

巴氏杀菌乳、UHT 灭菌乳中乳果糖项目的检测研究



李明艳, 李春立*, 鲍晓凤, 陈广华, 张广福, 张淑丽, 张燕

内蒙古蒙牛乳业科尔沁有限责任公司检测实验室, 内蒙古通辽 028000

摘要: 牛奶富含各种营养物质, 其中的功能性蛋白, 对人体健康有非常多的益处。但是牛奶在上市前都要经过热处理。牛奶热处理的强度越强, 功能性蛋白损失越多。乳果糖是牛奶中重要的热敏指标之一, 可以指示牛奶的热处理强度。农业部畜牧业司提出对巴氏杀菌乳进行乳果糖检测, 现方法由于操作过程复杂、检测耗时长、且需要对酶活力进行换算等因素影响, 不能快速满足业务需求, 采用乳果糖快检试剂盒, 在保证检测结果准确性的前提下, 提高了检测效率, 同时也缩短了检测时间。本文详细介绍了乳果糖试剂盒(馥申)检测法从实验室材料准备、检测操作关键步骤注意事项及对比数据分析等方面, 得出了试剂盒法在精准性、检测时间、操作便捷度、检测费用等方面均优于传统检测方法。

关键词: 乳果糖; 快检试剂盒; 牛乳; 快速; 准确

DOI: [10.57237/j.wjfse.2024.01.002](https://doi.org/10.57237/j.wjfse.2024.01.002)

Research on the Detection of Lactulose in Pasteurized Milk and UHT Sterilized Milk

Li Mingyan, Li Chunli*, Bao Xiaofeng, Zhao Wenjun, Chen Guanghua, Zhang Guangfu, Zhang Yan

Testing Laboratory, Inner Mongolia Mengniu Dairy Horqin Co., Ltd., Tongliao 028000, China

Abstract: Milk is rich in various nutrients, including functional proteins, which have many benefits for human health. However, milk must undergo heat treatment before being marketed. The stronger the heat treatment of milk, the greater the loss of functional proteins. Lactulose is one of the important heat sensitive indicators in milk, which can indicate the heat treatment intensity of milk. The Animal Husbandry Department of the Ministry of Agriculture proposed to conduct lactulose detection on pasteurized milk. However, the current method cannot quickly meet business needs due to complex operation, long detection time, and the need to convert enzyme activity. Therefore, a lactulose rapid detection kit is used to improve detection efficiency and shorten detection time while ensuring the accuracy of detection results. This article provides a detailed introduction to the detection method of lactulose test kit (Fushen) from the aspects of laboratory material preparation, key steps and precautions in detection operation, and comparative data analysis. It is concluded that the test kit method is superior to traditional detection methods in terms of accuracy, detection time, ease of operation, and detection cost.

*通信作者: 李春立, 452906353@qq.com

Keywords: Lactulose; Rapid Testing Kit; Milk; Quickly; Accurate

1 引言

牛奶目前是日常各类人群获取营养物质的重要来源之一，它富含各种营养物质，其中的功能性蛋白，对人体健康有非常多的益处。为保证牛乳的质量与安全，延长产品保质期，通常采用热处理的方式来杀灭微生物。牛乳热处理可诱发美拉德反应[1]、乳糖异构化、蛋白变性等理化反应，从而影响牛乳的风味、营养和功能性。乳果糖是牛乳热处理过程中乳糖异构化而形成的双糖，是由半乳糖与果糖组成的二糖，在自然界中并不存在，它产生于生乳的加热过程中。

