

蛋白质组学技术在不同物种乳掺假检测中的应用

潘俊宇^{1,2}, 王斌³, 范荣波^{1,2}, 王义坚⁴, 杨永新², 韩荣伟², 于忠娜^{1*}

(1. 青岛农业大学海都学院, 山东烟台 265200) (2. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109)

(3. 莱西市畜牧兽医服务中心, 山东青岛 266600) (4. 青岛荷斯坦奶牛养殖有限公司, 山东青岛 266600)

摘要: 乳品是人类重要的营养源, 然而乳品掺假现象时常发生, 近年来尤以向乳品中掺假动物、植物蛋白, 向特色畜乳中掺假牛乳等方式为主, 这不仅损害了消费者的利益, 甚至会危害消费者的健康。该研究总结了目前常见的掺假行为及相关检测方法, 并介绍了蛋白质组学技术——一种通过确立特定生物标记物来区别不同物种乳的技术。作者查询了国内外近十年来牛乳和特色乳掺假方面的研究报道, 关键词设置为“蛋白质组学”、“乳品”、“真实性”、“生物标记物”等, 按照奶畜乳类别将所得文献进行分类。分别对奶牛乳、羊乳、驼乳、水牛乳、牦牛乳、驴乳的掺假物、潜在标记物和检出限等方面进行了总结和分析, 以期对乳品真实性鉴定和保障乳品质量安全提供有效的工作思路。

关键词: 乳品; 蛋白质组学; 掺假检测

文章编号: 1673-9078(2023)12-328-335

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.1501

Application of Proteomics Technology in the Detection of Milk

Adulteration with Different Species

PAN Junyu^{1,2}, WANG Bin³, FAN Rongbo^{1,2}, WANG Yijian⁴, YANG Yongxin², HAN Rongwei², YU Zhongna^{1*}

(1. Haidu College, Qingdao Agricultural University, Yantai 265200, China) (2. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China) (3. Laixi Animal Husbandry Veterinary Service Center, Qingdao 266600, China) (4. Qingdao Holstein Dairy Breeding Co. Ltd., Qingdao 266600, China)

Abstract: Dairy is a major nutrition source for human beings, but adulteration of dairy products often occurs. In recent years, Adulteration of dairy products with animal and plant proteins and adulteration of special livestock milk with cow milk are the main adulteration methods, which harms not only the interest of consumers but also endangers their health. This article summarizes current common adulteration behaviors and associated detection methods, and introduces proteomics technique, a technique for distinguishing milks from different species through establishing specific biomarkers. The authors searched for the domestic and overseas research reports on bovine milk and specialty milk adulteration in the past decade, with the keyword set as "proteomics", "dairy", "authenticity", "biomarkers", etc., according to the categories of animal milks. The adulterants, potential markers, and detection of limits of cow milk, goat milk, camel milk, buffalo milk, yak milk, and donkey milk were summarized and analyzed respectively, to provide effective working ideas for verifying dairy authenticity and ensuring the quality and safety of dairy products.

Key words: dairy products; proteomics; adulteration detection

引文格式:

潘俊宇, 王斌, 范荣波, 等. 蛋白质组学技术在不同物种乳掺假检测中的应用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(12): 328-335

PAN Junyu, WANG Bin, FAN Rongbo, et al. Application of proteomics technology in the detection of milk adulteration with different species [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 328-335

收稿日期: 2022-11-25

基金项目: 中央引导地方科技发展专项资金 (YDZX2021111); 青岛市科技惠民示范引导专项 (21-1-4-ny-17-nsh); 山东省重点研发计划 (公益类科技攻关) (2019GNC106024); 烟台市校地融合发展项目 (2021XDRHXMQT34); 国家农产品质量安全风险评估项目 (GJFP2019027); 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2020MC209)

作者简介: 潘俊宇 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 奶牛营养与牛奶质量, E-mail: buckyneng@foxmail.com

通讯作者: 于忠娜 (1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 奶牛营养与牛奶质量, E-mail: ahnuo123@163.com

据统计,乳品掺假在食品掺假中排名第二^[1],仅次于食用油脂掺假。常见的掺假方式是向生乳或乳制品中掺入尿素、三聚氰胺、水、脂肪、蛋白质等物质(见表1),以达到掩蔽乳品质量问题或谋取暴利的目的。近年来,随着国家相关部门监管力度的加强,乳品掺假现象已经得到了极大的遏制,但仍存在向乳及乳制品中掺入动、植物蛋白,或向量少价高的特种奶畜乳中掺假廉价牛乳的现象。乳品掺假不仅会给消费者造成经济损失,甚至会引起消费者的不良反应^[2]。

