蛋白氮,然后检测沉淀中氮的方法^[19-22]。牛巍等^[23]利用三氯乙酸沉淀液态奶中蛋白氮,并探究了亚硝酸钠、硝酸铵、尿素等几种非蛋白氮对此沉淀方法的影响,其中经过三氯乙酸沉淀后的蛋白氮测定值与蛋白氮样品理论值不存在显著差异,说明亚硝酸钠、硝酸铵、尿素不会干扰三氯乙酸对液态奶蛋白氮的沉淀作用。徐伟等^[24]将 5 mL 牛奶中添加 2 倍滤液含氮量和 1 倍沉淀含氮量两个剂量的三聚氰胺、尿素、硫酸铵 3 种外源非蛋白氮,采用三氯乙酸沉淀处理,凯氏定氮法检测样品中蛋白质含量,其中 3 种干扰物平均回收率分别为 98.4%、100%、99%,表明牛奶经过三氯乙酸沉淀处理后,能有效地排除三聚氰胺、尿素和硫酸铵等非蛋白含氮化合物对测定牛奶中蛋白质含量的干扰。漆亚乔等^[25]比较了丙酮、20%乙酸铅溶液、(3%草酸钾+7%磷酸氢二钠)混合液、15%三氯乙酸溶液等 4 种蛋白氮沉淀剂测定乳粉中非蛋白氮含量的效果,其中三氯乙酸的回收率高达 96.07%,其效果最佳。综上,采用三氯乙酸沉淀蛋白是适用于液态奶中蛋白氮的检测,但液态奶的蛋白属于动物源蛋白,是否适用于植物源的大豆蛋白和小麦蛋白尿素提取液中蛋白氮的检测,尚待研究。

本研究借鉴乳制品中蛋白氮与非蛋白氮的分离方法,以液态奶为对照,采用大豆和小麦等典型的植物蛋白作为

实验样品,在外源非蛋白氮尿素干扰下,采用凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测尿素提取液中蛋白氮含量,分析比较各方法的优缺点,以期解决大豆、小麦蛋白等植物性蛋白氮有尿素干扰下的蛋白检测问题。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

参试样品包括牛奶(市售金典有机奶,购买于北京幸福荣耀超市);大豆蛋白(金龙鱼 G300,益海嘉里金龙鱼食品集团股份有限公司);小麦水溶性组分(实验室制备)。

小麦水溶性组分的制备:由于小麦蛋白中水溶性蛋白含量较低,拟通过制备小麦水溶性组分作为测试样品以提高其蛋白含量,明确方法的适用效果。制备方法如下:采用师栾 02-1 品种小麦样品,按照 NY/T 1094.4—2006《小麦实验制粉 第 4 部分:布勒氏法 用于软麦统粉》制粉,称取 10 g 面粉置于小瓷碗中,加 5 mL 去离子水,1 min 内和成面团,面团用去离子水(50 mL)浸泡软化 10 min 后转移至面筋仪中,启动面筋仪洗涤 5 min,收集洗涤液。5000×g 下离心 15 min,收集上清液。50 °C 条件下旋蒸至原体积的 1/3。-18 °C 冷冻 12 h,冻干机冻干 72 h,放入自封袋密闭保存备用。

尿素、三氯乙酸(纯度为 99%,上海麦克林生化科技股份有限公司);去离子水、生理盐水、BCA 蛋白检测试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 仪器与设备

GM2200 面筋仪(瑞士 Perten 公司);RE-2000A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);ALPHR 1-2 LD 冻干机(德国 CHRIST 公司);DF-101T 集热式恒温加热磁力搅拌器(上海力辰邦西仪器科技有限公司);SHZ-B 水浴恒温振荡器(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司);K1160 凯氏定氮仪(中国海能仪器有限公司);DN2100 杜马斯定氮仪(北京诺