乳果糖作为牛奶中重要的热敏指标之一，在牛乳热处理过程中乳糖在酪蛋白的游离氨基集团的催化条件下会发生碱基异构化形成乳果糖[2, 3]。经过不同热处理的液态乳产品，乳果糖含量存在明显差异[4, 6]。因此液体乳中的乳果糖含量可用于评价乳品的热加工程度[5]，也成为乳品行业的一个重要检测项目。农业部畜牧业司提出对巴氏杀菌乳进行乳果糖检测，现 NY/T 939-2016《巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定》[7]由于该方法共采用 6 种酶，其酶的活性直接影响了测定结果的准确性，且该法操作繁琐、测定时间长等。目前测定乳果糖的方法除酶催化比色法[6, 8]、外，对测定乳中乳果糖测定较少，[9-12]。不能快速满足业务需求，因此，寻找出更加快速、高效、简便的牛乳中乳果糖的检测方法对液态乳质量评定和复原乳问题的解决有深远的意义[13]。

本文介绍的乳果糖试剂盒（馥申）法，在保证检测结果准确性的前提下，提高了检测效率，缩短了检测时间，同时提高了检测的精准性。

2 实验材料

2.1 实验材料

灭菌乳、生乳、纯净水

2.2 仪器设备

紫外分光光度计，离心机：10000-16000 转/分，2mL 离心管配套转子、离心机：4000-5000 转/分，移液器；

2.3 试剂

乳果糖检测试剂盒（馥申）、辛醇（ $C_8H_{18}O$ ）、30%过氧化氢（双氧水）、硫酸锌（ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ）、亚硫酸锌（ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ）、乳果糖标准品

3 试验方法

3.1 干扰物质的制备

分别取不含目标检测物质与含目标检测物质的生乳做本底，分别制备出质量浓度为 1%双氧水掺假样品、0.1%碳酸氢钠掺假样品、0.5 μ g/kg β -激动剂掺假样品、0.1%三聚氰胺掺假样品。

3.2 具体操作步骤

3.2.1 样品处理

取 2mL 离心管一支，依次加入水 0.7mL、缓冲液 1（磷酸盐缓冲液）0.2mL、奶样 0.5mL、硫酸锌溶液 0.05mL（加入后颠倒混匀 3 次，并静置 2 分钟），亚铁氰化钾溶液 0.05mL（加入后颠倒混匀 3 次，并静置 2 分钟）。16000 转/分离心 5 分钟（或 10000 转/分，10 分钟），取上清液用于下一步实验。（若无法获得清液，则需重新开始处理样品。）

3.2.2 乳果糖的水解

取上一步获得的上清液分装入两支 2mL 离心管中，每支 0.5mL，其中一支加入试剂 A 0.1mL 及酶制剂 1（ β -半乳糖苷酶）0.05mL 作为样品管，另一支加入试剂 A 0.1mL 及水 0.05mL 作为空白。40 \pm 1 $^{\circ}C$ 水浴 30min。（具体操作时，可先加入试剂 A，酶制剂 1 或纯水，再取上清液加入到离心管中。）

3.2.3 葡萄糖的转化

空白管与样品管完成水解后，余下操作完全一致。继续在离心管中按下表顺序添加试剂进行葡萄糖氧化步骤的操作。

表 1 葡萄糖氧化

步骤	样品管	空白管
缓冲液 2: TEA 缓冲液	0.5mL	0.5mL
试剂 B: 反应环境调节试剂 2	0.05mL	0.05mL
辛醇	0.01mL	0.01mL
酶制剂 2: 葡萄糖氧化酶&过氧化氢酶	0.033mL	0.033mL
30%过氧化氢	0.02mL	0.02mL
40±1℃ 水浴 20min, 开盖排气。转入 90±1℃ 水浴 5min; 再 10000 转/min 离心 10min, 取上清液用于下一步检测。		

注 1: 酶制剂 2 加入后, 需要盖上离心管盖子颠倒 3 次混匀。无此操作可能导致实验失败。

注 2: 30%过氧化氢加入后, 需要盖上离心管盖子颠倒 3 次混匀 (加入一管立刻混匀一管)。无此操作可能导致实验失败。颠倒后需要开盖放气后再盖上并用小离心机 (4000-5000 转/min) 离心 5-10 秒, 以避免管内压力过高。开盖排气时注意眼睛防护。
注 3: 加入过氧化氢之后, 需观察到管内有气泡产生, 若无气泡产生, 说明实验很可能已经失败, 需要从新开始实验。