目前有关乳品真实性鉴定的研究方法主要有傅里叶变换红外光谱、聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)和酶联免疫吸附测定(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)等。Sevval 等^[3]建立了傅里叶变换红外光谱检测水牛乳和山羊乳中掺假牛乳的检测方法,检测限为5%;Rodrigues 等^[4]运用PCR技术成功检测出了散装羊乳中掺假牛乳。Pesic 等^[5]运用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)方法检测出羊乳中存在牛乳成分;Song 等^[6]以 β -酪蛋白为标记物开发了ELISA试剂盒,成功检测了萨能奶山羊乳和关中奶山羊乳中掺假的牛乳;Francesca 等^[7]运用毛细管电泳法,以 α -乳白蛋白为标记物检测出了水牛乳中的牛乳;PCR/ELISA方法虽有快速、灵敏的特点,但多数用于定性或半定量分析,且容易出现假阳性结果,凝胶电泳和毛细管电泳方法也存在着步骤复杂、上样量低、重现性差等缺点^[8]。

蛋白质组学已广泛用于特色畜乳掺假鉴定及标记物的挖掘^[9]。蛋白质组学技术由Marc Wikinszai于上世纪九十年代初期提出,该技术可对同一来源(如来源于一个细胞、一种分泌物或一个细胞器)的蛋白质进行的系统分离、鉴定和表征^[10]。在质谱等高通量技术的支持下,收集了大量的蛋白质组学数据以建立生物信息数据库。通过结合生物信息学工具,可实现对蛋白质来源的鉴定,预测蛋白质的功能、分布等。

蛋白质组学在掺假中的应用常与质谱技术结合以达到检测的目的,样品在离子源的作用下形成气态肽段离子进行质谱检测。基质辅助激光解吸(Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)与飞行时间(Time of Flight, TOF)质量分析器联用或是电喷雾电离(Electro Spray Ionization, ESI)与液相色谱联用是两种常用的蛋白质鉴定方法。前者要求基质和样品点在样品靶位上形成共结晶后再进行激光解吸,不能直接衔接质谱,而选择ESI时,样品经过液相色谱分离后通过离子源处理直接衔接质谱进行分析。离子源ESI提供了高度的仪器灵活性,不仅可以

很容易地与液相色谱系统结合,而且还可以与各种质量分析仪结合,但是易受到电解质盐的抑制作用,对除盐的要求较高^[11,12]。而MALDI具有产生肽和蛋白质的单电荷离子的优势,但时间效率较低^[13]。

作者查阅了近年来蛋白质组学技术在乳品掺假鉴定中的相关研究报道,按照其在不同物种乳掺假检测中的应用展开综述,以期对乳品掺假检测方法的选择提供更多的思路,见表1。

表1 常见乳品掺假及相应检测方法

Table 1 Common dairy adulteration and corresponding detection methods

掺假物	分析方法	参考文献
水	阻抗传感器; 数字图像技术; 冰点渗透压	[14-16]
脂肪	介电特性	[17]
尿素	傅里叶变换红外光谱; 差示扫描热量法;	[18,19]
植物油	傅里叶变换红外光谱; 气相色谱	[20,21]
乳清	拉曼光谱;傅里叶变换红外光谱	[22,23]

1 蛋白质组学技术在牛乳掺假检测中的应用

1.1 蛋白质组学技术在奶牛乳掺假检测中的应用

牛乳是人们生活中十分重要的营养来源,其掺假外源蛋白类型包括向牛乳中掺入乳粉、水解植物蛋白等。Yang 等^[24]运用纳米液相色谱串联质谱(nano-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectroscopy, nano HPLC-MS/MS)对液态乳中掺假的大豆、豌豆、水解小麦、水解水稻蛋白进行了检测。发现采用高速离心方式能够去除牛奶的高丰度蛋白,以便放大分析掺入的水解植物蛋白,并从UniProt网站获得鉴定信息,通过主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)确定标记物分别为 β -伴大豆球蛋白的 α 亚基、伴豌豆球蛋白、 α -淀粉酶抑制剂CM3,最终得出检出限分别为0.5%、2%、0.5%和4%。Lu 等^[25]成功通过超高效液相色谱四级杆飞行时间串联质谱(Ultra-Performance Liquid Chromatography - Quadrupole Time-of-flight - Mass Spectrometry, UPLC-QTOF-MS)检测出生乳中掺假的大豆蛋白和豌豆蛋白,检出限为1%,标记物分别是 β -伴大豆球蛋白和豌豆球蛋白。Hao 等^[26]使用超高效液相色谱串联三重四极杆质谱(Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Triple Quadrupole-Mass Spectrometry, UPLC-TQMS)分析了46种经胰蛋白酶消化而得的肽,从UniProt蛋白质数据库获得

的鉴定信息可知, α_{S1} -酪蛋白肽段 FVAPFPEVFGK、 κ -酪蛋白肽段 YIPIQYVLSR、 α_{S2} -酪蛋白肽段 FALPQYLK、 β -乳球蛋白肽段 IDALNENK 和 β -酪蛋白肽段 VLPVPQK 能够作为物种特异肽段来定量蛋白质。通过同位素稀释 UPLC-TQMS 来分析上述物种特异性肽, 可定量牛乳中的主要蛋白质, 经验证每 100 g 牛乳蛋白中含有 70.26 g 上述种类蛋白, 根据这个阈值, 可检测生乳中掺杂的大豆蛋白, 检出限为 10%。Hao 等^[26]的方法检出限显著高于 Yang 等^[24]和 Lu 等^[25]的方法, 这是由于在他的方法中只对几种主要蛋白质进行了定量。

