原料奶、婴儿配方奶粉及酸奶中蛋白去除效果的研究

丁晓静*[1,3] 杨媛媛[1,2] 李 芸[1,3] 赵 珊[1] 王 志*[2]

[1](北京市疾病预防控制中心, 北京 100013) [2](河北农业大学食品科学与技术学院, 保定 071001)

[3](首都医科大学公共卫生与家庭医学学院, 北京 100069)

摘 要 建立了毛细管电泳法分析 α-乳白蛋白、β-乳球蛋白 A 及 β-乳球蛋白 B 的方法,考察了不同浓度冰乙酸(HAc)及三氯乙酸(TCA)对原料奶、婴儿配方奶粉 A 和 B 及酸奶中蛋白的去除效果。结果表明,TCA 去除蛋白效果优于 HAc,不同样品所需 TCA 浓度不同:2 g 原料奶需 3 mL 100 g/L TCA;0.5 g 婴儿配方奶粉 A 和 B 分别需 5 mL 10 g/L 及 20 g/L TCA;2 g 酸奶则需 3 mL 20 g/L TCA 才能将蛋白完全沉淀。为原料奶、婴儿配方奶粉及酸奶等乳制品的样品前处理提供了有价值的参考。

关键词 乳制品; 婴儿配方奶粉; 酸奶; 蛋白质; 毛细管电泳

1 引 言

色谱法分析原料奶、婴儿配方奶粉及酸奶等乳制品中有益或有害化学成分时,必须除去其中的蛋白以得到准确结果,因为蛋白很容易在色谱柱上产生不可逆吸附,导致柱效下降。牛奶蛋白主要由酪蛋白和乳清蛋白组成,其中酪蛋白约占总蛋白的 80%,乳清蛋白约占 15%。乳清蛋白是酪蛋白沉淀后上清液中含有的蛋白[1],主要由 α-乳白蛋白(α-Lac)、β-乳球蛋白(β-Lg)、免疫球蛋白 G (IgG)和牛血清白蛋白(BSA)组成。其中 α-Lac 约占乳清蛋白的 3%,β-Lg 约占 9%,IgG 约占 2%,BSA 约占 1%,其它为非蛋白氮(NPN)[2]。而 β-Lg 又由 β-LgA 及 β-LgB 组成。

冰乙酸(HAc)及三氯乙酸(TCA)是常用蛋白沉淀剂。文献报道的使用量一般为 1%[3,4],该用量能否将上述 3 种样品中的蛋白去除干净,需分析蛋白沉淀后的样品上清液中是否仍有蛋白残留。因此,有必要建立能够准确测定乳清蛋白中含量较高的 α-Lac, β-LgA 及 β-LgB 的方法,以监测去除蛋白前后 3 种蛋白含量的变化,获知蛋白的去除效果。

毛细管电泳(CE)法因其非常适合蛋白分析而成为首选方法。常用的 CE 法一般利用涂层管或裸管,通过往分离缓冲液中添加高分子聚合物以实现蛋白分离[5,6]。有关 α-Lac, β-LgA 及 β-LgB 分离的研究已见报道[7,8],但无定量数据。本研究建立了 CE 同时分离并测定 α-Lac, β-LgA 及 β-LgB 的方法,考察了 HAc 和 TCA 对原料奶、婴儿配方奶粉及酸奶中蛋白的去除效果。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE 5000 型毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司),配备紫外检测器;P/ACE 工作站;F-33 pH/mV 型酸度计(北京屹源电子仪器科技公司);Universal 32 型离心机(德国 Hettich 公司);Millipore Milli-Elix/RiOs 型超纯水器(美国 Millipore 公司);旋涡混合器(法国 Gilson 公司)。

硼酸(优级纯,铁岭地区开源化工厂);CsOH·H_2O(99.5%,北京百灵威化学技术有限公司);冰乙酸(99%)和 NaOH(北京化学试剂公司);羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD, 分子量:1540 g/mol),聚氧化乙烯(PEO,分子量:4000 kg/mol), α-Lac, β-LgA 及 β-LgB(Sigma-Aldrich 公司)。原料奶采自当地奶牛场,婴儿配方奶粉及大果粒酸奶购于当地超市。

2 g/L PEO 储备液:称取 0.2 g PEO 于 100 mL 试剂瓶中, 加入 100 mL 水后于 50 ℃水浴中加热直至溶解,摇匀后于室温放置备用。α-Lac, β-LgA 及 β-LgB 储备液:准确称取 10 mg α-Lac, 10 mg β-LgA

