

高通量快速检测母乳总蛋白、乳清蛋白和酪蛋白含量方法的比较研究

董学艳,姜铁民,刘继超,陈历俊*

(国家母婴乳品健康工程技术研究中心,北京市乳品工程技术研究中心,
北京三元食品股份有限公司,北京 100163)

摘要:分别利用 Lowry、BCA 和 Bradford 三种方法对母乳中总蛋白、乳清蛋白和酪蛋白的含量进行了测定,并以凯氏定氮法为标准,对三种方法的检测结果进行了比较。结果表明 Lowry 和 Bradford 法适用于母乳中总蛋白含量的测定,Lowry 法适于母乳中乳清蛋白含量的测定,Lowry、BCA 和 Bradford 三种方法均适用于母乳中酪蛋白含量的测定。采用上述方法,只需要 4 mL 母乳样本,1.5 h 内即可完成母乳总蛋白、乳清蛋白和酪蛋白的微量、高通量快速测定。上述方法适用于较大数量母婴营养状况的调查研究,可为母乳化婴幼儿配方乳粉的研制以及促进婴幼儿生长发育提供科学依据。

关键词:母乳,总蛋白,乳清蛋白,酪蛋白,快速测定

A comparative study of rapid and high-throughput detection method for total protein, whey protein and casein in human milk

DONG Xue-yan, JIANG Tie-min, LIU Ji-chao, CHEN Li-jun*

(National Health Engineering Research Center for Maternal and Infant Dairy, The Dairy Engineering and Technology Research Center of Beijing, Beijing Sanyuan Foods Co., Ltd, Beijing 100163, China)

Abstract: The contents of human milk total protein, whey protein and casein were determined using Lowry, BCA and Bradford, respectively, and the results were compared with the Kjeldahl. The results showed that both Lowry and Bradford methods were suitable for determination of total protein content, while the whey protein content determined using Lowry method was closer to Kjeldahl. Lowry, BCA and Bradford methods were applicable for determination of the content of casein. Adopt the above-mentioned methods, the contents of human milk total protein, whey protein and casein can be rapidly determined within 1.5 h using only 4 mL human milk. These methods were suitable for the investigation of a large number of maternal and child nutritional status so that it provided the scientific basis for the development of human milk simulated infant formula and infant growth promotion.

Key words: human milk; total protein; whey protein; casein; fast determination

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)05-0308-03

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.05.053

母乳是婴儿生命初始阶段最理想的食物,它含有优质蛋白质、丰富的脂肪酸、乳糖和免疫活性物质等,且易于消化吸收,对婴儿生长发育起着至关重要的作用。母乳的营养成分组成及营养模式一直是婴幼儿配方乳粉的黄金标准,对母乳的相关研究也成为国内外婴幼儿配方乳粉开发的基础。蛋白质是母乳中最重要的营养物质之一,与婴幼儿的营养状况息息相关。其乳清蛋白和酪蛋白的比例是母乳化婴幼儿配方乳粉的参考依据,也是决定婴幼儿配方乳

粉质量的重要指标。为了改善婴幼儿营养和婴幼儿配方乳粉质量,母乳中总蛋白质、乳清蛋白和酪蛋白含量的检测是非常重要的。

常用的母乳中总蛋白质、乳清蛋白和酪蛋白含量检测方法为凯氏定氮法^[1-2],虽然是经典的蛋白质检测方法,但由于样品用量大,操作复杂,测量时间较长,使其不利于较大数量母乳样本的分析。母乳分析仪是近年来发展较为迅速的用于母乳中蛋白质等宏量成分的快速检测方法^[3],该方法能测定母乳总蛋

收稿日期: 2015-07-13

作者简介: 董学艳(1983-),女,博士,研究方向:乳品科学,E-mail:18910005185@163.com。

* 通讯作者: 陈历俊(1967-),男,教授级高级工程师,研究方向:新型乳制品和质量安全控制技术与开发,E-mail:chenlijun@sanyuan.com.cn。

基金项目:北京市重大科技计划项目(D141100004814002)