Du 等^[27]对牛全脂液态乳中加入乳粉进行了检测, 利用超高效液相色谱四级杆飞行时间串联质谱 (Ultra-Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight-Mass Spectrometry, UPLC-QTOF-MS) 分析完整蛋白质数据, 利用 MathWorks 软件获得肽信息, 最终确定检出限为 0.5%, α -乳白蛋白糖基化多肽肽段 FLDDDLTDDIMCVK 为标记物。同样是对牛乳中掺假乳粉的检测, Calvano 等^[28]使用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight Mass Spectrometry,

MALDI-TOFMS) 分析方法, 确定检出限为 1%, 标记物为 α_{S1} -酪蛋白的去磷酸化肽段 YKVPQLEIVPNSAEER、 α_{S1} -酪蛋白的糖基化肽段 TKVIPYVR、 β -酪蛋白的乳糖基化肽段 VLPVPQKAVPYPQR、 β -乳球蛋白的乳糖基化肽段 LIVTQTMKGLDIQK、 β -乳球蛋白的乳糖基化肽段 ALKALPMHIR 和 β -乳球蛋白的乳糖基化肽段 TPEVDDEALEKFDK。这是由于乳粉在加工过程中的热处理造成美拉德反应, 使得酪蛋白和乳清蛋白发生修饰^[29,30], 故可使用蛋白质组学的方法对奶粉中蛋白质进行表征。Calvano 等^[28]还对样品二维凝胶电泳的差异斑点进行了质谱分析, 这是常用的差异蛋白验证方法。

从上述试验结果来看, 不同的研究生物标记物和检测限存在差异, 这可能是由于所定量的蛋白范围不同导致确定了不同生物标记物, 或是依据不同的生物标记物进行真实性鉴定, 但是都可以获得较低的检出限和明确的生物标记物, 足以说明蛋白质组学在牛乳真实性鉴定方面的可行性。

1.2 蛋白质组学在牦牛乳掺假检测中的应用

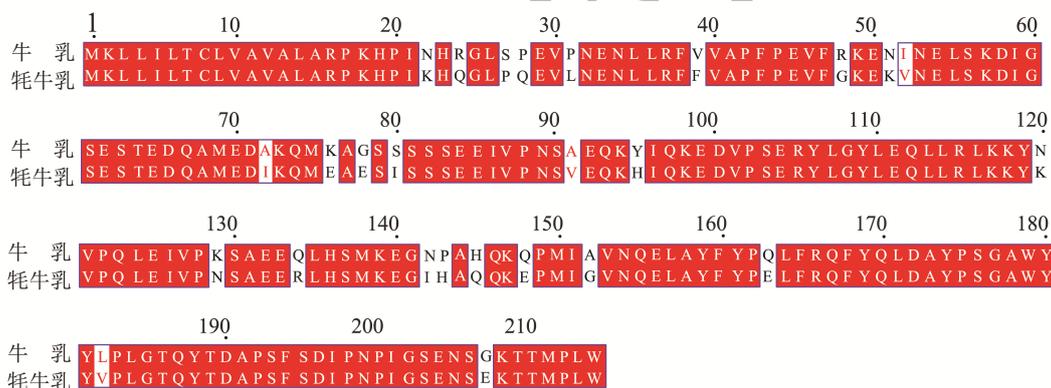


图1 牦牛乳与牛乳的 α_{S1} -酪蛋白肽序列对比

Fig.1 Alignment of α_{S1} -casein in yak and bovine milk

牦牛乳中脂肪、蛋白质、乳糖、维生素和必需氨基酸含量高, 脂肪酸种类多, 胆固醇含量较低, 具有一定的抗氧化能力^[31]。Yang 等^[32]分析了包含牦牛在内的多个物种的乳脂肪球膜 (Milk Fat Globule Membrane, MFGM) 组成, 通过 iTRAQ 技术对蛋白质进行鉴定和定量, 揭示了 MFGM 蛋白的物种差异, 可用于蛋白质印迹法或 ELISA 法检测物种乳掺假。此外, Yang 等^[33]基于 iTRAQ 技术分析了包括牦牛乳在内的五种乳的乳清蛋白质组, 五种乳的乳清蛋白的组学模型存在显著差异, 其中牦牛的物种特异蛋白为一种未命名蛋白。陈雨滢等^[34]基于靶向蛋白质组学技术, 采用超高效液相色谱串联高分辨质谱/串联三重四极杆质谱 (UPLC-OrbitrapMS, UPLC-TQMS), 得出

了包括牦牛乳在内的八种物种乳的特征肽段, 其中牦牛的特征肽段为 β -乳球蛋白的 LSFNPTQLEGQCHI。将牦牛乳 β -乳球蛋白的肽序列与牛乳比较, 发现只存在一处差异, 存在于特征肽段内部 (图 1)。特征多肽分析不仅能用于多物种乳蛋白的鉴别, 还可满足高温灭菌乳或乳粉等加工奶制品的检测。

