

牛乳中乳果糖含量测定的快速酶法

黄萌萌 王加启 卜登攀 魏宏阳 李树聪 许晓敏 于建国

(中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所/动物营养国家重点实验室/
农业部奶及奶制品质量监督检验测试中心,北京 100094)

摘要 提出的牛乳乳果糖含量测定的快速酶法,在 ISO 标准酶法基础上改变了乳果糖水解步骤,即培养时间 1 h,培养温度 50 ℃,β-半乳糖苷酶添加量 300 U。试验结果表明,该法牛乳乳果糖平均回收率 98.6%,相对标准偏差 < 5%,且将乳果糖含量测定周期缩短至 6 h(ISO 标准酶法为 15 h)。对 35 种市场随机采购的 UHT 灭菌乳进行的快速酶法与 ISO 标准酶法对比试验结果表明,牛乳乳果糖含量测定结果差异不显著($P=0.33$);带菌条件下(未使用无菌工作台,实验室及试验器皿未进行紫外消毒),快速酶法测定的乳果糖质量浓度比 ISO 标准酶法高 4%~20%($P<0.01$),说明 ISO 标准酶法测定过程中样品受微生物影响,而快速酶法没有受到微生物影响。对生鲜牛乳、奶粉、巴氏杀菌乳及 UHT 灭菌乳中乳果糖含量的测定结果表明,快速酶法适于不同加工工艺牛乳乳果糖含量的测定。快速酶法测定周期短、结果准确,适于批量样品测定。该法降低了微生物污染的几率,在操作环境不能达到无菌要求时应采用快速酶法。

关键词 乳果糖;牛乳;酶法;β-半乳糖苷酶

中图分类号 TS 252.7

文章编号 1007-4333(2007)05-0057-04

文献标识码 A

Rapid enzyme determination of lactulose in milk

Huang Mengmeng, Wang Jiaqi, Bu Dengpan, Wei Hongyang, Li Shucong, Xu Xiaomin, Yu Jianguo

(Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ State Key Laboratory of Animal Nutrition/
Ministry of Agriculture Milk and Dairy Quality Supervision and Inspection Evaluation Center, Beijing 100094, China)

Abstract A new assay for the determination of lactulose in milk samples was developed by optimizing the previous ISO enzyme method. Lactulose was hydrolyzed into fructose and galactose at 50 ℃ for 1 h by β-galactosidase of 300 units in this proposed method. The recovery efficiency of the new method was 98.6% and RSD < 5%. The new method can highly reduce the testing time from 15 h to 6 h. There was no significant difference for lactulose in 35 commercial milk samples between this new method and ISO method ($P=0.33$). Under the pollution of potential microorganism conditions (without the use of sterile workstations, laboratory and pilot vessels did not conduct UV disinfection), the concentration of lactulose detected by the new method was higher than that by the ISO method ($P<0.01$). It indicates that the milk samples are affected by the microorganisms in the process of the determination of lactulose in milk samples by ISO method, but not by the new method. Results showed that it was suitable for the determination of lactulose in milk samples subjected to heat treatments of different intensity, such as raw milk, pasteurized milk and UHT milk. The new method is rapid and accurate, and can prevent microbial contamination effectively. When an aseptic operating environment can not be achieved, the new method is a good choice.

Key words lactulose; milk; enzyme method; β-galactosidase

乳果糖是衡量牛乳加热温度和判定复原乳的重要指标^[1-2]。生乳加热灭菌过程会造成蛋白质和脂类的水解和部分维生素的损失,会破坏矿物元素的

平衡及热敏性生物活性物质,以及发生梅拉德反应等,影响牛乳及其产品的品质^[3]。许多国家以及国际组织都选用一些与热处理强度相关的指标来衡量

收稿日期: 2007-01-26

基金项目: 农业部农业结构调整重大技术研究专项(06-06-01A)

作者简介: 黄萌萌, 硕士研究生; 王加启, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事反刍动物营养研究, E-mail: wang-jia-qi @ 263.net

液态乳的热损害程度,评价液态乳加工质量^[4],乳果糖就是其中重要的指标。

目前,乳果糖含量的测定有气相色谱法^[5]、高效液相色谱法^[6]、荧光法^[7]、微分 pH 计法^[8]和酶法^[9]等,其中高效液相色谱法和酶法较为成熟,国际标准化组织(ISO)和国际乳品联合会(IDF)相继颁布了这 2 种方法的检测标准《Heat-treated Milk-determination of Lactulose Content-method Using High-performance-liquid Chromatography》(ISO 11868-1997)^[6]和《Milk-determination of Lactulose Content-Enzymatic Method》(ISO 11285-2004)(下称 ISO 标准酶法)^[9]。其中高效液相色谱法乳果糖检出限大于 200 mg/L^[6],不利于低浓度乳果糖样品的检测。ISO 标准酶法虽准确度高、检出限低,但其关键步骤,“利用 β -半乳糖苷酶水解乳果糖”的培养温度为 40^[9],而牛乳中绝大多数微生物最适生长温度一般为 20~45。笔者采用该方法对牛乳中乳果糖含量进行测定时发现,若试验器皿洁净度不高,或试验环境中微生物较多,极易产生微生物污染而导致乳果糖测定值偏低;此外该方法测定周期过长(15 h)^[10],不利于进行批量测定。