德泰科仪器有限公司)。

1.3 实验方法

为了测试三氯乙酸沉淀大豆和小麦尿素提取液中蛋白氮的效果, 参照 GB/T 21704—2008, 实验设计如表 1 所示。实验分为无外源非蛋白氮(去离子水)组和有外源非蛋白氮(尿素)组。理论上, 三氯乙酸可以沉淀无外源非蛋白氮组参试样品中所有蛋白氮, 离心后使得上清中无蛋白氮。若外源非蛋白氮对三氯乙酸沉淀蛋白氮无影响时, 蛋白氮也将都在沉淀中, 沉淀中氮即为尿素溶液提取出的蛋白氮。通过蛋白氮检测回收率可以验证其效果。氮含量检测方面, 参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》选取凯氏定氮法与杜马斯燃烧法。

表 1 实验设计
Table 1 Experimental design

处理	提取液	提取液中添加三氯乙酸
无外源非蛋白氮组	去离子水	-
无外源非蛋白氮组	去离子水	15%三氯乙酸溶液
有外源非蛋白氮组	6 mol/L 尿素溶液	-
有外源非蛋白氮组	6 mol/L 尿素溶液	15%三氯乙酸溶液

注: -表示无此项。

1.4 去离子水分散

各取 15 mL 牛奶、0.68 g 大豆蛋白、2 g 小麦水溶性组分等样品分别加入到 3 根 50 mL 离心管中, 大豆与小麦蛋白中再分别加入 15 mL 去离子水分散, 手动摇匀并涡旋 5 s, 摇床振荡 10 min, 20000×g 下离心 30 min; 转移上清液, 称重上清液与湿沉淀, 留存备用。

1.5 尿素溶液分散

各取 15 mL 牛奶、0.68 g 大豆蛋白、2 g 小麦水溶性组分等样品分别加入到 3 根 50 mL 离心管中, 大豆与小麦蛋白中分别再加入 15 mL 去离子水分散, 手动摇匀并涡旋 5 s, 加 9 mL 的 6 mol/L 尿素溶液充分溶解参试样品, 摇床振荡 10 min, 20000×g 下离心 30 min; 转移上清液, 10 mL 去离子水洗涤沉淀 2 次, 20000×g 下离心 30 min, 合并上清液, 称量总上清液与湿沉淀, 留存备用。

1.6 三氯乙酸沉淀

选取 1.4、1.5 制备好的上清液, 参照 GB/T 21704—2008 中的方法, 按照参试样品与三氯乙酸溶液体积比为 1:4 添加三氯乙酸溶液, 摇床振荡 10 min, 20000×g 下离心 30 min; 转移上清液。10 mL 去离子水洗涤沉淀 2 次, 20000×g 下离心 45 min, 合并上清液, 称重总上清液与湿沉淀, 留存备用。

1.7 氮的检测

参试样品中总氮采用杜马斯燃烧法检测。选取 1.4~1.6 制备的上清液和沉淀, 每份各 2 g, 分别用凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测其氮元素质量。

1.7.1 凯氏定氮法

参照 GB/T 5009.5—2016, 采用全自动凯氏定氮仪测定样品蛋白含量, 并换算成氮元素含量。

1.7.2 杜马斯燃烧法

参照 GB/T 24318—2009《杜马斯燃烧法测定饲料原料中总氮含量及粗蛋白质的计算》, 采用杜马斯定氮仪测定样品中氮元素质量。

1.7.3 氮元素检测回收率

氮元素检测回收率计算如式(1)和(2)所示:

$$P_1/\% = \frac{m_1 + m_2}{m_3} \times 100\% \quad (1)$$

$$P_2/\% = \frac{m_4}{m_3 - m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中: m_1 为离心后上清中氮的质量, g; m_2 为离心后沉淀中氮的质量, g; m_3 为离心前参试样品中氮的质量, g; m_4 为上清液中添加三氯乙酸后沉淀中氮的质量, g; P_1 为参试样品氮检测回收率, %; P_2 为三氯乙酸沉淀蛋白氮检测回收率, %。