白含量,但无法测出乳清蛋白和酪蛋白的含量,且仪器成本较高。在蛋白质的众多检测方法中比色法下属分支最多,使用最为灵活。使用较多的有 Lowry 法 (Folin - 酚试剂法), BCA 法 (二喹啉甲酸, Bicinchoninic acid) 和考马斯亮蓝法 (Bradford 法)^[4-5]。这类方法的共同特点是样品用量少、操作简单、测定时间短,且可以实现高通量等目的,已分别在牛乳蛋白质检测中得到不同程度的应用^[6]。

本研究针对母乳中总蛋白质、乳清蛋白和酪蛋白含量测定过程中存在的样品用量大、操作复杂、耗时较长及检测仪器成本较高等问题,以凯氏定氮法为标准,对比研究了 Lowry, BCA 和 Bradford 三种检测方法对母乳蛋白质的检测,以期找到适用于母乳中总蛋白质、乳清蛋白和酪蛋白含量的微量、高通量快速测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

母乳样本 来源于北京地区,采集上午 9~10 点哺乳前乳样(1,2 分别是同一人分娩后第 10、30 d 的母乳;3,4,5 分别是同一人分娩后第 6、30、60 d 的母乳),存入-80 ℃冰柜待用;Lowry 法蛋白浓度测定试剂盒 北京索莱宝科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒 北京索莱宝科技有限公司;Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 碧云天生物技术。

3K-15 高速冷冻离心机 美国 Sigma 公司;BioTek Elx 800 酶标仪 美国伯腾仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 母乳样本的处理 取 4 mL 母乳,0.5 mL 用于总蛋白的测定,剩余 3.5 mL 4 ℃条件下 11000 r/min 离心 20 min。去掉上层脂肪,取中间清液,用盐酸调节 pH 至 4.6,室温静置 0.5 h,4 ℃ 11000 r/min 离心 20 min,上清液为乳清蛋白,酪蛋白沉淀用变性剂(含 8 mol/L 尿素,165 mmol/L Tris,44 mmol/L 柠檬酸钠和 0.3% β-巯基乙醇)溶解。

1.2.2 4 种方法测定母乳中的蛋白质含量 凯氏定氮法:凯氏定氮法按照 GB/T 5009.5-2010 测定母乳中总蛋白质含量。Lowry 法,BCA 法和 Bradford 法分别按照试剂盒的操作说明绘制标准曲线并进行样本的检测。

2 结果与分析

2.1 三种方法的标准曲线

Lowry,BCA 和 Bradford 三种方法分别以牛血清白蛋白为标准蛋白制作标准曲线,根据绘制标准曲

线得到的方程如表 1 所示。由表 1 中数据可知,在合适的浓度范围内,牛血清白蛋白与 Lowry,BCA 和 Bradford 反应体系线性关系较好,牛血清白蛋白适合作为标准蛋白。

表 1 三种方法的标准曲线方程

Table 1 The standard curve equations of three methods

方法	蛋白浓度 (μg/mL)	标准曲线方程	相关系数 (r)
Lowry	5~1000	y = 0.074x + 0.0001	0.997
BCA	250~5000	y = 0.120x + 0.009	0.998
Bradford	100~1000	y = 0.0001x + 0.061	0.983

2.2 三种方法检测母乳总蛋白结果

我国国家标准中测定食品中蛋白质 (GB/T 5009.5-2010)^[7]有三种方法:凯氏定氮法、分光光度法和燃烧法。凯氏定氮法为最重要和经典的方法,也被用于母乳中总蛋白含量的测定。Shi 等^[8]用凯氏定氮法测定母乳中总蛋白的含量为 12.7~13.8 mg/mL。此外,Casadio 等^[9]和 Silvestre 等^[10]分别利用 Bradford 法检测了母乳中总蛋白的含量,分别为 12.0 mg/mL 和 11.9 mg/mL。

以凯氏定氮检测法作为标准,利用 Lowry,BCA 和 Bradford 三种方法检测母乳总蛋白含量的结果如表 2 所示。由表 2 可知,凯氏定氮法、Lowry 法、BCA 法、Bradford 法检测 5 份母乳中总蛋白含量分别为 13.1~14.8、11.94~13.95、17.94~19.78、13.19~14.44 mg/mL。Lowry 和 Bradford 法对母乳中总蛋白含量的检测结果与凯氏定氮法的检测结果比较无显著性差异 ($p > 0.05$),且 Lowry 和 Bradford 法的检测结果比较也没有显著性差异 ($p > 0.05$)。BCA 法的检测结果显著高于凯氏定氮法,Lowry 和 Bradford 法的检测结果 ($p < 0.05$)。结果表明 Lowry 和 Bradford 法适用于母乳中总蛋白含量的测定。