1.3 蛋白质组学技术在水牛乳掺假检测中的应用

水牛乳的蛋白质、脂肪、乳糖、总固形物、维生素和矿物质含量较高, 这改善了水牛乳的口感, 可用于制造奶酪^[35]。等电聚焦 (Isoelectric Focusing, IEF)

是常用的检测水牛乳真实性的方法，但容易出现假阳性的结果，通过蛋白质组学程序替代/结合这一方法可以有效避免^[36]。Russo 等^[37]运用 MALDI-TOF MS 检测水牛乳清干酪中掺入的牛乳清干酪。以 β -乳球蛋白的 149-162 肽段为分子标记物，最终得到的检出限为 5%。Sassi 等^[38]也运用相同的技术对水牛、绵羊、山羊和牛的液态乳进行了分析，并确定了各自的物种特异性肽段，同时还对超高温灭菌乳、巴氏杀菌乳、生乳和奶粉进行生物标记物的表征。Bernardi 等^[39]使用高效液相色谱-质谱/质谱 (High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS) 对水牛乳酪中掺入的羊奶和牛奶进行检测。从 MASCOT 数据库获得的鉴定信息可知山羊乳和牛乳的特征肽段分别为 α_{S1} -酪蛋白的肽段 YLGYLEQLLK 和 α_{S2} -酪蛋白的肽段 AMKPWIQPK。这些特定肽段已成功应用于不同成分的奶酪的鉴定，在物种乳掺假的检测中表现出高度的特异性。同时还发现奶酪的老化和生产方式并不会影响物种特异性肽的鉴定。

2 蛋白质组学技术在羊乳掺假检测中的应用

羊乳可以改善轻微的消化疾病和预防婴儿过敏性疾病^[40]，对于患有牛乳引起的胃肠道过敏和慢性肠病的婴儿，可选择羊乳作为替代，目前常见的羊乳掺假

是向羊乳及乳粉中掺入液态牛乳或乳粉。Girolamo 等^[41]使用 MALDI-TOFMS 对山羊乳中掺假的牛乳进行分析，利用 FlexControl 软件分析质谱，通过层次聚类分析 (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) 和主成分分析，在 0.5% 的水平上能够直观的分出山羊乳中是否掺入液态生牛乳。Jamnik 等^[42]采用二维凝胶电泳结合 MALDI-TOFMS 的鉴定方法，发现以 κ -酪蛋白为标记物，能够鉴定山羊乳中掺入的牛乳，检出限为 2%。这项研究中山羊和奶牛乳的 κ -酪蛋白在二维凝胶上位置不同，利用 MALDI-TOFMS 对不同位置条带进行蛋白质鉴定。Jamnik 等^[42]和 Girolamo 等^[41]运用了相同的分析方法，但是前者的研究中检测限略高，这可能是由于后者并未进行生物标记物的确定而直接分析差异性。

Nardiello 等^[43]通过纳米液相色谱与串联质谱联用 (Nano-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, nanoLC-MS/MS) 方法，以来自 β -乳球蛋白的肽段 LSFNPTQLEEQCHI 和 α_{S1} -酪蛋白的肽段 HQGLPQEVLENLLR 为生物标记物，能够检测出羊乳中掺入的牛乳，该方法检出限为 1%，通过羊乳与牛乳的 α_{S1} -酪蛋白肽序列对比和羊乳与牛乳的 β -乳球蛋白肽序列对比，可以发现肽段序列上有明显差异，但只有肽段 LSFNPTQLEEQCHI 和肽段 HQGLPQEVLENLLR 被测定为信号肽段(图2、图3)。

