

高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定脱脂酸奶后酸化生物标志物*

薛香菊, 刘 宁

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨, 150030)

摘 要 使用高效离子交换色谱-脉冲安培法检测储存期间样品中残糖含量和游离氨基酸含量, 同时测储存期间的 pH 值和活菌计数, 并采用主成分分析法进行分析, 寻找脱脂酸奶后酸化的生物标志物。经过对所测的数据进行分析, 初步断定了样品在 4℃ 储存时发生后酸化的时间是第 13 天, 生物标志物可能是赖氨酸、甘氨酸、谷氨酸; 样品 20℃ 储存时发生后酸化的时间是第 9 天, 生物标志物可能是精氨酸、丙氨酸。

关键词 高效阴离子交换色谱, 脉冲安培检测法, 脱脂酸奶, 后酸化, 主成分分析, 生物标志物

目前国内外学者虽然对酸奶后酸化问题已从乳酸菌细胞和基因水平进行了研究, 并且对乳酸菌的乳糖代谢机理, 细胞对 H^+ 的调控, 酶的基因调控上进行了研究, 并取得了共识, 但国内对于控制酸奶后酸化的措施主要集中在对酸奶生产工艺的改善上, 或者添加一些可以抑制酸奶发酵剂活性的物质如 Nisin 等, 这些措施没有从根本上解决酸奶的后酸化, 而且添加某种物质只能使酸奶的生长工艺复杂化, 或者在某种程度上使酸奶中的活菌数下降, 因而无法达到消费者的食用要求。

代谢组学^[1~4]和生物标志物^[5]无疑为解决酸奶后酸化提供了另外一条途径。但牛乳本身的成分和乳酸菌本身的营养要求很复杂, 很难确定哪种物质可以作为后酸化的生物标志物。pH 值、活菌数是评价酸奶的 2 个基本指标, 残糖含量和游离氨基酸含量表示在酸奶介质中乳酸菌代谢碳水化合物的能力和对氮源的需求, 因此选择 pH 值、活菌数、残糖含量和游离氨基酸含量作为评价酸奶在 2 种常用的储存温度下发生后酸化的指标, 并使用 spss12.0 因子分析中的主成分分析^[6], 判断酸奶后酸化可能发生的时间和可能的指示后酸化的生物标志物。

1 实验部分

1.1 发酵剂和脱脂酸奶的制作

发酵剂的制作: 分别将保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌(均由东北农业大学乳品科学教育部重点实验室提供)复活, 并按 1.5 : 1 的比例配制成混合发酵剂。

脱脂酸奶的制作: 将脱脂奶粉(新西兰进口)按 12% 的质量浓度复原, 90~95℃ 灭菌 5 min, 加入 3% 的发酵剂, 40~45℃ 发酵, 4℃, 12 h 冷藏后熟, 然后分别于 4℃ 和 20℃ 储存, 做 3 个平行。

1.2 仪器和试剂

仪器: DIONEX ICS2500(GP50 带脱气功能分析泵, LC30 柱温箱, ED50 电化学检测器, AS50 自动进样器, Peaknet6.3 色谱工作站), Milli-Q 纯水机。

试剂: 50% 的 NaOH(戴安, 优级纯), 醋酸钠(Fisher, 优级纯)。

1.3 溶液的配制

1.3.1 流动相的配置

流动相 E_1 : 大于 18.0 MΩ·cm 的水。

流动相 E_2 : 0.250 mol/L NaOH 水溶液, 用水(大于 18.0 MΩ·cm)稀释 50% NaOH 配制。

流动相 E_3 : 1.0 mol/L 醋酸钠, 用 750 mL 水(大于 18.0 MΩ·cm)中溶解 82.04 g 醋酸钠, 完全溶解后用水(大于 18.0 MΩ·cm)定容至 1 L。