根据酶促反应动力学原理,升高培养温度和加大酶的添加量可加速酶的反应速度。已有研究证明:温度越高、酶添加量越大,乳果糖完全水解所需培养时间越短^[10];多种 β -半乳糖苷酶对乳糖水解作用的最适宜温度为 43~53,较低温度会影响果糖的生成^[11];米曲霉来源的 β -半乳糖苷酶的最适温度为 55^[12]。这些研究结果皆与 ISO 标准酶法中乳糖水解温度、时间等条件不一致。

为此,本研究参照 ISO 标准酶法及上述研究,对 ISO 标准酶法中乳糖水解步骤进行了改进,提出一种牛乳乳果糖含量的酶法快速测定方法(下称快速酶法)。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验用牛乳样品有:生鲜牛乳,由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所试验牛场提供;巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳,购自家乐福超市;工业奶粉,市场购买,按照总固形物质量分数 12% 配制成复原乳。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂包括: β -半乳糖苷酶(β -Galactosidase, EC3.2.1.23, Sigma G5160)、葡萄糖氧化酶(Glucose

oxidase (GOD), from *Aspergillus niger*, EC 1.1.3.4, Fluka 49180)、过氧化氢酶(Catalase, EC 1.11.1.6, Fluka 60630)、己糖激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Hexokinase and Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, EC 2.7.1.1 + 1.1.1.49, Sigma H8629)、磷酸葡萄糖异构酶(Phosphoglucose isomerase, PGI, EC 5.3.1.9, Sigma F2688)。其他试剂均为分析纯。

主要仪器为紫外/可见分光光度计 Beckman DU800 和生化培养箱 Cole-Parmer 39050-65。

1.3 试验方 法

快速酶法的试剂配制、试验步骤及结果计算,除乳果糖水解除步骤外均与 ISO 酶法相同。

1) 回收率测定。在新鲜生乳中添加不同质量浓度(5~600 mg/L)的乳果糖标准液,采用快速酶法进行乳果糖标准回收率测定,检测该方法的可行性。

2) 快速酶法与 ISO 标准酶法比较。对市场随机采购的 UHT 灭菌乳进行快速酶法与 ISO 标准酶法对比试验,其结果采用配对样品 t 检验法进行统计,分析试验环境对 2 种方法的影响。

3) 快速酶法的实际应用。采用快速酶法对各种牛乳样品乳果糖含量进行测定,探讨该方法的实际应用效果。

乳果糖水解除步骤如下。

快速酶法:取样品澄清液 5.00 mL 放入 10 mL 容量瓶中,加入 300 U β -半乳糖苷酶悬浮液,摇匀,加盖,50^oC 培养 1 h。

ISO 酶法:取样品澄清液 5.00 mL 放入 10 mL 容量瓶中,加入 75 U β -半乳糖苷酶悬浮液,摇匀,加盖,40^oC 培养 10 h。

1.4 数据统 计分析

采用 SAS9.0 数理统计软件进行数据处理,所有数据均为平均值 \pm 标准差。对比试验数据采用配对法 t 检验法。

2 试验结果与讨论

2.1 回收率的测定

从表 1 可以看出,当牛乳中加入的乳果糖标准溶液质量浓度低于 30 mg/L 时,回收率为 85%~115%,相对标准偏差 > 5%;质量浓度高于 30 mg/L 时,回收率为 95%~105%,相对标准偏差 < 5%。平均回收率为 98.6%。该方法的准确性可满足测定不同牛乳样品中乳果糖的需要。

表 1 牛乳乳果糖回收率测定结果 ($n=3$)Table 1 Recoveries of different amounts of lactulose added to raw milk ($n=3$)

乳果糖质量浓度/(mg/L)		回收率/ %	相对标准 偏差/ %
标准溶液	实测结果		
5	4.32 ±0.24	86.38	10.34
10	11.17 ±1.55	111.73	7.83
20	22.77 ±10.24	113.84	9.15
30	31.55 ±1.65	105.15	3.55
50	49.92 ±0.52	99.85	0.11
100	100.95 ±0.57	100.95	0.67
150	149.52 ±1.79	99.68	0.23
200	200.47 ±0.51	100.24	0.17
300	291.51 ±1.99	97.17	2.03
400	382.50 ±0.98	95.62	3.16
500	478.44 ±4.71	95.69	3.12
600	595.25 ±2.61	99.21	0.56

2.2 快速酶法与 ISO 标准酶法对比试验

对 35 种市场随机采购的 UHT 灭菌乳进行快速酶法与 ISO 标准酶法对比试验,乳果糖质量浓度测定结果分别为 (361.68 ± 15.99) 和 (361.06 ± 15.14) mg/L,标准误差 $SE = 1.7$,差异不显著 ($P > 0.05$)。