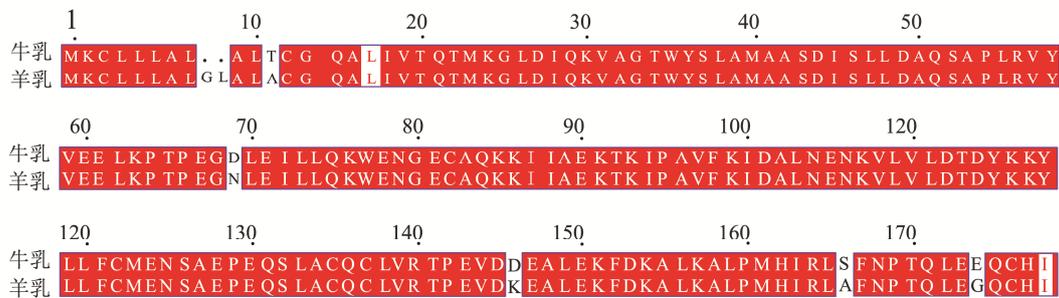


图2 羊乳与牛乳的 β -乳球蛋白肽序列对比

Fig.2 Alignment of β -lactoglobulin in bovine and goat milk

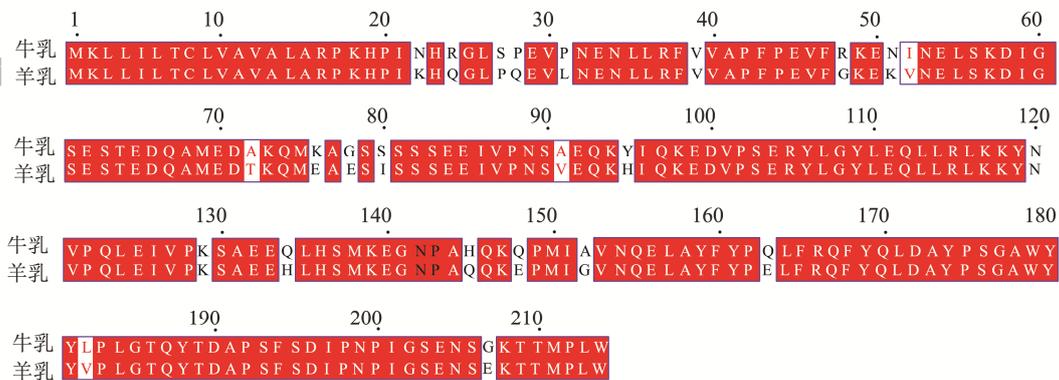


图3 羊乳与牛乳的 α_{S1} -酪蛋白肽序列对比

Fig.3 Alignment of α_{S1} -casein in bovine and goat milk

表 2 蛋白质组学在不同乳品掺假中的应用

Table 2 Application of proteomics in adulteration of different dairy products

掺假乳品类型	掺假物	检出限	分析方法	标记物	离子源	参考文献
液态牛乳	大豆蛋白; 豌豆蛋白; 水解小麦蛋白; 水解水稻蛋白	0.5%, 2%, 0.5%, 4%	nanohPLC-MS	β -伴大豆球蛋白的 α 亚基、 <i>Convictin</i> 、 α -淀粉酶抑制剂 <i>CMS3</i>	ESI	[24]
液态牛乳	全脂乳粉	0.5%	UPLC-QTOF-MS	α -乳白蛋白糖基化多肽段 <i>FLDDDDLTDDMCVK</i> α_{S1} -酪蛋白的去磷酸化肽段 <i>YKVPQLEIVPNSAHER</i> 、 α_{S1} -酪蛋白的糖基化肽段 <i>TKVIPYIR</i> 、 β -酪蛋白的乳糖基化肽段 <i>VLPYPOKAVPYQR</i> 、 β -乳球蛋白的乳糖基化肽段 <i>LIITQTMKGLDIQK</i> 、 β -乳球蛋白的乳糖基化肽段 <i>ALKALPMMHIR</i> 和 β -乳球蛋白的乳糖基化肽段 <i>TPEVDDEALEKFDK</i>	ESI	[27]
液态牛乳	乳粉	1%	MALDI-TOF MS	β -伴大豆球蛋白、豌豆蛋白	MALDI	[28]
牛乳粉	大豆蛋白; 豌豆蛋白	1%	UPLC-QTOF-MS	β -伴大豆球蛋白、豌豆蛋白	ESI	[25]
牛乳粉	大豆蛋白	10%	UPLC-TQMS	α_{S1} -酪蛋白肽段 <i>FFVAPPEVFGK</i> 、 κ -酪蛋白肽段 <i>YIPIQVLSR</i> 、 α_{S2} -酪蛋白肽段 <i>FALPOYLK</i> 、 β -乳球蛋白肽段 <i>IDALNENK</i> 和 β -酪蛋白肽段 <i>VLPYPOK</i>	ESI	[26]
液态羊乳	液态牛乳	0.5%	MALDI-TOF MS	-	MALDI	[41]
液态羊乳	液态牛乳	1%	nanolC-MS/MS	β -乳球蛋白的肽段 <i>LSFNPTQLEEQCHI</i> 和来自 α_{S1} -酪蛋白的肽段 <i>HQGLPQEVLENLLR</i>	ESI	[43]
液态羊乳	液态牛乳	2%	MALDI-TOF MS	κ -酪蛋白	MALDI	[42]
山羊乳粉	牛乳	-	UPLC-TOF-MS 和 UPLC-TQMS	β -乳球蛋白的肽段 <i>LSFNPTQLEEQCHI</i>	ESI	[44]
羊乳清干酪	牛乳清蛋白	0.5%	LC-MS/MS	β -乳球蛋白肽段 <i>LSFNPTQLEEQCHI</i> 和 α -乳清蛋白的物种特异性肽	ESI	[45]
液态驼乳	-	-	MALDI-TOF MS 和二维凝胶电泳	物种特异蛋白 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白	MALDI	[48]
驼乳乳清	-	-	iTRAQ	乳清酸性蛋白和醌氧化还原酶	加热电喷雾高 子源 (H-ESI)	[33]
水牛乳清干酪	牛乳清干酪	5%	MADLI-TOF MS	β -乳球蛋白的 149-162 肽段	MALDI	[37]
水牛乳酪	牛乳、山羊乳、绵羊乳	-	HPLC-MS/MS	α_{S1} -酪蛋白的肽段 <i>YLYLEQLK</i> 和 α_{S2} -酪蛋白的肽段 <i>AMKPIWQPK</i>	ESI	[39]
液态驴乳	液态牛乳	0.5%	MADLI-TOF MS	-	MALDI	[41]
牦牛乳清	-	-	iTRAQ	蛋白质 <i>FIMK50</i>	加热电喷雾高 子源 (H-ESI)	[33]
牦牛乳	-	-	UPLC-Orbitrap MS 和 UPLC-TQMS	牦牛 β -乳球蛋白特征肽段 <i>LSFNPTQLEGGCHI</i>	ESI	[34]