2009-04-10 收稿;2009-07-23 接受
本文系北京市卫生局青年基金(No. QN2007-13)和北京市卫生局"十百千"基金资助
* E-mail: dingxiaojing@gmail.com; wangzhi@hebau.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

及10 mg β-LgB于1.5 mL塑料离心管中,分别加入1 mL水溶解,得到质量浓度为10 g/L的标准储备液。短期保存可置于4 ℃冰箱,若长时间保存,则将标准储备液分装后于-20 ℃冻存。工作液由储备液经0.05 mol/L HAc稀释后制得。

2.2 电泳条件

2.2.1 测定条件 毛细管(50 μm×57 cm有效长度:50 cm,河北永年锐沣色谱配件有限公司)。分离缓冲液:0.5 mol/L H_3BO_3 + 0.025 mol/L HP-β-CD + 0.8 g/L PEO, pH 9.10 (1 mol/L CsOH调节);样品介质:0.05 mol/L HAc。分离电压:14 kV;检测波长:214 nm;操作温度:25 ℃;进样压力及时间:3.448 kPa, 5 s; 工作电流: 约80 μA。

2.2.2 毛细管的预处理 新的毛细管分别用1 mol/L NaOH洗15 min、水洗5 min及分离缓冲液洗10 min。每次进样前,分别用0.1 mol/L NaOH及分离缓冲液洗15 min,以保证方法的重现性。

3 结果与讨论

3.1 分离缓冲液及pH、添加剂的选择

α-Lac, β-LgA及β-LgB的分子量分别为14.178, 18.363及18.276 kDa,等电点(pI)分别为4.4, 5.1及5.2[9],均属酸性蛋白,通过调节分离缓冲液的pH值,使之高于3种蛋白的等电点,3种蛋白带负电,而毛细管壁表面也带负电,从而减少吸附[10]。由于3种蛋白均为糖基化蛋白,易于与 BO_3^{3-} 形成带负电的络离子,能进一步增加与毛细管壁的库仑排斥力,因此分离缓冲体系选用硼酸盐缓冲体系可减少吸附。另外,高浓度硼酸盐还可以改善分离,然而,硼酸盐的浓度过高将产生较多的焦耳热,引起色谱峰展宽,本实验表明 H_3BO_3 的最佳浓度为0.5 mol/L,如此高的浓度限制了分离缓冲液的pH值,分离缓冲液的最佳pH为9.10,此时3种蛋白在管壁的吸附仍未得到有效抑制。本研究将PEO及HP-β-CD作为分离缓冲液添加剂联合使用,既有效抑制了吸附又改善了3种蛋白与杂质间的分离,经优化,PEO及HP-β-CD的最佳浓度分别为0.8 g/L及0.025 mol/L。在上述最佳分离条件下,3种蛋白均得到很好的分离。

3.2 校准曲线、线性范围、精密度、检出限及定量限

在上述最佳电泳条件下,分别将3种蛋白的标准储备液用0.05 mol/L HAc稀释成50,100,150,200,250和400 mg/L的α-Lac、β-LgA及β-LgB工作液,依次注入电泳仪,外标法定量,峰面积(A)与质量浓度(ρ, mg/L)具有良好的线性关系,线性回归方程分别为α-Lac: $A = 301.2\rho - 5091.3$; β-LgA: $A = 391.56\rho - 7310$; β-LgB: $A = 275.64\rho - 3833.8$。线性相关系数分别为0.9980,0.9991和0.9994; 线性范围均为50~400 mg/L;检出限($S/N = 3$)分别为10,15和12 mg/L;定量限($S/N = 10$)分别为30,50和40 mg/L。

分别将质量浓度均为60, 100和200 mg/L的3种蛋白的混合标准溶液, 连续进样7次,所得迁移时间的相对标准偏差(RSD)分别为:α-Lac:0.64%,0.38%和0.18%;β-LgA:0.79%,0.47%和0.16%;β-LgB:0.74%, 0.42%和0.13%。峰面积的RSD分别为α-Lac:3.8%,1.6%和1.9%;β-LgA:4.3%, 1.8%和2.5%;β-LgB:3.2%,4.4%和1.2%。