1.8 数据处理

每组实验均设置至少 3 次平行, 采用 Excel 2019 软件计算数据平均值及标准偏差并作图, 采用 IBM SPSS 23.0 统计分析软件进行数据差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 尿素溶液对参试样品氮检测的影响

2.1.1 尿素溶液对参试牛奶氮检测的影响

由表 2 可知, 参试牛奶中氮含量为 6.1 mg/g 样品, 经离心, 凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测出上清中氮含量分别为 3.0 mg/g 样品、3.3 mg/g 样品, 沉淀中氮含量分别为 3.3 mg/g 样品、2.9 mg/g 样品; 以样品中氮含量为 100%计, 上清液中的氮含量占样品总氮百分比分别为 50%、54%, 沉淀中所占的百分比分别为 54%、47%, 上清加沉淀氮检测回收率分别为 103%、100%, 表明离心后凯氏定氮法与杜马斯燃烧法检测氮的回收率较高。两种方法检测结果无显著差异($P>0.05$)。

将氮含量为 6.1 mg/g 样品的参试牛奶分散在尿素溶液中, 经离心, 凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测出上清中氮含量分别为 96.3 mg/g 样品、96.7 mg/g 样品, 沉淀中氮含量分别为 1.5 mg/g 样品、2.0 mg/g 样品; 以样品中氮含量为 100%计, 上清液中的氮含量占样品总氮百分比分别

表 2 参试样品氮检测回收率
Table 2 Nitrogen detection recovery rates of test samples

样品名称	分散溶剂	氮含量/ (mg/g 样品)	占样品总氮 百分比/%	上清中氮				沉淀中氮				样品中氮检测回收率	
				凯氏定氮法		杜马斯燃烧法		凯氏定氮法		杜马斯燃烧法		凯氏 定氮法/%	杜马斯 燃烧法/%
				①/(mg/g 样品)	②/%	①/(mg/g 样品)	②/%	①/(mg/g 样品)	②/%	①/(mg/g 样品)	②/%		
牛奶	水	6.1±0.0	100	3.0±0.3 ^a	50	3.3±0.4 ^a	54	3.3±0.7 ^a	54	2.9±0.1 ^a	47	103	100
	尿素	6.1±0.0	100	96.3±4.5 ^a	1606	96.7±2.4 ^a	1611	1.5±0.0 ^a	25	2.0±0.1 ^a	33	1630	1644
大豆蛋白	水	141.0±0.0	100	64.8±3.3 ^a	46	69.4±1.0 ^a	49	67.4±3.6 ^a	48	64.9±2.5 ^a	46	94	95
	尿素	141.0±0.0	100	2218.6±49.8 ^a	1573	2230.9±56.7 ^a	1582	21.7±2.0 ^a	15	16.7±1.4 ^a	12	1603	1594
小麦水溶性组分	水	29.2±0.1	100	20.4±0.5 ^a	68	20.3±0.1 ^a	67	13.5±1.1 ^a	45	12.3±0.2 ^a	40	113	108
	尿素	29.2±0.1	100	658.4±50.3 ^a	2275	631.8±54.8 ^a	2120	5.5±0.5 ^a	19	6.5±0.1 ^a	21	2298	2142

注：上清中氮表示参试样品经离心后上清液中的氮含量，沉淀中氮表示参试样品经离心后沉淀中的氮含量。不同字母表示同一上清或同一沉淀中氮含量在不同方法检测下差异显著($P<0.05$)，①表示氮含量，②表示占样品总氮百分比，表 3 同。

为 1606%、1611%，沉淀中所占的百分比分别为 25%、33%，上清中氮加沉淀中氮占离心前原料中氮的百分比即样品中氮检测回收率分别高达 1630%、1644%，远远大于在去离子水分散下的氮检测回收率。表明外源非蛋白氮尿素对凯氏定氮法和杜马斯燃烧法检测蛋白氮造成较大影响。凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测结果无显著差异($P>0.05$)。通过沉淀中氮占比计算的上清中氮占比的计算值，凯氏定氮法和杜马斯燃烧法分别为 4.6 mg/g 样品和 4.1 mg/g 样品。

