

## 等电沉淀法分离酪蛋白-folin 酚法测乳清蛋白含量

杜彬荷、韩艾麟、黄义捷、唐顾原、张瀚卿、朱震宇

(复旦大学 生命科学学院)

**【摘要】**牛奶是最古老的天然饮料之一，被誉为“白色血液”。饮用牛奶可补充蛋白质。牛奶中的蛋白主要由酪蛋白和乳清蛋白两大部分组成。本实验以脱脂牛奶为原料，采用等电沉淀法提取出酪蛋白并烘干称重；用 Folin-酚法测出上清中乳清蛋白的含量。最后我们得到的牛奶样品中的蛋白含量，与产品描述相近。实验提供了一个测牛奶蛋白质总量的新思路。

**【关键词】**牛奶、蛋白质含量、等电沉淀、folin 酚法

中图分类号：            文献标识码：            文章编号：

## The extraction of casein from milk by isoelectric precipitation and quantification of lactoalbumin with the Folin phenol reagent

Ailin Han, Binhe Du, Guyuan Tang, Hanqing Zhang, Yijie Huang, Zhenyu Zhu

(School of Life Science, Fudan University)

**【abstract】** Milk is one of the natural beverages with ancient history. It is hailed as “white blood”. Drinking milk can be a good source of protein intake. The milk proteins are comprised of two large groups-- the casein and the lactoalbumin. In this experiment, we extract casein from fat-free milk and weigh it then we quantify lactoalbumin with the Folin phenol reagent. In the end, we determine the overall protein content of the sample milk and find it in consistence with the description of the product. Our experiment provides a new method to determine the overall protein level of milk.

**【keywords】** Milk, Protein level, Isoelectric precipitation, Folin phenol reagent

### 一、引言

牛奶是人们日常生活中常见的饮料，因其营养成分丰富被称为“白色血液”。蛋白质含量通常被作为衡量牛奶质量好坏的一个重要指标。对人体机能而言，蛋白质起着生命活动的承担者的重要角色。而牛奶中的蛋白经过消化分解可以产生每一种人体必需氨基酸，因而属于高质量的蛋白。

为了测定牛奶中蛋白质的含量，目前常用的方法是凯氏定氮法，通过测氮的含量间接去评估蛋白质含量。这就导致了許多非法厂商使用三聚氰胺滥竽充数，因而需要一种新型的牛奶总蛋白的测量方法。由于牛奶蛋白分为两个类群：酪蛋白和乳清蛋白，且两种蛋白质的溶

解性质不同，我们利用所学的蛋白沉淀点知识以及生物化学实验课常用的实验仪器和方法，设计出了一种新的测牛奶蛋白质含量的方法。即：等电沉淀法分离酪蛋白，通过天平称其重量；乳清蛋白经过稀释至符合 Folin 酚法测定的浓度，用 752 型分光光度计测其 OD 值，与实验所得标准曲线进行比较定量。

最后，此种方法的可行性得到验证。我们对样品牛奶的质量进行了评价，也对实验方法提出了一些改进意见。

## 二、实验部分

### 2.1 材料、仪器与试剂

(1) 材料：安佳脱脂牛奶

(2) 实验仪器：

恒温水浴锅、离心机、50ml 离心管、布氏漏斗与抽滤装置、烘箱、漏斗、滤纸、752 分光光度计、比色皿、试管、吸量管、量筒、玻璃棒、电动移液器、试管架、1ml 移液枪、烧杯、洗瓶、煤气灯、铜锅与三脚架、点火器、pH 试纸、称量纸。