1.3.2 氨基酸标准溶液的配制

将氨基酸标准储备液用水(大于 18.0 MΩ·cm)稀释, 浓度梯度系列: 10、20、40、60、80 nmol/mL。

1.3.3 糖标准溶液的配制

依次配制浓度为 0.01、0.015、0.018、0.020 和 0.025 g/L 的乳糖标准溶液; 依次配制浓度为 0.001 6、0.004 0、0.006 0、0.008 0、0.010 0 和 0.012 0 g/L 的半乳糖标准溶液; 依次配制浓度为 0.000 1、0.000 3、0.000 6、0.000 9 和 0.001 2 g/L 的葡萄糖标准溶液。

1.4 样品的处理

准确称取 10.00 g 脱脂酸奶, 8 000 g 离心 30 min, 取上清液定容至 10 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤,

第一作者: 硕士研究生(刘宁教授为通讯作者)。

*“863”课题——优良微生物发酵剂的研制与开发(2002AA248041)

收稿日期 2006-11-39, 改回日期: 2007-02-05

色谱检测。

1.5 色谱分析条件

1.5.1 糖检测的色谱条件

色谱柱: Carb PA10 分离柱、保护柱(2 mm)和氨基酸捕获柱(2 mm);柱温: 30℃;淋洗液流速: 0.8 mL/min;进样体积: 20 μ L;检测器: ED50,工作电极: 金电极;参比电极: Ag/AgCl 参比电极。

1.5.2 氨基酸检测的色谱条件

色谱柱: AminoPac PA10 分离柱与保护柱(2mm);柱温: 30℃;淋洗液流速: 0.22 mL/min;进样体积: 20 μ L;检测器: ED50,工作电极: 金电极;参比电极: Ag/AgCl pH 参比电极。

1.6 其他指标测定

脱脂酸奶物理指标测定包括酸度的测定和活菌数的测定。使用梅特勒-托利多 DELTA320pH 计测定脱脂酸奶的 pH 值;活菌数测定采用梯度稀释划线法。

1.7 数据处理

采用 spss 12.0 主成分分析(principal components analysis, PCA),以确定不同理化分析结果在影响酸奶后酸化的相对重要性。根据脱脂酸奶理化指标的主成分分析中有贡献的主成分所占权重,结合各样品的因子得分,对每 1 个样品进行综合评分以判断酸奶后酸化发生的时间和后酸化的生物标志物。

2 结果与讨论

2.1 脱脂酸奶储存期间的 pH 值变化趋势

从图 1 可以看出,无论单一杆菌脱脂酸奶还是在不同温度下储存的混合菌脱脂酸奶酸度,都是随着储存时间不断下降的。单一杆菌脱脂酸奶从发酵初的 pH 4.66 和 53℃T,降到 pH 4.00 和 85℃T;单一球菌脱脂酸奶从发酵初的 pH 4.39 和 59℃T 下降到 pH 4.00 和 75℃T。从图 1(a)和(b)中可以看到,杆菌下降的幅度是有差异的,杆菌的要比球菌快一些,这也是由于杆菌比球菌更耐酸,可以继续代谢乳糖使乳介质酸化。