BCA 法的检测结果高于凯氏定氮、Lowry 和 Bradford 法,可能是因为测定过程中受到脂肪的影响。由于 BCA 法的检测原理是在碱性条件下,蛋白质将 Cu^{2+} 还原为 Cu^{+} , Cu^{+} 与 BCA 试剂形成紫颜色的络合物,测定其在 562 nm 处的吸收值。脂类物质在 500~600 nm 处也有强烈的吸收,因此会干扰 BCA 法对蛋白浓度的测定^[11]。

2.3 三种方法检测母乳乳清蛋白结果

利用 Lowry,BCA 和 Bradford 三种方法检测母乳乳清蛋白含量的结果如表 3 所示。由表 3 可知,

表 2 三种方法检测母乳总蛋白含量的比较

Table 2 The comparison of the total protein content detected by three methods

样品	凯氏定氮 (mg/mL)	Lowry (mg/mL)	BCA (mg/mL)	Bradford (mg/mL)
母乳 1	14.24 ^a	13.95 ± 1.74 ^a	19.05 ± 0.43 ^b	14.44 ± 1.07 ^a
母乳 2	13.58 ^a	13.27 ± 0.13 ^a	18.89 ± 0.77 ^b	13.19 ± 4.74 ^a
母乳 3	14.81 ^a	12.70 ± 1.23 ^a	17.97 ± 0.27 ^b	14.40 ± 1.05 ^a
母乳 4	13.52 ^a	12.16 ± 1.76 ^a	17.94 ± 1.14 ^b	14.29 ± 1.85 ^a
母乳 5	13.11 ^a	11.94 ± 1.48 ^a	19.78 ± 0.25 ^b	13.35 ± 1.71 ^a

注:同行中标不同字母的均值有显著性差异 ($p < 0.05$),表 2、表 3 同。

Lowry 法、BCA 法、Bradford 法检测 5 份母乳中乳清蛋白的含量分别为 7.86~8.47、10.16~13.88、4.50~6.36 mg/mL,且三种方法检测的结果之间均存在显著性差异($p < 0.05$)。

Kunz 等^[2]用凯氏定氮法测定了母乳中乳清蛋白的含量,从过渡乳到成熟乳乳清蛋白的含量为 7.3~8.6 mg/mL,与 Lowry 法的检测结果基本一致。Yuen 等^[12]用 Bradford 法测定母乳成熟乳中乳清蛋白的含量为 4.04 mg/mL,与本实验中 Bradford 法的测定结果基本一致,但是低于 Lowry 法。Yuen 等与 Kunz 等测定的母乳乳清蛋白的含量不同可能是因为受不同地区乳母膳食不同影响。凯氏定氮法作为蛋白含量测定的标准方法,比较三种方法与凯氏定氮法的检测结果可知,Lowry 法更适于母乳中乳清蛋白含量的测定。

表3 三种方法检测母乳乳清蛋白含量的比较

Table 3 The comparison of the

whey protein content detected by three methods

样品	Lowry (mg/mL)	BCA (mg/mL)	Bradford (mg/mL)
母乳 1	8.42 ± 0.07 ^a	13.37 ± 0.02 ^b	4.50 ± 0.31 ^c
母乳 2	8.34 ± 0.65 ^a	13.88 ± 1.81 ^b	4.81 ± 0.41 ^c
母乳 3	8.47 ± 0.13 ^a	11.38 ± 0.34 ^b	6.36 ± 0.88 ^c
母乳 4	7.93 ± 0.36 ^a	10.73 ± 1.43 ^b	5.77 ± 0.18 ^c
母乳 5	7.86 ± 0.51 ^a	10.16 ± 0.81 ^b	5.42 ± 0.84 ^c

2.4 三种方法检测母乳酪蛋白结果

利用 Lowry、BCA 和 Bradford 三种方法检测母乳酪蛋白含量的结果如表 4 所示。由表 4 可知,Lowry 法、BCA 法、Bradford 法检测 5 份母乳中酪蛋白的含量为 5.22~5.78、5.38~6.13、5.15~5.64 mg/mL,且三种方法检测的结果之间均没有显著性差异($p > 0.05$)。