(3) 试剂：

2M 醋酸钠缓冲液、95%乙醇、0.25mg/mL BSA、试剂甲（双缩脲）、试剂乙（Folin-酚试剂）。

### 2.2 实验原理：

蛋白质分子在溶液中具有胶体溶液的特性。蛋白质分子与水分子之间的水化作用、蛋白质分子间的静电相互作用使得蛋白质在水中能形成稳定的胶体溶液。如果条件改变，蛋白质溶液的胶体性质就会被破坏，它们会相互结合形成更大的分子聚集体而从溶液中沉淀，这种作用称为蛋白质的沉淀作用。常见的可逆沉淀作用有：等电沉淀作用、盐析沉淀作用。常见不可逆沉淀作用有溶剂的沉淀作用，重金属盐类和生物碱试剂的沉淀作用。一般牛奶的主要化学成分含量如下：水分：87.5%、脂肪：3.5~4.2%、蛋白质：2.8~3.4%、乳糖：4.6~4.8%、无机盐：0.7%左右；而脱脂牛奶的脂肪含量只有 0.5%。相对于从细胞或者其他活体组织提取蛋白牛奶本身就是一个比较简单的蛋白胶体体系，因而比较适合用于研究蛋白的等电点相关性质。酪蛋白（casein）是牛奶中的主要蛋白质，其含量约占牛奶总量的 80%。乳白蛋白约占总蛋白量的 9%，乳球蛋白约占总蛋白量的 3%左右，其他还有血清白、免疫球蛋白及酶。 $\alpha$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白的等电点分别为 4.1、4.5、5.9。而许多实验都表面 pH=4.6-4.8 之间时，酪蛋白沉淀达到最大。

沉淀掉酪蛋白后，牛奶就变成了“乳清液”。乳糖的水溶性很好，基本上被留下了，在乳清液中的含量能占到 5%左右。而大部分蛋白质和脂肪变成奶酪走了，剩下的脂肪不到 0.5%，蛋白不足 1%，此外还有一些矿物质成分，因此可以用 Folin-酚法测定乳清中蛋白的含量。

Folin-酚试剂法最早是由 Lowry 确定的测定蛋白质浓度的基本方法。以后在生物化学领域得到广泛的应用。Folin-酚法测定蛋白质的试剂由甲试剂和乙试剂组成。甲试剂即双缩脲试剂，由碳酸钠，氢氧化钠，硫酸铜及酒石酸钾钠组成。蛋白质中的肽键在碱性条件下，与酒石酸钾钠铜盐溶液起作用，生成紫红色络合物。乙试剂即 Folin-酚试剂，是由磷钼酸和磷钨酸、硫酸、溴等组成。此试剂在碱性条件下，易被蛋白质中酪氨酸的酚基还原呈蓝色反

应，其色泽深浅与蛋白质含量成正比。此法也适用于测定酪氨酸和色氨酸的含量。本法可测定范围是 25—250  $\mu\text{g}$  蛋白质。

### 2.3 实验方法:

#### 2.3.1 酪蛋白的提取

- 1、打开恒温水浴锅，调整温度至 40℃；
- 2、取 150ml 烧杯两个，分别加入脱脂牛乳 40ml、醋酸钠缓冲液 40ml，水浴加热 8min 至 40℃；
- 3、将水浴加热后的醋酸钠缓冲液加入牛乳，边加边摇动（此时注意应该一边加一边继续水浴，防止缓冲液冷却），冷却至室温；
- 4、将混合液加入到 2 个 50ml 离心管，2000rpm 离心 5min，上清液保留转移到另外两个 50ml 离心管中，保留做后续鉴定；
- 5、往沉淀中加入 8ml 95%乙醇，继续 2000rpm 离心 5min，弃去上清；
- 6、将所得沉淀悬浮在约 30ml 乙醇中，用布氏漏斗抽滤；
- 7、所得沉淀再次用少量乙醇洗涤两次，抽干；
- 8、取出抽干的粉状物，摊开在表面皿上，使乙醇完全挥发，放在 65℃烘箱中，烘 1 小时左右；
- 9、取出产物，称其干重并计算产量。

#### 2.3.2 标准曲线的绘制

- 1、称量 9.203mg 牛血清白蛋白，加入 37ml 蒸馏水配成 0.25mg/ml 的蛋白标准液、
- 2、取 6 支试管，分别按下表加入试剂:

试剂	管号					
	1	2	3	4	5	6
蛋白质标准溶液(ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蛋白质含量 ( $\mu\text{g}$ )	0	50	100	150	200	250
蒸馏水 (ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
试剂甲 (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
摇匀，室温下放置 10 分钟						
酚试剂 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
立刻摇匀!!! 室温放置 30 分钟						
OD (650nm)						

- 3、加完酚试剂 30 分钟后，以第一管为空白，在波长 650nm 可见光比色，读取 OD 值。

4、以 OD 为纵坐标，蛋白质含量为横坐标，绘制蛋白质吸收曲线。

### 2.3.3 乳清蛋白含量的测定

#### 1、样品配制

对照组配制：

- ① 取三个烧杯，分别标号 a,b,c。各加入 10ml 之前保留的上清。
- ② a 烧杯放入 60℃ 的水浴锅中，缓缓加热至 90℃；b 烧杯中加入 13ml 无水乙醇，边加边搅拌；c 烧杯中加入 2.3g 碳酸钠固体并搅拌使其充分溶解。分别静置 10 分钟，观察乳清蛋白沉淀状况。
- ③ 选择沉淀较多的 b 烧杯中的乳清，吸取 4ml 于离心管中，8000rpm 离心 2min。
- ④ 吸取离心后的上清 2.5ml 于 50ml 容量瓶中，用蒸馏水定容至 50ml。（稀释倍数为 20）。

待测样品配制：

取 5ml 第一次离心后的上清于 100ml 容量瓶中，用蒸馏水定容至 100ml。（稀释倍数为 20）

#### 2、取 4 支试管，分别标号 1~4。

	1	2	3	4
待测样品溶液 (ml)	1.0	1.0	1.0	——
对照组溶液 (ml)	——	——	——	1.0
试剂甲 (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0
混匀，室温下放置 10min				
试剂乙 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5
立即混匀，室温下放置 30min				
以 4 号为空白对照，在 650nm 测量 OD 值				

#### 3、从标准曲线上查出待测样品蛋白质浓度。

## 三、结果与讨论

### 3.1 酪蛋白的提取

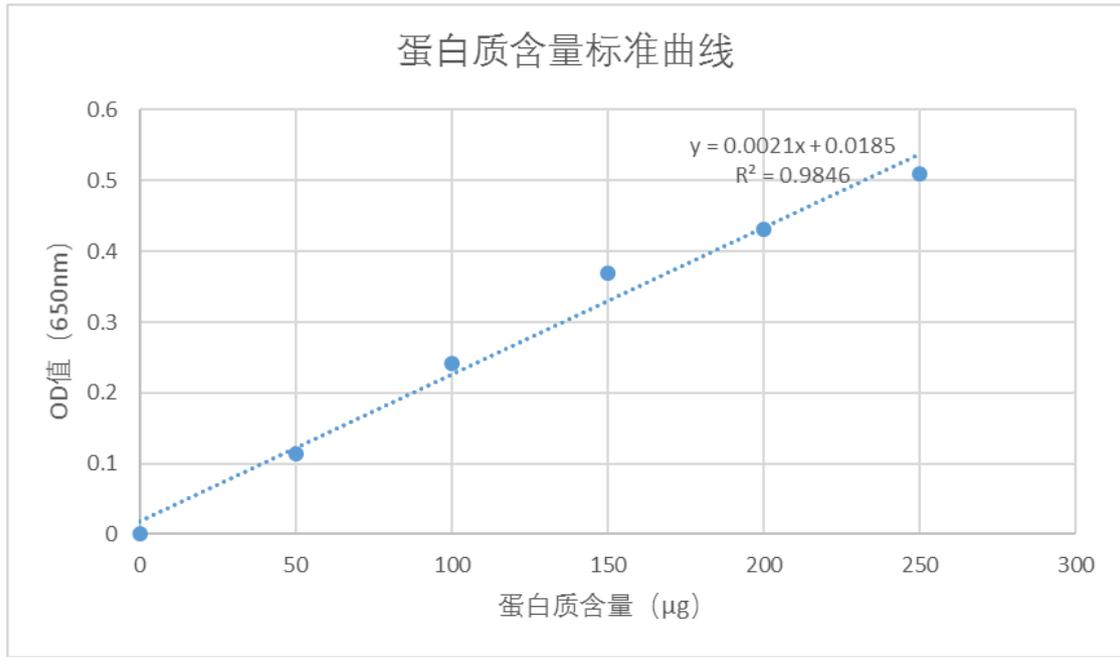
1、表面皿重：34.55g，总重量：35.93g，酪蛋白产物干重：1.38g，酪蛋白浓度：3.45g/100ml