3.3 加标回收率

由于酸奶中α-Lac的含量较低,且不含β-LgA及β-LgB,因此,以酸奶样品为本底,测定本方法的回收率,以验证方法的准确度。加标质量浓度为50 mg/L时,α-Lac,β-LgA及β-LgB的回收率分别为116.8%,98.5%及108.5%,相应的相对标准偏差(RSD, $n = 5$)分别为7.2 %, 8.6 %及10.8%。加标质量浓度为150 mg/L时,α-Lac,β-LgA及β-LgB的回收率分别为111.7%,95.6%及90.7%,相应的RSD分别为3.0%,1.8%及4.2%。回收率的结果进一步证明0.05 mol/L HAc只能沉淀酪蛋白,而不能沉淀上述3种蛋白。

3.4 实际样品分析

在上述最佳分离条件下,分别对5个原料奶样品中的3种蛋白进行测定。结果列于表1中。本方法成功地测定了乳清蛋白中的α-Lac, β-LgA及β-LgB,因此,可用于监测HAc或TCA对蛋白的去除效果,以利于色谱分析。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　原料奶中 3 种蛋白的测定结果

Table 1　Determination results of α-Lac, β-LgA and β-LgB in raw milk

样品 Sample	CE Value (g/L)		
	α-Lac	β-LgA	β-LgB
1	1.68	2.28	2.13
2	1.65	2.33	1.99
3	1.70	2.03	1.60
4	1.62	1.84	1.47
5	1.67	2.04	1.67

α-Lac: α-lactalbumin; β-LgA: β-lactoglobulin A; β-LgB: β-lactoglobulin B.

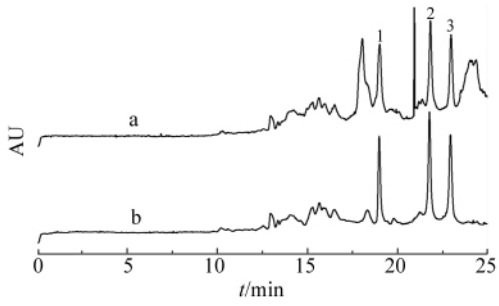

图 1　1 g 原料奶分别用 4 mL 水稀释(a)和用 4 mL 0.05 mol/L HAc 处理(b)后的电泳图

Fig. 1　Electrophoregram of 1 g of raw milk diluted with (a) 4 mL water and (b) pretreated with 4 mL 0.05 mol/L HAc

1. α-Lac; 2. β-LgB; 3. β-LgA。电泳条件(CE conditions):毛细管(Capillary) 50 μm×57 cm,有效长度(Effective length): 50 cm;分离缓冲溶液(Separation buffer): 0.5 mol/L H_3BO_3 +0.025 mol/L HP-β-CD + 0.8 g/L PEO 400 0000, pH 9.1 (1 mol/L CsOH);样品介质(Sample buffer): 0.05 mol/L HAc;分离电压(Separation voltage):14 kV;检测波长(Detection wavelength): 214 nm;进样压力及时间(Inject pressure and time): 3.448 kPa×5 s。

3.5　HAc 沉淀蛋白的效果　由于牛乳是一种连续相为水、分散介质为胶体的乳浊液,具有复杂的物理化学性质[11]。必须将原料奶处理成澄清液才能进入色谱系统。HAc 是常用的蛋白沉淀剂,但至今未见 HAc 沉淀何种蛋白的报道。为证实 HAc 沉淀原料奶中何种蛋白,在 1 g 原料奶中分别加入 4 mL 水稀释后直接进样和用 4 mL 0.05 mol/L HAc 处理并于 10000 r/min 离心 10 min 后取上清液直接进样的结果进行对比。如图 1 所示,用 0.05 mol/L HAc 处理原料奶可去除大量酪蛋白,而 α-Lac, β-LgA 及 β-LgB 并未被除掉,均留在上清液中。