3.3 紫外分光光度计检测

取 1.5mL 半微量比色皿 (紫外款) 按下表加入试剂并测定吸光度值。(波长 340nm, 水调 0, 室温不低于 23℃)。

表 2 紫外分光光度计检测

步骤	样品管	空白管
加入缓冲液 3: 反应缓冲液	0.05mL	0.05mL
加入上清液	1 mL	1 mL
加入试剂 C: NADP&ATP	0.05mL	0.05mL
混匀静置 3 分钟		
加入酶制剂 3: 己糖激酶&葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	0.02mL	0.02mL
混匀, 反应停止后 (约 10min) 读取吸光度值	As1	As1
加入酶制剂 4: 磷酸葡萄糖异构酶	0.02mL	0.02mL
混匀, 反应停止后 (约 10-15min) 读取吸光度值	As2	As2

注 1: 以上反应均在同一个比色皿内完成
注 2: 加入酶制剂 3 以及酶制剂 4 之后都应使用 1mL 吸头吹打 5 次混匀, 从开始混匀时计时。

4 结果与分析

方法检出限: 分光光度法 4.8mg/L;
方法定量限: 分光光度法 15mg/L;

4.1 检出限、定量限实验

本检测方法使用不含待检物质的纯水为本底样品进行检出限、定量限实验, 每组样品进行平行样检测, 检测结果如表 3 所示:

表 3 快速试剂盒法检测乳果糖检出限、定量限实验数据

检测方式	方法回收率指标要求	本实验室检测结果	
(回收率)		结果 mg/L	回收率%
第一次检测			
水本底 1	/	0	/
水本底 2	/	0	/
检出限 4.8mg/L	90-110%	4.9	102.08
检出限 4.8mg/L	90-110%	4.7	97.92
定量限 15mg/L	90-110%	13.7	91.33
定量限 15mg/L	90-110%	16.4	109.33
第二次检测			
水本底 1	/	0	/
水本底 2	/	0	/
4.8mg/L	90-110%	4.6	95.83
4.8mg/L	90-110%	4.9	102.08

检测方式 (回收率)	方法回收率指标要求	本实验室检测结果	
		结果 mg/L	回收率%
15mg/L	90-110%	15.6	104.00
15mg/L	90-110%	14.5	96.67

4.2 加标实验检测

使用生乳样品做本底，使用阳性加标的方式进行回收率的检测，数据如表 4：

表 4 快速试剂盒法检测乳果糖加标实验数据

检测方式	方法回收率指标要求	本实验室检测结果	
（回收率）		结果 mg/L	回收率%
第一次检测			
生乳本底 1	/	1	/
生乳本底 2	/	1.9	/
50mg/L	90-110%	54.5	106.10
50mg/L	90-110%	50.6	98.30
55mg/L	90-110%	58.6	103.91
55mg/L	90-110%	56.7	100.45
60mg/L	90-110%	63.6	103.58
60mg/L	90-110%	61.2	99.58
第二次检测			
生乳本底 1	/	0.0	/
生乳本底 2	/	0.0	/
200mg/L	90-110%	192.6	96.3
200mg/L	90-110%	187.1	93.55
500mg/L	90-110%	474.9	94.98
500mg/L	90-110%	473	94.6

4.3 精密度实验

对不同浓度的加标样品进行精密度实验，结果如表 5：

表 5 精密度检测数据

检测方式 (精密度)	精密度范围	检测结果 mg/kg	精密度
加标浓度 200mg/L	当检测结果大于 50mg/L 时在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 10%	192.6	2.90%
		187.1	
加标浓度 500mg/L		474.9	0.40%
		473	
加标浓度 55mg/L		58.6	3.30%
		56.7	
加标浓度 60mg/L		63.6	3.85%
		61.2	
灭菌乳		425.0	1.45%
		418.9	