2.1.2 尿素溶液对参试大豆蛋白和小麦水溶性组分氮检测的影响

参照 2.1.1 分析，参试大豆蛋白中氮含量为 141.0 mg/g 样品，经去离子水分散后离心，凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测出上清中氮含量分别为 64.8 mg/g 样品、69.4 mg/g 样品，沉淀中氮含量分别为 67.4 mg/g 样品、64.9 mg/g 样品；其二者样品中氮检测回收率分别为 94%、95%，两种方法检测结果无显著差异($P>0.05$)。尿素分散下参试大豆蛋白氮检测回收率，凯氏定氮法与杜马斯燃烧法分别为 1603%、1594%，上清与沉淀两种方法无显著差异($P>0.05$)。通过沉淀中氮占比计算的上清中氮占比的计算值，凯氏定氮法和杜马斯燃烧法分别为 119.3 mg/g 样品和 124.3 mg/g 样品。

小麦水溶性组分在去离子水分散下，凯氏定氮法和杜马斯燃烧法检测的上清中氮含量分别为 20.4 mg/g 样品、20.3 mg/g 样品，沉淀中氮元素分别为 13.5 mg/g 样品、12.3 mg/g 样品，氮检测回收率分别为 113%、108%，在尿素溶液分散下，凯氏定氮法和杜马斯燃烧法检测的上清中氮元素分别为 658.4 mg/g 样品、631.8 mg/g 样品，沉淀中氮元素分别为 5.5 mg/g 样品、6.5 mg/g 样品，氮检测回

收率分别为 2298%、2142%。两个方法间检测结果均无显著差异($P>0.05$)。通过沉淀中氮占比计算的上清中氮占比的计算值，凯氏定氮法和杜马斯燃烧法分别为 23.7 mg/g 样品和 22.7 mg/g 样品。

2.2 尿素溶液对三氯乙酸沉淀参试样品氮检测的影响

2.2.1 尿素溶液对三氯乙酸沉淀参试牛奶样品氮检测的影响

由表 3 可知，去离子水分散下参试牛奶上清液中氮含量为 3.2 mg/g 样品，三氯乙酸沉淀离心后，凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测出上清中氮含量分别为 0.2 mg/g 样品、0.3 mg/g 样品，沉淀中氮含量分别为 3.5 mg/g 样品、3.3 mg/g 样品；以参试牛奶上清液中氮含量为 52%计，上清液中的氮含量占样品总氮百分比分别为 3%、4%，沉淀中所占的百分比分别为 57%、55%，三氯乙酸沉淀蛋白氮检测回收率分别为 114%、101%，上清与沉淀两种方法检测结果无显著差异($P>0.05$)，表明凯氏定氮法与杜马斯燃烧法检测三氯乙酸沉淀蛋白氮均可达到理想效果。

尿素溶液分散下参试牛奶上清液中氮含量为 4.4 mg/g 样品，三氯乙酸沉淀离心后，凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测出上清中氮含量分别为 98.9 mg/g 样品、94.3 mg/g 样品，沉淀中氮含量分别为 4.5 mg/g 样品、3.9 mg/g 样品；以参试牛奶上清液中氮含量为 71%计，上清液中的氮含量占样品总氮百分比分别为 1621%、1545%，两种方法上清检测结果差异显著($P<0.05$)，沉淀中所占的百分比分别为 74%、63%，两种方法沉淀检测结果无显著差异($P>0.05$)。三氯乙酸沉淀蛋白氮检测回收率分别为 99%、94%，表明上清中的蛋白氮全部被三氯乙酸沉淀下来，尿素对三氯乙酸沉淀蛋白氮此过程无干扰。

表 3 三氯乙酸沉淀蛋白氮检测回收率
Table 3 Recovery rates of protein nitrogen detection by trichloroacetic acid precipitation