为获得乳清蛋白中 α-Lac, β-LgA 及 β-LgB 完全沉淀所需 HAc 浓度,分别以 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 2.0 和 5.0 mol/L 的 HAc(3 mL)处理 2 g 原料奶,均得到澄清的样品溶液,表明共存的大量酪蛋白被去除,当 HAc 浓度在 0.05 ~ 0.2 mol/L 时,3 种蛋白峰的峰高基本不变;但当 HAc 浓度增至 0.4 mol/L 时, 3 种蛋白的峰高开始降低,表明 3 种蛋白开始被高浓度 HAc 沉淀;当 HAc 浓度增至 5 mol/L 时,3 种蛋白被完全沉淀。因此,如果用于 α-Lac, β-LgA 及 β-LgB 的分析研究,则 0.05 ~ 0.2 mol/L HAc 沉淀原料奶中的酪蛋白即可,不会造成上述 3 种蛋白的损失;但如果用于原料奶中化学成分的分析,则需使用较高浓度 HAc 将 α-Lac, β-LgA 及β-LgB 除去,因为它们易被不可逆地保留在色谱柱上,将导致柱效逐渐下降直至完全失效。

由于 α-Lac 能提供最接近母乳的氨基酸组合,提高蛋白质的生物利用率,降低蛋白质总量, 从而有效减轻肾脏负担;同时 α-HAc 还促进婴儿的大脑发育,因而经常被添加到婴幼儿配方奶粉中。一些婴幼儿对牛奶不耐受,主要是对 β-LgA 和 β-LgB 不耐受,这两种蛋白是主要的过敏原[12]。因此,配方奶粉在加工过程中去除了这两种蛋白并添加了利于婴儿健康成长的营养成分,这些添加组分干扰 β-LgA 及 β-LgB 的准确测定,只能通过 α-Lac 监测 HAc 对婴儿配方奶粉中蛋白的去除效果。

图 2A 和图 2B 分别为 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 和 0.4 mol/L Hac(5 mL)处理 0.5 g 婴儿配方奶粉 A 和 B 时蛋白的去除效果。由图 2 可见:婴儿配方奶粉 A 和 B 经 HAc 处理后,均得到了澄清的样品溶液,共存的大量酪蛋白被去除,其中的 α-Lac 未被沉淀,而保留在上清液中。但当用于沉淀婴儿配方奶粉 A 中蛋白的 HAc 浓度增至 0.4 mol/L、用于沉淀婴儿配方奶粉 B 中蛋白的 HAc 浓度增至 0.2 mol/L 时,溶液开始变浑浊,表明已经沉淀的蛋白因酸性增加而重新溶解;而 α-Lac 仍未被除去,说明婴儿配方奶粉中的添加剂不会影响酪蛋白的沉淀,但会使 α-Lac 不易被沉淀。

分别用 3 mL 0.025 ~ 1.5 mol/L HAc 处理 2 g 大果粒酸奶,均可得到澄清的样品溶液。共存的大量酪蛋白被去除,上清液中仅含 α-Lac,不含 β-LgA 及 β-LgB,这也证明对牛奶过敏的人对酸奶则不过敏。当 HAc 浓度在 0.05 ~ 0.2 mol/L 时,α-Lac 的峰高基本不变。但当 HAc 浓度增至 0.4 mol/L 时,α-Lac 的峰高开始降低,表明它开始被高浓度 HAc 沉淀。当 HAc 浓度增至 1.5 mol/L 时,α-Lac 被完全沉淀。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

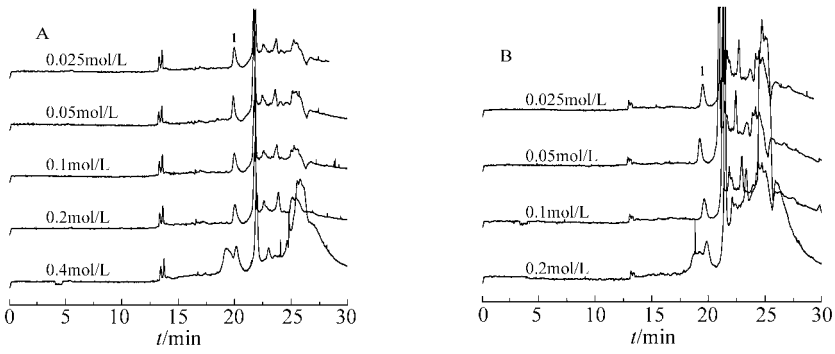

图2 经 HAc 处理 0.5 g 婴儿配方奶粉 A 和 B 的毛细管电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of different concentrations of acetic acid on the extraction of 0.5 g of infant formula A and B