Kunz 等^[2]用凯氏定氮法测定了母乳中酪蛋白的含量,从过渡乳到成熟乳酪蛋白的含量为 5.5~5.9 mg/mL。Yuen 等^[12]用 Bradford 法测定母乳成熟乳中酪蛋白的含量为 6.02 mg/mL。二人测得的结果均与本实验中 Lowry、BCA 和 Bradford 三种方法的检测结果基本一致。由此可知,Lowry、BCA 和 Bradford 三种方法均适用于母乳中酪蛋白含量的测定。

表4 三种方法检测母乳酪蛋白含量的比较

Table 4 The comparison of

the casein protein content detected by three methods

样品	Lowry (mg/mL)	BCA (mg/mL)	Bradford (mg/mL)
母乳 1	5.78 ± 0.15	6.04 ± 0.38	5.64 ± 0.77
母乳 2	5.22 ± 0.39	5.65 ± 0.37	5.31 ± 0.72
母乳 3	5.53 ± 0.15	6.13 ± 0.96	5.48 ± 0.34
母乳 4	5.30 ± 0.53	5.91 ± 0.84	5.36 ± 0.81
母乳 5	5.24 ± 0.61	5.38 ± 0.31	5.15 ± 0.48

3 结论

以凯氏定氮法为标准,对比研究了 Lowry、BCA

和 Bradford 三种方法对母乳蛋白质含量的测定,确定了母乳总蛋白、乳清蛋白和酪蛋白含量的微量、高通量快速测定方法。Lowry 和 Bradford 法适于母乳中总蛋白含量的测定,Lowry 法适于母乳中乳清蛋白含量的测定,Lowry、BCA 和 Bradford 三种方法均适于母乳中酪蛋白含量的测定。分别采用 Lowry 和 Bradford 法;Lowry 法;Lowry、BCA 和 Bradford 方法,使用 4 mL 母乳样本,同批次检测 45 个试样,1.5 h 内(凯氏定氮法同批次检测 20 个试样,耗时 6 h)可实现母乳总蛋白、乳清蛋白和酪蛋白含量的高通量快速测定,方法简便、准确。

参考文献

- [1] Rudloff S, Kunz C. Protein and nonprotein nitrogen components in human milk, bovine milk, and infant formula: quantitative and qualitative aspects in infant nutrition[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition, 1997, 24(3): 328-344.
- [2] Kunz C, Lönnerdal B. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk[J]. Acta Paediatr, 1992, 81(2): 107-112.
- [3] Fusch G, Rochow N, Choi A, et al. Rapid measurement of macronutrients in breast milk: How reliable are infrared milk analyzers? [J]. Clinical Nutrition, 2015, 34: 465-476.
- [4] Campion E M, Loughran S T, Walls D. Protein quantitation and analysis of purity[M]. Protein Chromatography Humana Press, 2011: 229-258.
- [5] Chutipongtanate S, Watcharatanyatip K, Homvises T, et al. Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs[J]. Talanta, 2012, 98: 123-129.
- [6] 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.
- [7] 食品中蛋白质的测定[S]. GB/T 5009.5-2010.
- [8] Shi Yd, Sun Gq, Zhang Zg, et al. The chemical composition of human milk from Inner Mongolia of China[J]. Food Chem, 2011, 127(3): 1193-1198.
- [9] Casadio Y S. Evaluation of a Mid-Infrared analyzer for the determination of the macronutrient composition of human milk[J]. Journal of Human Lactation, 2010, 26(4): 376-383.
- [10] Silvestre D, Fraga M, Gormaz M, et al. Comparison of mid-infrared transmission spectroscopy with biochemical methods for the determination of macronutrients in human milk[J]. Maternal & Child Nutrition, 2012, 10(3): 373-382.
- [11] 高晓非, 文晓静. 乙醇沉淀-二喹啉甲酸法测定含脂类样品中蛋白质的含量[J]. 医药导报, 2010, 29(12): 1630-1633.
- [12] Yuen J W M, Loke A Y, Gohel M I. Nutritional and immunological characteristics of fresh and refrigerated stored human milk in Hong Kong: a pilot study[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413: 1549-1554.