样品名称	分散溶剂	氮含量/ (mg/g 样品)	占样品总氮 百分比/%	上清中氮				沉淀中氮				样品中氮检测 回收率	
				凯氏定氮法		杜马斯燃烧法		凯氏定氮法		杜马斯燃烧法		凯氏 定氮法/%	杜马斯 燃烧法/%
				①/(mg/g 样品)	②/%	①/(mg/g 样品)	②/%	①/(mg/g 样品)	②/%	①/(mg/g 样品)	②/%		
牛奶	水	3.2±0.3	52	0.2±0.1 ^a	3	0.3±0.0 ^a	4	3.5±0.2 ^a	57	3.3±0.0 ^a	55	114	101
	尿素	4.4±0.3	71	98.9±0.9 ^a	1621	94.3±1.4 ^b	1545	4.5±0.0 ^a	74	3.9±0.3 ^a	63	99	94
大豆蛋白	水	67.1±3.3	48	2.9±0.0 ^a	2	2.5±0.3 ^{ab}	1	63.0±0.6 ^a	44	68.0±0.0 ^a	48	96	98
	尿素	121.8±3.2	86	2165.9±35.3 ^a	1536	2033.8±9.0 ^b	1442	113.4±1.2 ^a	80	113.5±3.4 ^a	81	95	92
小麦水溶性组分	水	20.4±0.3	68	9.2±0.3 ^a	31	8.9±0.8 ^a	29	21.5±0.2 ^a	72	21.1±5.2 ^a	70	104	105
	尿素	23.2±0.6	80	728.9±21.6 ^a	2446	743.5±36.5 ^a	2495	24.7±0.3 ^a	82	21.4±2.9 ^a	72	101	92

2.2.2 尿素溶液对三氯乙酸沉淀参试大豆蛋白和小麦水溶性组分氮检测的影响

去离子水分散下参试大豆中上清液中氮含量为 67.1 mg/g 样品,三氯乙酸沉淀离心后,凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测出上清中氮含量分别为 2.9 mg/g 样品、2.5 mg/g 样品,沉淀中氮含量分别为 63.0 mg/g 样品、68.0 mg/g 样品;三氯乙酸沉淀蛋白氮检测回收率分别为 96%、98%,沉淀检测结果两种方法无显著差异($P>0.05$)。尿素分散下参试大豆蛋白氮检测回收率,凯氏定氮法与杜马斯燃烧法分别为 95%、92%,沉淀检测结果两种方法无显著差异($P>0.05$)。

去离子水分散下参试小麦水溶性组分中上清液中氮含量为 20.4 mg/g 样品,三氯乙酸沉淀离心后,凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测出上清中氮含量分别为 9.2 mg/g 样品、8.9 mg/g 样品,沉淀中氮含量分别为 21.5 mg/g 样品、21.1 mg/g 样品,三氯乙酸沉淀蛋白氮检测回收率分别为 104%、105%,在尿素溶液分散下分别为 101%、92%。上清与沉淀检测结果两个方法间均无显著差异($P>0.05$)。

3 讨 论

将参试牛奶在去离子水和尿素溶液中分散后并用三氯乙酸沉淀蛋白氮,凯氏定氮法与杜马斯燃烧法检测参试牛奶在去离子水、尿素溶液分散下三氯乙酸沉淀蛋白氮回收率均达到理论值。其中凯氏定氮法的回收率均高于杜马斯燃烧法,说明牛奶样品更适合于凯氏定氮法检测^[26],与刘媛等^[27]的实验结果相似。

通过分析可知,检测尿素干扰下大豆蛋白氮含量时,上清中氮含量受到尿素溶液极大影响,凯氏定氮法与杜马斯燃烧法检测到的氮检测回收率高达 1603%、1594%,远远超过去离子水分散下的氮检测回收率(94%、95%),尽管尿素溶液会提高大豆蛋白的溶解度^[5],而沉淀经过两次洗