1. α-Lac. **电泳条件同图1**(Other conditions are the same as in Fig. 1)。

3.6 TCA 沉淀蛋白的效果

TCA 的酸性强于 HAc($pK_a = 0.5$, $I = 0.1$),3 mL 2 g/L TCA 即可沉淀 2 g 原料奶中的酪蛋白,离心后得到澄清的上清液。如图 3 所示,α-Lac,β-LgA 及 β-LgB 未被沉淀,通过峰面积比较发现,2 g/L TCA 去除 2 g 原料奶中蛋白效果与 0.05 mol/L HAc 的去除效果相当,说明 2 g/L TCA 处理原料奶仅仅沉淀了酪蛋白。然而,随着其质量浓度的增加,α-Lac 先被沉淀,β-LgA 及 β-LgB 后被沉淀。一般 2 g 原料奶需 3 mL 100 g/L TCA 以保证蛋白被去除干净。图4A 及4B 为用 5 mL 不同质量浓度 TCA 处理 0.5 g 婴儿配方奶粉 A 和 B 时蛋白的去除效果。由图 4A 可见:用 5 mL 2 ~ 10 g/L TCA 处理 0.5 g 婴儿配方奶粉 A,当 TCA 浓度为 2 g/L 时样品溶液浑浊,表明酪蛋白未被完全去除,α-Lac 与杂质峰重叠在一起;当 TCA 浓度增至 3 g/L 时,所得样品溶液依然浑浊,但杂质峰变低,α-Lac 显现,仍无法与杂质达基线分离;当 TCA 浓度为 5 ~ 10 g/L 时,均能得到澄清的样品溶液,当 TCA 质量浓度增至 10 g/L 时,α-Lac 被完全沉淀。图4B 为用 5 mL 2 ~ 20 g/L TCA 处理 0.5 g 婴儿配方奶粉 B 的效果,TCA 浓度为2 g/L 时,溶液浑浊,α-Lac 与未沉淀的杂质不能达基线分离;TCA 浓度为 3 g/L 时,溶液澄清,酪蛋白去除干净;TCA 浓度为 5 ~ 10 g/L 时,溶液渐渐浑浊,已经沉淀的蛋白又重新溶解;继续将 TCA 的浓度增至 20 g/L,溶液变澄

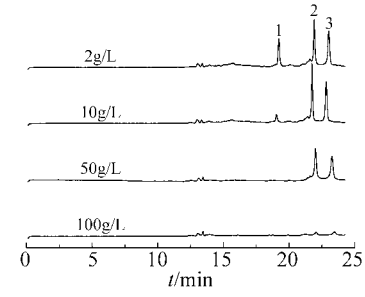

图3 经不同质量浓度 TCA 沉淀原料奶中蛋白的毛细管电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of different concentrations of trichloroacetic acid (TCA) on the removal of proteins in 2 g of raw milk

1. α-Lac; 2. β-LgB; 3. β-LgA。**电泳条件同图1**(Other conditions are the same as in Fig. 1)。

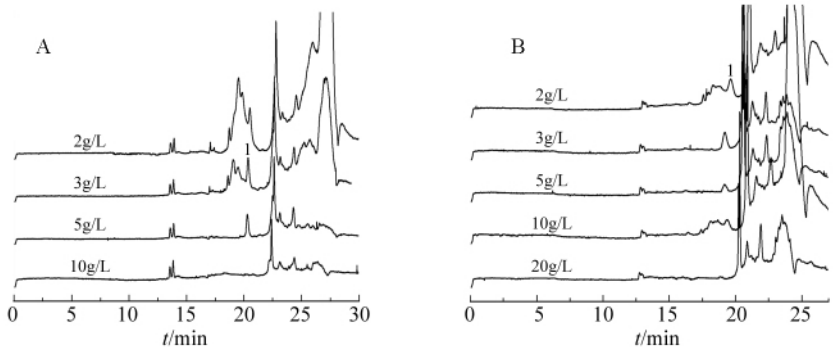

图4 不同质量浓度 TCA 去除 0.5 g 婴儿配方奶粉 A 和 B 中蛋白的结果

Fig. 4 Different concentrations of TCA on the removal of proteins in 0.5 g of infant formula A and B

1. α-Lac. **电泳条件同图1**(Other conditions are the same as in Fig. 1)。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

清,同时 α-Lac 也被完全沉淀。由此可见,不同婴儿配方奶粉沉淀蛋白所需 TCA 浓度不同。

用 3 mL 2 ~ 20 g/L TCA 处理 2 g 国产大果粒酸奶,均可得到澄清的样品溶液,共存的大量酪蛋白被去除。随着 TCA 浓度的增加,α-Lac 的峰高逐渐减小;当 TCA 浓度增至 20 g/L 时,α-Lac 被完全沉淀。