Chen 等^[44]分别使用 (Ultra-Performance Liquid Chromatography-Time-of-Flight-Mass Spectrometry, UPLC-TOF-MS) 和 UPLC-TQMS 对山羊乳粉中掺假的牛乳进行定性和定量, 确定了生物标记物 β -乳球蛋白的肽段 *LSFNPTQLEEQCHI* 可作为山羊乳中掺假牛乳的生物标记物, 这可能是因为采用的分析技术不同。Camerini 等^[45]基于液相色谱-串联质谱 (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 的分析方法可得出和 Chen 的研究中相同的特异性肽段 *LSFNPTQLEEQCHI*, 检出限更低, 为 0.5%, 这可能是因为 Camerini 选择的二级质谱精确度更高。

3 蛋白质组学技术在驼乳掺假检测中的应用

驼乳具有很高的营养和药用价值, 产量低、价格高, 经常发生驼乳中掺入羊乳、牛乳的情况^[46,47]。Katharina 等^[48]利用二维凝胶电泳结合 MALDI-TOFMS 对生乳样品进行分析, 并运用蛋白质组学鉴定软件 MASCOT 进行搜索。结果显示驼乳与牛、山羊、水牛、马乳的蛋白质组成存在显著差异。骆驼乳中不含 β -乳球蛋白, 而牛、水牛、山羊和马乳中 β -乳球蛋白是主要的乳清蛋白, α -乳清蛋白是骆驼乳中含量最丰富的乳清蛋白, 具有 123 个残基, 分子量为 14.6 ku, 与其他动物乳相比差异较大, 因此, 牛和山羊奶中的 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白在凝胶上的分布差异可作为检测骆驼奶掺入牛或山羊奶的依据。Yang 等^[49]运用同样的方法, 得到了相似的结果。在掺入 2% (V/V) 牛乳或羊乳的驼乳中, 通过比较二维凝胶电泳的图像差异并利用 MALDI-TOFMS 进行分析, 发现羊乳或牛乳的 α -乳清蛋白、 β -乳球蛋白和 α_{S1} -酪蛋白的电泳斑点能够作为标记物来鉴定驼乳真实性。在掺入 0.5% (V/V) 牛乳或羊乳的驼乳中, 羊乳或牛乳的 β -乳球蛋白可作为鉴定驼乳真实性的依据。Yang 和 Katharina 的研究均是采用二维凝胶电泳图像直观的区别不同乳, 将特定蛋白斑点胶内消化后进行质谱分析, 虽然这种方法会高度依赖电泳结果, 根据实验人员操作熟练程度的差异会出现误差。但两项研究所确定的标记物相同, 证明了这种鉴定方法的可行性。此外, Yang 等^[33]还利用相对和绝对定量同位素标记 (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation, iTRAQ) 技术定量分析了驼乳、牛乳、牦牛乳、水牛乳和山羊乳的乳清蛋白。骆驼乳的乳清酸性蛋白和醌氧化还原酶, 山羊奶的双糖链蛋白聚糖以及牛奶的伯胺氧化酶可作为表征蛋白, 这为鉴定驼乳真实性提供了支持。驼乳不含 β -乳球蛋白, 因此, 以 β -乳球蛋白

为掺假标记物可通过电泳条带鉴定方法便捷的鉴定驼乳中是否掺入牛或羊等其他物种乳。

4 蛋白质组学在驴乳掺假检测中的应用

驴乳口感良好, 溶菌酶含量高, 对病原微生物具有选择性作用。驴乳产量低, 售价较高, 但目前利用蛋白质组学鉴定驴乳真实性的研究较少^[50,51]。Girolamo 等^[41]利用 MALDI-TOFMS 分析了掺假了牛乳的驴乳样品, 并通过 PCA 和 HCA 直观的区分了掺假样品和未掺假样品, 得到 0.5% 的检出限。Zhang 等^[52]比较了牛乳和驴乳的乳清蛋白质组, 结果显示牛乳和驴乳种异表达的乳清蛋白数量多达 365 个, 这一结果可作为潜在的掺假标记物。

5 结语

蛋白质组学通过物种蛋白差异性可成功确定物种乳的真实性。本文依据乳的种类分类, 对蛋白质组学在乳品掺假检测和乳中特异性生物标记物方面的研究进行了综述, 包括分析手段、检出限、生物标记物等, 可以看出蛋白质组学可以在较低水平上鉴定外源性蛋白, 不同物种乳生物标记物的确定可以作为乳品真实性鉴定的依据。但不管是真实性鉴定还是结果验证, 蛋白质组学在这方面的应用高度依赖质谱分析, 但乳品中蛋白质的复杂性和分析技术的局限性不利于蛋白质组学对乳品中低丰度蛋白的检测。近年来质谱技术进展飞快, 有利于更快、更详尽地对蛋白质组进行表征, 也预示着蛋白质组学在乳品掺假检测方面的广阔前景。高通量、精确、快速和便携将成为蛋白质组学检测应用的主要发展方向, 以图像来展示差异的方法将会受到更多的青睐。