涤,凯氏定氮法和杜马斯燃烧法的检测值基本相同,上清液中蛋白氮含量由样品中氮含量减去沉淀中氮含量计算后也基本一致,表明沉淀经去离子水两次洗涤后,可基本去除沉淀中的尿素。上清液中蛋白氮经过三氯乙酸沉淀后,去离子水分散下杜马斯燃烧法测得回收率高于凯氏定氮法检测结果,尿素溶液分散下结果与此相反,且杜马斯燃烧法测得的回收率最低(92%)。

小麦水溶性组分的实验数据结果也表明三氯乙酸可以沉淀小麦水溶性组分中蛋白氮,并且尿素对其过程影响较小。与大豆蛋白不同的是,尿素溶液对其提高溶解度的影响较小,凯氏定氮法、杜马斯燃烧法在其经过三氯乙酸沉淀后的上清液中均检测到不同占比的蛋白氮含量。理论上清液中已无蛋白氮,且本研究是取适量的上清液烘干后干物质进行蛋白氮检测,总上清液蛋白氮含量是由适量上清液中蛋白氮含量扩大计算而得,但适量干物质中蛋白氮含量极少,受仪器检测下限的影响,检测出的极少检测数值已无参考意义,因此会呈现出较高的蛋白氮计算结果,在此也表明凯氏定氮法、杜马斯燃烧法等仪器检测氮含量的局限性^[28-30]。

4 结 论

本研究参照 GB/T 21704—2008 中的分离方法,验证此方法对大豆蛋白、小麦水溶性组分的适用性,并计算回收率。数据结果表明:

(1)无外源非蛋白氮分散下,三氯乙酸均可用来沉淀大豆蛋白、小麦水溶性组分中蛋白氮,其中凯氏定氮法检测出的回收率(96%、104%)均略低于杜马斯燃烧法检测出的样品中氮检测回收率(98%、105%)。

(2)有外源非蛋白氮分散下,三氯乙酸也均可沉淀大豆蛋白、小麦水溶性组分中的蛋白氮,其中凯氏定氮法检

测出的回收率(95%、101%)均略高于杜马斯燃烧法检测出的样品中氮检测回收率(92%、92%),尿素对其三氯乙酸沉淀蛋白氮此过程无影响。

(3)将凯氏定氮法、杜马斯燃烧法检测结果结合起来看,当有外源性非蛋白氮(尿素)干扰时,经过洗涤沉淀操作,大豆蛋白、小麦水溶性组分两者中的上清蛋白氮含量可由总氮减去沉淀中氮含量计算而得。

本研究所得结论可为检测大豆和小麦等植物性蛋白氮提供一定的理论支持,当面对有外源性氮干扰时,通过对样品进行预处理(三氯乙酸沉淀蛋白氮),即可排除外源性氮对蛋白检测结果的影响。

