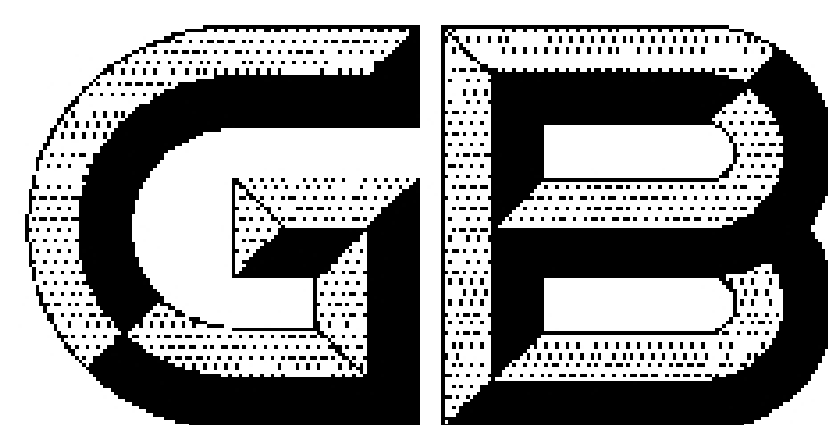




中华人民共和国国家标准

GB/T 5413.2—1997

婴幼儿配方食品和乳粉 乳清蛋白的测定

Milk powder and formula foods for infant and young children—
Determination of whey protein

1997-05-28 发布

1998-09-01 实施

国家技术监督局 发布

前 言

本标准参考了日本森永公司的乳清蛋白测定方法。

本系列标准从实施之日起,代替 GB 5413—85。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位:哈尔滨森永乳品有限公司、国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、雀巢(中国)投资服务有限公司。

本标准主要起草人:于丽坤、张燕杰、赵勤。

中华人民共和国国家标准

婴幼儿配方食品和乳粉
乳清蛋白的测定

GB/T 5413.2—1997

代替 GB 5413--85

Milk powder and formula foods for infant and young children
—Determination of whey protein

1 范围

本标准规定了酪蛋白与乳清蛋白含量比率的测定方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品和乳粉中酪蛋白与乳清蛋白含量比率的测定。

2 方法提要

试样用 SDS-聚苯烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, Laemmli 法) 后, 用光密度计对按分子量顺序分离开的酪蛋白与乳清蛋白各谱带进行测定, 求得酪蛋白与乳清蛋白的含量比率。

3 试剂

所有试剂, 如未注明规格, 均指分析纯; 所有实验用水, 如未注明其他要求, 均指三级水。

3.1 电泳缓冲液: 将 Tris(hydroxymethyl)aminomethane 7.5g、甘氨酸 36g、SDS 2.5g 溶于蒸馏水中, 定容至 500mL。使用前以蒸馏水稀释 5 倍后使用。

3.2 SDS 试样缓冲液: 0.125mol/L Tris-盐酸 (pH6.8), 体积分数 20% 的甘油, 4% (m/V) SDS, 体积分数 10% 2-mercaptoethanol, 质量分数 0.0025% 的溴酚蓝 (bromophenol blue)。

3.3 染色剂: 质量分数 0.1% 考马斯蓝 R-250 (Coomassie brilliant blue R-250), 体积分数 10% 的甲醇, 体积分数 7.5% 的乙酸。

3.4 脱色剂: 体积分数 10% 的甲醇, 体积分数 7.5% 的乙酸。

3.5 酪蛋白。

3.6 精制乳清蛋白 (WPC)。

3.7 SDS-PAGE: 用梯度凝胶 (10%~20%) 或同效凝胶。

4 仪器

常用实验室仪器及:

4.1 平板式电泳槽。

4.2 供电设备。

4.3 光密度计。

5 操作步骤

5.1 样液的制备

将试剂按蛋白质 10~20μg/μL 的浓度范围溶解在蒸馏水中。加入与试样同体积的 SDS 试样缓冲

液,在煮沸热水中静置 5min 后,作为试样液。

5.2 标准溶液的制备

使用前,酪蛋白和乳清蛋白的蛋白质浓度按凯氏(Kjeldahl)法精确测定。将酪蛋白和乳清蛋白按上述方法分别进行溶解和处理后作为标准溶液。此外,还可将酪蛋白与乳清蛋白的标准溶液按蛋白质含量的任意比率(比如蛋白质的浓度比为 75 : 25,50 : 50,25 : 75)进行混合作为混合标准溶液。

5.3 电泳

将凝胶设置在电泳槽中,加入电泳缓冲液。试样溶液与标准溶液的添加量为每孔 10 μ L。电泳时间因电泳凝胶的种类不同而异。以 10%~20%的梯度复合凝胶进行电泳时,定电流为 40mA,时间为 60min。电泳结束时间可按溴酚蓝的蓝谱带到达离凝胶下端 5mm 时为标志。电泳结束后将凝胶放入染色液中振荡染色 1h,然后转入脱色液中振荡脱色 12h 再移到蒸馏水中。

5.4 测定

以光密度计对带色的各谱带进行测定,求得其颜色深度(OD)的积分值(=Trace 值)。

6 分析结果的表述

6.1 谱带的测定

电泳后的谱带中,参照分子量以及标准酪蛋白与乳清蛋白的电泳图,分别选择以下谱带进行计算。

(1)酪蛋白: α_2 -酪蛋白(分子量 23500), β -酪蛋白(分子量 24000), κ -酪蛋白(分子量 19000);

(2)乳清蛋白: α -乳白蛋白(分子量 14000), β -乳球蛋白(分子量 18000),血清白蛋白(分子量 66000)。

6.2 计算方法

将以上三种酪蛋白谱带的 Trace 值合计,再除以该条泳线中所有谱带的 Trace 值的总和,求得酪蛋白的比率(C_1 值)。以同样方式将以上三种乳清蛋白谱带的 Trace 值合计,再除以该条泳线中所有谱带 Trace 值的总和,求得乳清蛋白的比率(W_1 值)。

当以酪蛋白与乳清蛋白的单独溶液为标准溶液时,按以上方法分别求得标准酪蛋白的 C_1 值(= C_s 值)与标准乳清蛋白的 W_1 值(= W_s 值)。将试样的 C_1 值与 W_1 值分别除以 C_s 值与 W_s 值,求得暂定的酪蛋白含量比率(C_2 值)与乳清蛋白的含量比率(W_2)。当 C_2 值+ W_2 值不等于 1 时,将 C_2 值、 W_2 值分别除以 C_2 值与 W_2 值的总和进行补整,求得试样中的酪蛋白以及乳清蛋白的比率。

当以酪蛋白与乳清蛋白的混合溶液为标准溶液时,按以上方法分别求得各混合比率中酪蛋白的 C_1 值与乳清蛋白的 W_1 值。将混合标准溶液的 C_1 值与酪蛋白含量比,以及 W_1 值与乳清蛋白含量比做成坐标检量线,利用该检量线求得试样的 C_2 值与 W_2 值。当 C_2 值+ W_2 值不等于 1 时,将 C_2 值、 W_2 值分别除以 C_2 值与 W_2 值的总和进行补整,求得试样中酪蛋白以及乳清蛋白的比率。