为了探讨微生物对乳果糖测定产生的影响,对相同 UHT 灭菌乳样品 ($n=26$) 同时进行 2 种方法的乳果糖测定,试验采取粗放型操作(不采用无菌工作台,实验室和所用器皿没有用紫外线杀菌,所有试剂配制和试验用水皆为蒸馏水,没有进行灭菌)。采用 ISO 标准酶法测定的样品乳果糖水解释培养 10 h 取出后容量瓶中可见絮状沉淀,溶液混浊;而采用快速酶法的样品乳果糖水解释培养 1 h 取出后容量瓶内液体澄清,无絮状沉淀。快速酶法和 ISO 标准酶法测定的乳果糖质量浓度分别为 (439.9 ± 22.2) 和 (399.3 ± 23.3) mg/L, $SE = 3.1$,差异极显著 ($P < 0.01$)。快速酶法测定的乳果糖质量浓度普遍比 ISO 标准酶法高 4% ~ 20%,说明 ISO 标准酶法测定过程中,牛乳中存在的或被外界条件感染的中温微生物大量繁殖,并在此过程中吞噬糖类,从而使结果偏低;而快速酶法测定过程中样品没有受微生物的影响而产生污染。在操作环境不能达到无菌要求时,应采用快速酶法。

2.3 快速酶法在乳果糖含量检测中的应用

利用快速酶法对市场上购买的不同种类牛乳和自己制备的不同加工工艺的牛乳样品进行测定,检

验结果见图 1。乳果糖质量浓度检测结果与国外相关文献报道一致^[5,8,13],说明快速酶法可以准确测出包括生鲜牛乳和巴氏杀菌乳在内的不同加工工艺牛乳的乳果糖含量;同时,可用乳果糖质量浓度作为指标区分巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳。

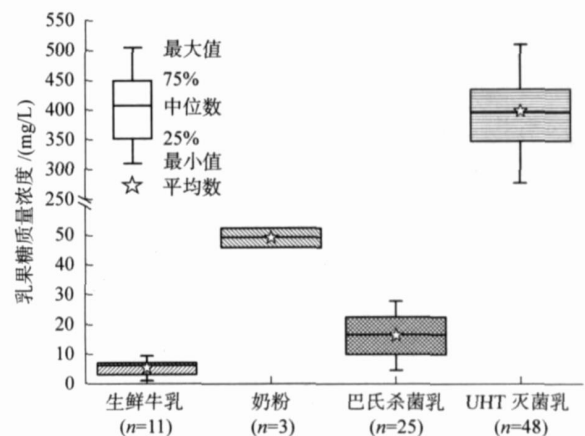


图 1 不同种类牛乳中乳果糖质量浓度的分布

Fig. 1 Concentrations of lactulose in different kinds of milks

3 结论

本文中提出的牛乳乳果糖含量测定的快速酶法检测速度较快,与 ISO 标准酶法相比,将样品整个测定周期由 15 h 缩短为 6 h;由于提高了培养温度,缩短了培养时间,降低了微生物污染几率,不易造成检测误差。快速酶法适用于批量样品测定,并且满足不同加工工艺牛乳乳果糖含量的测定要求。

参 考 文 献

- [1] Pellegrino A, Noni D I, Resmini P. Coupling of lactulose and furosine indices for quality evaluation of sterilized milk[J]. *International Dairy Journal*, 1995, 5: 647-659
- [2] Muangthai P, Saijang D, Suthavirisan S. Determination of lactulose content in heated milk samples [J]. 31st Congress on Science and Technology of Thailand, 2005: 10, 18-20
- [3] Villamiel M, Arias M, Corzo N, et al. Use of different thermal indices to assess the quality of pasteurized milks [J]. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 1999, 208: 169-171
- [4] Andrews G R. Formation and occurrence of lactulose in heated milk [J]. *Journal of Dairy Research*, 1986, 53: 665-680
- [5] Montilla F J, Moreno A, Olano. A reliable gas capillary chromatographic determination of lactulose in dairy samples[J]. *Chromatographia*, 2005, 62: 311-314
- [6] ISO 11868-1997 Heat-treated milk-determination of lactulose content-method using high-performance-liquid chromatography[S]
- [7] Kulmyrzaev A, Dufour É. Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy [J]. *Lait*, 2002, 82: 725-735
- [8] Luzzana M, Agnellini D, Cremonesi P, et al. Milk lactose and lactulose determination by the differential pH technique[J]. *Lait*, 2003, 83: 409-416
- [9] ISO 11285-2004, IDF 175-2004 Milk-determination of lactulose content-Enzymatic method[S]
- [10] Amine D, Moscone R A, Bernardo E, et al. A new enzymatic spectrophotometric assay for the determination of lactulose in milk[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 406: 217-224
- [11] Vaheri M, Kauppinen V. The formation of Lactulose by β -galactosidase[J]. *Acta Pharm Fennica*, 1978, 87: 75-83
- [12] Harju M. Lactulose as substrate for beta-galactosidases [J]. *Milchwissenschaft*, 1986, 6: 349-352
- [13] De Block J, Merchief M, Van Renterghem R, et al. Evaluation of two methods for the determination of lactulose in milk[J]. *International Dairy Journal*, 1996, 6: 217-222