参考文献

- [1] IWAKI S, FU BX, HAYAKAWA K. Behavior of protein aggregates via electrostatic interactions or hydrogen bonds during dough formation [J]. *J Cereal Sci*, 2023, 111: 103683.
- [2] HONG T, TAN Z, YANG T, *et al.* Dynamic behavior of zein-gluten interaction during extruded noodle processing [J]. *Food Hydrocolloid*, 2024, 147: 109320.
- [3] LIU H, LIANG Y, CHEN Z, *et al.* Effect of curdlan on the aggregation behavior of gluten protein in frozen cooked noodles during cooking [J]. *J Cere Sci*, 2022, 103: 103395.
- [4] 赵方园, 郭兴凤, 赵树超, 等. 加工条件对醇法大豆浓缩蛋白溶解性及结构的影响[J]. *中国油脂*, 2023, 48(10): 57–63, 70.
ZHAO FY, GUO XF, ZHAO SC, *et al.* The effect of processing conditions on the solubility and structure of alcohol based soy protein concentrate [J]. *Chin J Fat*, 2023, 48(10): 57–63, 70.
- [5] KORKMAZ F, BARIŞ TN, KOCABIYIK H. The effect of infrared radiation on gluten aggregation and pasting properties of wheat flours with different protein content [J]. *J Cere Sci*, 2021, 102: 103365.
- [6] 曲敏, 姜佩秀, 贾圆芳, 等. 热诱导下小麦蛋白结构与功能性质变化研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(15): 11–19.
QU M, JIANG PX, JIA YF, *et al.* Research progress on changes in the structure and functional properties of wheat protein under heat induction [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(15): 11–19.
- [7] YAO Y, JIA Y, LU X, *et al.* Release and conformational changes in allergenic proteins from wheat gluten induced by high hydrostatic pressure [J]. *Food Chem*, 2022, 368: 130805.
- [8] ZHANG C, WANG M, TAN Z, *et al.* Differential distribution of surface proteins/lipids between wheat A- and B-starch granule contributes to their difference in pasting and rheological properties [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 240: 124430.
- [9] ZHANG LL, GUAN EQ, ZHANG KG, *et al.* The aggregation characteristics of wheat globulin induced by heating and edible salts and its effects on noodle processing quality [J]. *LWT*, 2022, 154: 112803.
- [10] PENG P, WANG X, ZOU X, *et al.* Dynamic behaviors of protein and starch and interactions associated with glutenin composition in wheat dough matrices during sequential thermo-mechanical treatments [J]. *Food Res Int*, 2022, 145: 110986.
- [11] QU M, JIANG P, ZHU Y, *et al.* Effects of glutenin/gliadin ratio and calcium ion on the structure and gelatinity of wheat gluten protein under heat induction [J]. *Food Biosci*, 2024, 58: 103704.
- [12] YANG YL, GUAN EQ, ZHANG TJ, *et al.* Behavior of wheat flour dough at different pretreated temperatures through rheological characteristics and molecular interactions of proteins [J]. *Food Chem*, 2023, 404(Pt A): 134188.
- [13] DENT T, CAMPANELLA O, MALEKY F. Enzymatic hydrolysis of soy and chickpea protein with alcalase and flavourzyme and formation of hydrogen bond mediated insoluble aggregates [J]. *Curren Res Food Sci*, 2023, 6: 100487.
- [14] SONG MK, GUO XN, ZHU KX. Insights into heat-induced molecular-level interactions between wheat and common buckwheat proteins [J]. *Food Chem*, 2023, 404(Pt B): 134730.
- [15] LI M, LIU C, ZHENG X, *et al.* Interaction between A-type/B-type starch granules and gluten in dough during mixing [J]. *Food Chem*, 2021, 1: 358.
- [16] 王天武, 王腾达, 张玉晶, 等. 非蛋白氮在反刍动物生产中的研究进展[J]. *饲料研究*, 2023, 46(7): 138–141.
WANG TW, WANG TD, ZHANG YJ, *et al.* Research progress on non protein nitrogen in ruminant production [J]. *Feed Res*, 2023, 46(7): 138–141.
- [17] 吴红岩, 郭同军, 张俊瑜, 等. 三聚氰胺的毒性和检测方法的研究进展[J]. *养殖与饲料*, 2019, 3: 54–57.
WU HY, GUO TJ, ZHANG JY, *et al.* Research progress on toxicity and detection methods of melamine [J]. *Anim Breed Feed*, 2019, 3: 54–57.
- [18] ROVINA K, SIDDIQUEE S. A review of recent advances in melamine detection techniques [J]. *J Food Compos Anal*, 2015, 43: 25–38.
- [19] LOCK J, DAVIS J. The determination of disulphide species within physiological fluids [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2002, 21(12): 807–815.
- [20] 侯向昶, 董浩, 罗东辉, 等. 乳与乳制品中蛋白质检测方法的研究现状与进展[J]. *乳业科学与技术*, 2013, 36(3): 28–31.
HOU XC, DONG H, LUO DH, *et al.* Research status and progress of protein detection methods in milk and dairy products [J]. *Dairy Sci Technol*, 2013, 36(3): 28–31.
- [21] 陈永元, 乐琼. 乳制品中非蛋白氮含量测定的不确定度评定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(2): 829–833.
CHEN YY, LE Q. Evaluation of uncertainty in the determination of non protein nitrogen content in dairy products [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(2): 829–833.
- [22] 方韶昀. 乳品中非蛋白氮检测的意义和方法[J]. *现代食品*, 2016, (12): 32–33.
FANG SY. The significance and method of detecting non protein nitrogen in dairy products [J]. *Mod Food*, 2016, (12): 32–33.
- [23] 牛巍, 侯彩云, 祝晓芳, 等. 三氯乙酸沉淀法与硫酸铜沉淀法在液态奶蛋白质检测中适用性研究[J]. *中国乳品工业*, 2009, (9): 59–61.
NIU W, HOU CY, ZHU XF, *et al.* Study on the applicability of trichloroacetic acid precipitation method and copper sulfate precipitation method in liquid milk protein detection [J]. *China Dairy Ind*, 2009, (9): 59–61.
- [24] 徐纬, 聂四平, 李军, 等. 甲醛-三氯乙酸沉淀-凯氏定氮法测定牛奶中真蛋白质[J]. *理化检验(化学分册)*, 2015, 51(1): 31–34.
XU W, NIE SP, LI J, *et al.* Formaldehyde trichloroacetic acid precipitation