5 实验优势

由上述试验及实验结果可以看出，乳果糖快速检测试剂盒具有以下优点：

- (1) 本检测方法无需大型的、昂贵的检测仪器；
- (2) 在检测过程无需繁琐的检测步骤，药品配制过

- 程简单，样本无需任何前处理，直接进行检测；
- (3) 本检测方法用时短，4 小时左右即可完成检测；
 - (4) 检测成本低，检测准确性高，回收率结果符合到 GB5009-295《食品安全国家标准 化学方法验证通则》[14]中要求；

6 结论

综上所述,采用快速试剂盒方法无论在检测过程难易程度方面及使用成本方面均优于传统方法;此方法简便、无需大型的、昂贵的检测仪器;与传统的检测方法相比较,大大的节约了检测成本,提高了检测效率。试剂盒法检测有利于促进乳品企业和检测机构对液体乳中乳果糖含量进行快速批量化检测,从而有利于促进液体乳热加工质量的评价和复原乳的鉴定,对乳业质量监管具有重要意义[15]。

参考文献

- [1] MORALES F, ROMERO C, JIMENEZ - PEREZ S. Evaluation of Heat- Induced Changes in Spanish Commercial Milk: Hydroxymethylfurfural and Available Lysine Content [J]. International Journal of Food Science and Technology, 1996, 31: 411- 418.
- [2] ANDREWS G R. Distinguishing Pasteurized, UHT and Sterilized Milks by Their Lactulose Content [J]. Journal of the Society of Dairy Technology, 1984, 37(3): 92- 96.
- [3] CORZO N, OLANO A, MARTINEZ - CASTRO I. Diferenciación de leches sometidas a distintos tratamientos térmicos mediante el análisis de la composición en disacáridos libres por cromatografía de gases [J]. Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, 1986, 26: 565-570.
- [4] LUZZANA M, AGNELINI D, CREMONESI P, et al. Milk Lactose and Lactulose Determination by the Differential pH Technique [J]. Lait, 2003, 83: 409-416.
- [5] 关荣发, 赵唯, 叶兴乾, 等. 乳品加工中重要热处理指示物的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(6): 90-93.
- [6] AMINE A, MOSCONE D, BERNARDO R A, et al. A new enzymatic spectrophotometric assay for the determination of lactulose in milk [J]. Anal Chim Acta, 2000, 406(2): 217-224.
- [7] 农业部行业标准 NY/T939-2005, 巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定 [S].
- [8] MARCONI E, MESSIA M C, AMINE A, et al. Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay [J]. Food Chem, 2004, 84(3): 447-450.
- [9] 张媛媛, 聂少平, 万成. 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定单糖、双糖及低聚果糖 [J]. 食品科学, 2006, 30(18): 237-239.
- [10] 姜金斗, 周红, 张丽宏. 等. HPLC 法蒸发光散射检测器测定 UHT 奶中乳果糖方法的研究 [J]. 中国乳品业, 2006, 34(3): 51-53.
- [11] 张磊, 周光明, 熊建飞. 离子色谱法检测水果、饮品中的蔗糖、葡萄糖和果糖 [J]. 食品科学, 2012, 33(8): 159-162.
- [12] 曾文芳, 时巧翠, 陈永欣, 等. 离子色谱电化学测定牛奶中的乳糖和乳果糖 [J]. 食品科学, 2006, 27(05): 205-207.
- [13] 黄萌萌, 王加启, 卜登攀, 魏宏阳, 牛乳乳果糖的研究进展 [J]. 中国乳品工业. 2007, 35(6): 54-57.
- [14] 食品安全国家标准 GB5009-295, 《食品安全国家标准 化学方法验证通则》[S].
- [15] 黄建钊; 刘海纯; 李秀英; 郑学般; 何敏桓; 紫外分光光度计法测定液体乳中乳果糖含量 [J]. 饮料工业. 2023, 26(5): 24-29.