2、产物图片（见附页）

### 3.2 标准曲线的绘制

以 OD 为纵坐标，蛋白质含量为横坐标，绘制蛋白质吸收曲线（见下图）。

管号	1	2	3	4	5	6
OD (650nm)	0	0.114	0.242	0.369	0.432	0.510



标准曲线公式  $y=0.0021x+0.0185$   
 $R^2=0.9846$  线性程度较好

### 3.3 乳清蛋白含量的测定

	1	2	3	4
OD 值 (650nm)	0.127	0.125	0.132	对照
平均值	0.128			——

1、查标准曲线得到的微克数：52.1

2、40mL 样品中乳清蛋白含量

乳清蛋白含量 (ug) ==查得 ug 数\*100\*80/5==1600\*查得 ug 数==83.4mg

### 3.4 数据整合

1、40mL 牛奶中的总蛋白量==1.38g+0.08g==1.46g。

2、换算成 100mL 牛奶的蛋白质量==1.46\*100/40==3.65g （营养成分表上标注的是：3.6g/100mL）。

## 四、实验讨论

### 4.1 酪蛋白的提取分析

1、实验获得酪蛋白提取物 1.38g，合 3.45g/100ml。在查阅资料后发现，该数值基本符合理论值。下面进行误差分析：

1) 烘干时间不够，水分未完全除去

由于实验条件限制，在 65 度下的烘干仅进行了 1 小时，可能造成部分的乙醇未除去。但考虑到乙醇易挥发的特性，该原因造成的误差应当较小。

2) 产物中含有杂质，使总质量偏高

在原来的实验计划中，采用 1:1 乙醇-乙醚混合液来除去牛奶中的脂肪。但由于乙醚有毒性，因此在实际的实验操作中仅使用了 95%乙醇进行洗涤，可能造成部分脂肪残留。为了减少这一原因产生的误差，我们特意选用了脱脂牛奶作为实验材料，因此该原因造成的误差应当较小。

3) 在样品的沉淀、洗涤过程中，产生损耗

该原因为人工操作产生的误差，但在实验每一步中均按照规范完成，未出现重大实验失误，因此该原因造成的误差应当较小。

综上，此实验的误差应当较小，实验结果可以采纳。

2、在对产物进行烘干后，发现实际产物中大部分为白色粉末，小部分为黄褐色结晶。其中，黄褐色结晶较脆。在对其进行分析后，认为其为酪蛋白的变性产物。经查阅资料发现，大部分蛋白质的变性温度应为 70 度左右，因此在 65 度的烘箱中烘烤有可能导致酪蛋白产生变性。

4.2 标准曲线的绘制分析

1、经查阅资料发现，福林酚法蛋白质测定范围是 25ug-250ug。本实验标准曲线设置的蛋白质测定范围是 0-250ug，较为合理。认为可以增设一管，蛋白质含量为 25ug，增加标准曲线的准确度。