综上可知,由于 HAC 能够在很宽的浓度范围内保证 α-Lac,β-LgA 及 β-LgB 不被沉淀,因此,无论是原料奶、婴儿配方奶粉还是酸奶样品,若测定其中的 α-Lac,β-LgA 及 β-LgB,则 HAc 是较好的选择,但若沉淀蛋白,则 TCA 是较好的选择。不同样品所需 TCA 的浓度不同,用于色谱分析时应分别优化 TCA 的浓度及用量。

References

1 JIN Su-Yu(金素钰), ZHENG Yu-Cai(郑玉才), MA Wui(马 崑), LIU Sha(刘 沙), HU Qiang(胡 强). *Hubei Agricultural Sciences*(湖北农业科学), **2006**, 45(5): 641 ~ 643

2 Chatterton D E W, Nielsen, K E, Holst H H, Bertelsen H, Albertsen K. *α-Lactalbumin-A Protein Ingredient for Use in Infant nutrition*, 25th International Dairy Congress Denmark. Proceedings-New Developments in Dairy Science and Technology, **1998**: 1 ~ 5

3 National Standard of the People's Republic of China(中华人民共和国国家标准). *Determination of Melamine in Raw Milk and Dairy Products*(原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法), GB/T 22388-2008

4 Yan N, Zhou L, Zhu Z F, Chen X G. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57: 807 ~ 811

5 LU Hao-Jie(陆豪杰), KANG Jing-Wu(康经武), YANG Yong-Tan(杨永坛), OU Qing-Yu(欧庆瑜). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **1999**, 27(5): 585 ~ 588

6 ZHANG Zhi-Wu(张智武), XU Jian-Xiang(许建香). *China Dairy Industry*(中国乳品工业), **2005**, 33(8): 51 ~ 55

7 Kinghorn N M, Paterson G R, Otter D E. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 723: 371 ~ 379

8 Gonzalez N, Elvira C, Roman J S, Cifuentes A. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1012: 95 ~ 101

9 Lucy C A, MacDonald A M, Gulcev M D. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1184: 81 ~ 105

10 Eva M, Villar A, Tanyanyiwa J, Abedul T F, García A C, Hauser P C. *Anal. Chem.*, **2004**, 76: 1282 ~ 1288

11 GUO Ben-Heng(郭本恒). *Dairy Chemistry*(乳品化学). Beijing(北京): China Light Industry Press(中国轻工业出版社), **2001**: 26 ~ 26

12 LI Hui(李 惠), CHEN Min(陈 敏), LI He(李 赫), LUO Yong-Kang(罗永康), DAI Yun-Qing(戴蕴青). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **2007**, 25(1): 116 ~ 117

Investigation of Removal of Proteins in Raw Milk, Infant Formula and Yogurt

DING Xiao-Jing*[1,3], YANG Yuan-Yuan[1,2], LI Yun[1,3], ZHAO Shan[1], WANG Zhi*[2]

[1](*Beijing Center for Disease Prevention and Control*, *Beijing* 100013)

[2](*College of Food Science and Technology*, *Agricultural University of Hebei*, *Baoding* 071001)

[3](*Department of Public Health and Domestic Medicine*, *Capital Medical University*, *Beijing* 100069)

Abstract On the basis of the development of a new CE method for the analysis of α-lactalbumin(α-Lac), β-lactoglobulin A(β-LgA) and β-lactoglobulin B(β-LgB), different concentrations of acetic acid (HAc) and trichloroacetic acid (TCA) for the removal of proteins in raw milk, infant formula A and B, and yogurt were investigated. It was shown that TCA is better than HAc for eliminating of proteins in the above four samples. The proteins in 2 g of raw milk could be eliminated by 3 mL of 100 g/L TCA. 0.5 g of infant formula A and B needs 5 mL of 10 g/L and 20 g/L TCA to remove the proteins, respectively. For 2 g of yogurt, 3 mL of 20 g/L TCA is enough. The present research may provide valuable information for protein-containing sample (such as raw milk, infant formula and yogurt) pretreatment.

Keywords Raw milk; Infant formula; Yogurt; Protein; Capillary electrophoresis

(Recived 10 April 2009; accepted 23 July 2009)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net