参考文献

- [1] 王文强, 文豪, 张文众, 等. 基于美国药典委 EMA 数据库的全球经济利益驱动型掺假和食品欺诈的分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(3): 804-810.
- [2] Kumar D, Verma A K, Chatli M K, et al. Camel milk: Alternative milk for human consumption and its health benefits [J]. Nutrition & Food Science, 2016, 46(2): 217-227.
- [3] Sen S, Dundar Z, Uncu O, et al. Potential of Fourier-transform infrared spectroscopy in adulteration detection and quality assessment in buffalo and goat milks [J]. Microchemical Journal, 2021, 166: 106207.
- [4] Rodrigues N, Givisiez P, Queiroga R, et al. Milk adulteration: Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay [J].

- Journal of Dairy Science, 2012, 95(5): 2749-2752.
- [5] Pesic M, Barac M, Vrvic M, et al. Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE [J]. Food Chemistry, 2011, 125(4): 1443-1449.
- [6] Song H, Xue H, Yan H. Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay [J]. Food Control, 2011, 22(6): 883-887.
- [7] Trimboli F, Costanzo N, Lopreiato V, et al. Detection of buffalo milk adulteration with cow milk by capillary electrophoresis analysis [J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(7): 5962-5970.
- [8] Huang Y F, Huang C C, Hu C C, et al. Capillary electrophoresis - based separation techniques for the analysis of proteins [J]. Electrophoresis, 2006, 27(18): 3503-3522.
- [9] Danezis G P, Tsagkaris A S, Camin F, et al. Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016, 85: 123-132.
- [10] Aslam B, Basit M, Nisar M A, et al. Proteomics: technologies and their applications [J]. Journal of Chromatographic Science, 2016: 1-15.
- [11] 卢威风,张雪萌,闵乾昊. 电化学过程原位质谱分析研究进展[J]. 分析测试学报, 2022, 41(1): 11.
- [12] Nadler W M, Waidelich D, Kerner A, et al. MALDI versus ESI: the impact of the ion source on peptide identification [J]. Journal of Proteome Research, 2017, 16(3): 1207-1215.
- [13] El-Aneel A, Cohen A, Banoub J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers [J]. Applied Spectroscopy Reviews, 2009, 44(3): 210-230.
- [14] Das S, Sivaramakrishna M, Biswas K, et al. Performance study of a 'constant phase angle based' impedance sensor to detect milk adulteration [J]. Sensors & Actuators A Physical, 2011, 167(2): 273-278.
- [15] Musara C, Pote W. Application of osmometry in quality analysis of milk [J]. Journal of Food Science & Technology, 2014, 51(3): 606-610.
- [16] Dos Santos P M, Pereira-Filho E R. Digital image analysis - an alternative tool for monitoring milk authenticity [J]. Analytical Methods, 2013, 5(15): 3669-3674.
- [17] Zhu X, Guo W, Liang Z. Determination of the fat content in cow's milk based on dielectric properties [J]. Food & Bioprocess Technology, 2015, 8(7): 1485-1494.
- [18] Mabood F, Ali L, Boque R, et al. Robust Fourier transformed infrared spectroscopy coupled with multivariate methods for detection and quantification of urea adulteration in fresh milk samples [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(10): 5249-5258.
- [19] Farah J S, Cavalcanti R N, Guimarães J T, et al. Differential scanning calorimetry coupled with machine learning technique: An effective approach to determine the milk authenticity [J]. Food Control, 2021, 121: 107585.
- [20] Jaiswal P, Jha S N, Kaur J, et al. Rapid detection and quantification of soya bean oil and common sugar in bovine milk using attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy [J]. International Journal of Dairy Technology, 2018, 71(2): 292-300.
- [21] Kim J M, Kim H J, Park J M. Determination of milk fat adulteration with vegetable oils and animal fats by gas chromatographic analysis [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(9): C1945-C51.
- [22] De Oliveira Mendes T, Rodrigues B V M, Porto B L S, et al. Raman Spectroscopy as a fast tool for whey quantification in raw milk [J]. Vibrational Spectroscopy, 2020, 111: 103150.
- [23] Andrade J, Pereira C G, De Almeida Junior J C, et al. FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration [J]. Lwt, 2019, 99: 166-172.
- [24] Yang J H, Zheng N, Soyeurt H, et al. Detection of plant protein in adulterated milk using nontargeted nano-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with principal component analysis [J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(1): 56-64.
- [25] Lu W Y, Liu J, Gao B Y, et al. Technical note: Nontargeted detection of adulterated plant proteins in raw milk by UPLC-quadrupole time-of-flight mass spectrometric proteomics combined with chemometrics [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(9): 6980-6986.
- [26] Hao X, Fu L, Shao L, et al. Quantification of major milk proteins using ultra-performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry and its application in milk authenticity analysis [J]. Food Control, 2022, 131: 108455.
- [27] Du L, Lu W, Zhang Y, et al. Detection of milk powder in liquid whole milk using hydrolyzed peptide and intact protein mass spectral fingerprints coupled with data fusion technologies [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(3): 1471-1479.
- [28] Calvano C D, Monopoli A, Loizzo P, et al. Proteomic approach based on MALDI-TOF MS to detect powdered milk in fresh cow's milk [J]. Journal of Agricultural and Food