2、福林-酚法测定蛋白质浓度的缺点之一就是标准曲线不是严格的直线形式。

福林 - 酚法	优点	操作简便、灵敏度高
	缺点	蛋白质的特异性影响，即不同蛋白质因络氨酸、色氨酸含量的不同而使显色强度稍有不同，标准曲线不是严格的直线形式。

标准曲线最后的 R<sup>2</sup> 值是 0.9846，相比于一般文献中的人 R<sup>2</sup> 值 (0.99 以上) 偏低。在严格按照实验方法操作的前提下 (如准确量取体积、试剂甲和酚试剂加入后均有立刻摇匀、按操作等待了足够长的时间等)，经分析，我们认为可能有以下几点原因：

(1)牛血清白蛋白样品量较少，因称量产生的误差 (不是严格的 0.25mg/ml 的蛋白标准液) 影响较大；可以适当增加样品量，如准确称取 25mg 牛血清蛋白，溶于 100ml 蒸馏水中，使最终浓度为 250 μg / ml。

(2)最大吸收峰波长不确定而导致的误差 (实验中使用的是 650nm 波长可见光)；

(3)由于 752 型分光光度计的不稳定而产生的误差。

4.3 乳清蛋白含量的测定

1. 在实验前查阅资料时，我们发现了三种提取乳清蛋白的方法：加热法、醇提法、碱提法。由于不清楚三种方法的效果如何，在实验中，我们设置了三组实验 (对照组

配制的步骤②)。根据现场结果,我们发现醇提法和碱提法效果较好,但考虑到碱提法改变了 pH,对后续的 folin-酚试剂可能产生影响,因此最终选择了醇提法。

2. 热提法中未出现明显的乳清蛋白沉淀,我们猜测可能是因为水浴锅初始温度太高或加热太快,未达到“缓缓加热”这个条件。

#### 4.4 结论

本次实验提取出了脱脂牛奶中的酪蛋白,以称量的方式测得了样品牛奶中酪蛋白的含量为 3.45g/100ml。进一步对乳清蛋白进行 Folin-酚法测量,从而测得样品牛奶的总蛋白质含量为 3.65g /100mL。与牛奶包装盒上信息(3.6g/100mL)在一定误差允许范围内相符合,因此,为牛奶蛋白质含量的测定提供了一种新思路,也验证了样品牛奶的蛋白质含量符合其描述。

#### 五、参考文献:

- 【1】莫重文主编,《蛋白质化学与工艺学》,化学工业出版社 2007 年 6 月 第 79-81 页  
(1)“蛋白质溶液的胶体性质”、(2)“蛋白质的沉淀作用”。(3)“几种蛋白的等电点”。
- 【2】百度百科词条“牛奶”。
- 【3】百度百科词条“脱脂牛奶”。
- 【4】汪少芸主编,《蛋白质纯化与分析技术》,中国轻工业出版社,第二节 具体提取策略
- 【5】张建忠、邴一心,《酪蛋白和酪蛋白制品的开发》,中国乳品工业, 1998,26(6): 31-32。
- 【6】邵锦震、易理清,《等电沉淀分离酪蛋白方法的探讨》,湖北师范学院学报(自然科学版) 2004 年第 24 卷,第一期,第 19-20 页。
- 【7】百度文库《乳清蛋白的好处》
- 【8】LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75.
- 【9】罗芳 Folin-酚试剂法蛋白质定量测定 黔南民族师范学院学报, 2005, 25(3):46-47
- 【10】Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J, 陈祥娥 福林酚试剂法测定蛋白质 食品与药品, 2011, 13(2):147-151
- 【11】姜玉梅, 杨歌德 Folin—酚试剂法测定蛋白质含量中两种试剂的配制 哈尔滨医科大学学报, 1998(2):156-156
- 【12】黄百芬, 张双凤, 铁晓威. 福林-酚试剂法测定冰茶栓中微量蛋白质含量[J]. 浙江预防医学, 2004, 16(4):77-78.
- 【13】杨典洱, 牛宇欣. 福林—酚试剂法测定波长的选择[J]. 铁路节能环保与安全卫生, 1996(2):147-148.