- Kjeldahl method for the determination of true protein in milk [J]. *Phys Chem Test (Chem Div)*, 2015, 51(1): 31–34.
- [25] 漆亚乔, 彭名军, 黄秋婷, 等. 4 种蛋白质沉淀剂测定乳粉中非蛋白氮含量的效果[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(16): 5736–5741.
- QI YQ, PENG MJ, HUANG QT, *et al.* The effect of four protein precipitants on the determination of non protein nitrogen content in milk powder [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(16): 5736–5741.
- [26] 任国谱, 孟宪娇, 余兵, 等. 生鲜乳及工业奶粉中酸溶性非蛋白氮质量分数的测定[J]. *中国乳品工业*, 2010, 38(5): 42–45.
- REN GP, MENG XJ, YU B, *et al.* Determination of acid soluble non protein nitrogen mass fraction in fresh milk and industrial milk powder [J]. *China Dairy Ind*, 2010, 38(5): 42–45.
- [27] 刘媛, 王健, 李研东, 等. 不同沉淀方法对牛乳中蛋白质质量分数测定的影响[J]. *中国乳品工业*, 2014, 42(1): 59–61.
- LIU Y, WANG J, LI YD, *et al.* The influence of different precipitation methods on the determination of protein mass fraction in milk [J]. *China Dairy Ind*, 2014, 42(1): 59–61.
- [28] 王金灿. GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》之 5.1 凯氏定氮法具体操作疑难解析[J]. *食品安全导刊*, 2018, (30): 42.
- WANG JC. GB 5009.5 — 2016 *National food safety standard-Determination of protein in food* 5.1 analysis of specific difficulties in Kjeldahl nitrogen determination method [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2018, (30): 42.
- [29] 班雁华, 陈桂鸾, 刘晓瞳, 等. 杜马斯燃烧法与凯氏定氮法测定含氨基酸肥料中氮含量的比较[J]. *肥料与健康*, 2023, 50(5): 73–76.
- BAN YH, CHEN GL, LIU XT, *et al.* Comparison of nitrogen content in amino acid containing fertilizers determined by Dumas combustion method and Kjeldahl nitrogen determination method [J]. *Fertiliz Health*, 2023, 50(5): 73–76.
- [30] 易善平, 石盼盼, 罗莉, 等. 杜马斯燃烧法快速测定乳制品的含氮量[J]. *现代食品*, 2016, (24): 107–110.
- YI SP, SHI PP, LUO L, *et al.* Rapid determination of nitrogen content in dairy products using Dumas combustion method [J]. *Mod Food*, 2016, (24): 107–110.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



范 震, 硕士研究生, 主要研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。
E-mail: 1491370421@qq.com



李慧静, 教授, 主要研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。
E-mail: huijingli2002@163.com