- Chemistry, 2013, 61(8): 1609-1617.
- [29] Van Boekel M. Effect of heating on Maillard reactions in milk [J]. Food Chemistry, 1998, 62(4): 403-414.
- [30] Fox, F P. Heat-induced changes in milk preceding coagulation [J]. Journal of Dairy Science, 1981, 64(11): 2127-2137.
- [31] Li H, Ma Y, Li Q, et al. The chemical composition and nitrogen distribution of Chinese yak (Maiwa) milk [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(8): 4885-4895.
- [32] Yang Y, Zheng N, Zhao X, et al. Proteomic characterization and comparison of mammalian milk fat globule proteomes by iTRAQ analysis [J]. Journal of Proteomics, 2015, 116: 34-43.
- [33] Yang Y X, Bu D P, Zhao X W, et al. Proteomic analysis of cow, yak, buffalo, goat and camel milk whey proteins: Quantitative differential expression patterns [J]. Journal of Proteome Research, 2013, 12(4): 1660-1667.
- [34] 陈雨滢,任一平,王丽丽,等.靶向蛋白质组学技术在多物种奶及其奶制品鉴别中的应用研究[J].分析化学,2021,49(9): 1523-1541.
- [35] Li S, Li L, Zeng Q, et al. Separation and quantification of milk casein from different buffalo breeds [J]. Journal of Dairy Research, 2016, 83(3): 317-325.
- [36] Caira S, Nicolai M A, Lilla S, et al. Eventual limits of the current EU official method for evaluating milk adulteration of water buffalo dairy products and potential proteomic solutions [J]. Food Chemistry, 2017, 230: 482-490.
- [37] Russo R, Rega C, Chambery A. Rapid detection of water buffalo ricotta adulteration or contamination by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2016, 30(4): 497-503.
- [38] Sassi M, Arena S, Scaloni A. MALDI-TOF-MS platform for integrated proteomic and peptidomic profiling of milk samples allows rapid detection of food adulterations [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(27): 6157-6171.
- [39] Bernardi N, Benetti G, Hauet N M, et al. A rapid high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for unambiguous detection of different milk species employed in cheese manufacturing [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(12): 8405-8413.
- [40] Kao H F, Wang Y C, Tseng H Y, et al. Goat milk consumption enhances innate and adaptive immunities and alleviates allergen-induced airway inflammation in offspring mice [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 184.
- [41] Di Girolamo F, Masotti A, Salvatori G, et al. A sensitive and effective proteomic approach to identify she-donkey's and goat's milk adulterations by MALDI-TOF MS fingerprinting [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(8): 13697-13719.
- [42] Jamnik P, Volk H, Ogrinc N, et al. Potential of bovine kappa-casein as biomarker for detection of adulteration of goat's milk with cow's milk [J]. Mljekarstvo/Dairy, 2019, 69(1): 78-84.
- [43] Nardiello D, Natale A, Palermo C, et al. Milk authenticity by ion-trap proteomics following multi-enzyme digestion [J]. Food Chemistry, 2018, 244: 317-323.
- [44] Chen Q, Ke X, Zhang J S, et al. Proteomics method to quantify the percentage of cow, goat, and sheep milks in raw materials for dairy products [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(12): 9483-9492.
- [45] Camerini S, Montepeloso E, Casella M, et al. Mass spectrometry detection of fraudulent use of cow whey in water buffalo, sheep, or goat Italian ricotta cheese [J]. Food Chemistry, 2016, 197: 1240-1248.
- [46] Ibrahim H R, Isono H, Miyata T. Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins [J]. Animal Nutrition, 2018, 4(3): 273-280.
- [47] Hussain H, Wattoo F H, Wattoo M H S, et al. Camel milk as an alternative treatment regimen for diabetes therapy [J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(3): 1347-1356.
- [48] Hinz K, O'connor P M, Huppertz T, et al. Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk [J]. Journal of Dairy Research, 2012, 79(2): 185-191.
- [49] Yang Y, Zheng N, Yang J, et al. Animal species milk identification by comparison of two-dimensional gel map profile and mass spectrometry approach [J]. International Dairy Journal, 2014, 35(1): 15-20.
- [50] Martini M, Altomonte I, Licitra R, et al. Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk [J]. Journal of Equine Veterinary Science, 2018, 65: 33-37.
- [51] Fantuz F, Ferraro S, Todini L, et al. Distribution of calcium, phosphorus, sulfur, magnesium, potassium, and sodium in major fractions of donkey milk [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(10): 8741-8749.
- [52] Zhang X, Jiang G, Ji C, et al. Comparative whey proteome profiling of donkey milk with human and cow milk [J]. Frontiers in nutrition, 2022, 9: 911454.

现代食品科技