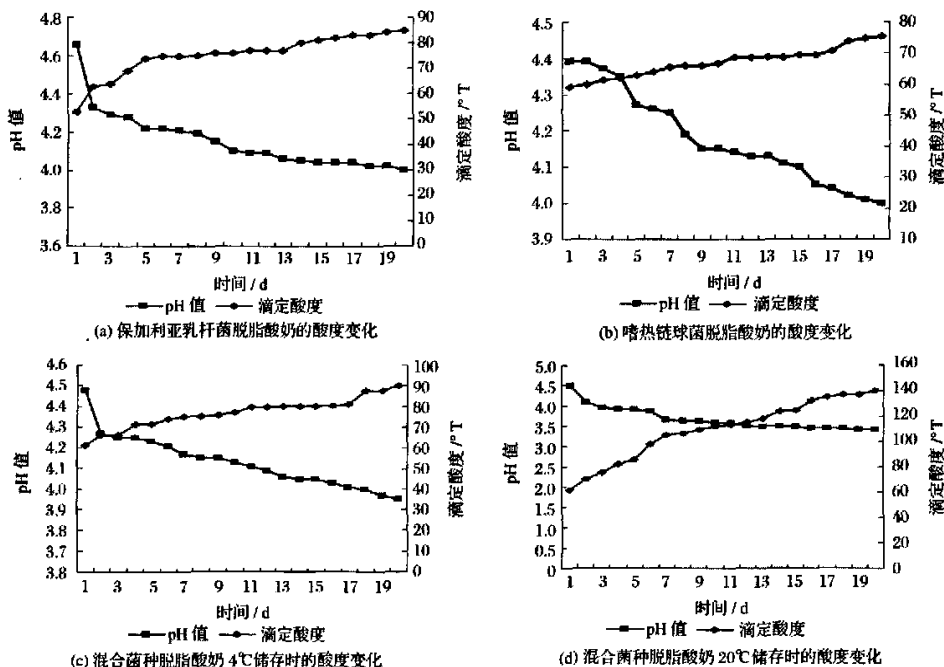


图 1 酸奶储存期间的酸度变化趋势

2.2 氨基酸和残糖色谱图

2.2.1 游离氨基酸色谱图

氨基酸标准色谱图与样品中游离氨基酸的色谱图如图 2 所示。可以看到,在实验的色谱条件下,16 种氨基酸依次分离出来。将测出的色谱图分别与标

准色谱图,通过保留时间进行定性;通过多点校正定量脱脂酸奶在储存期间游离氨基酸含量。

色谱柱: AminoPac PA10 分析柱(4×250mm);柱温: 30℃;流动相: A 超纯水(>18.0M Ω ·cm), B 250 mol/L NaOH, C 1.0 mol/L 醋酸钠,梯度洗脱;0

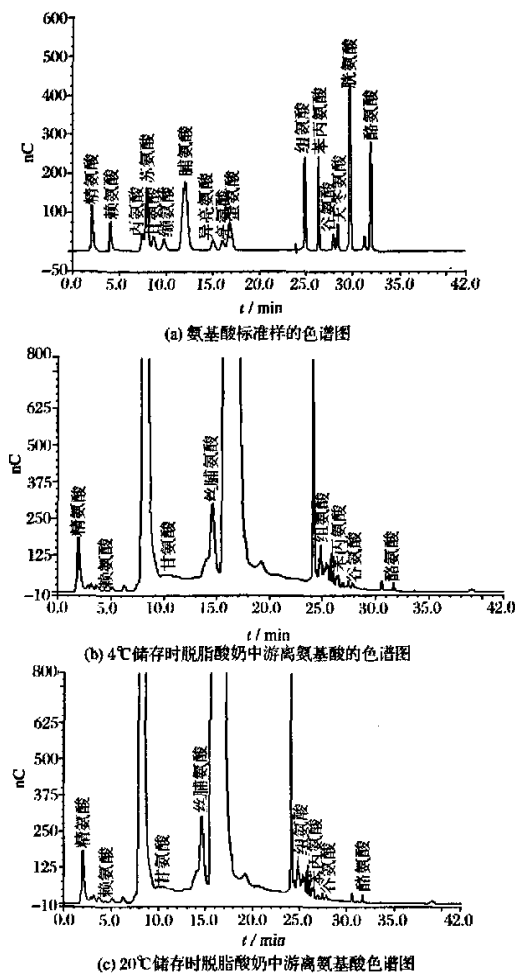


图2 氨基酸色谱图

~2 min 80% A, 20% B, 曲线 5; 2~8 min, 68% A 32% B, 曲线 5; 8~11 min, 66% A 34% B, 曲线 8; 11~18 min, 40% A 20% B 40% C, 曲线 8; 18~21 min, 44% A 16% B 40% C, 曲线 8; 21.0~23.0, 44% A 16% B 40% C, 曲线 8; 23~42 min, 14% A 16% B 70% C, 曲线 8; 42~44.1 min, 20% A 80% B, 曲线 5; 44.1~44.2 min, 76% A 24% B, 曲线 5; 44.2~75 min, 80% A 20% B, 曲线 5。

2.2.2 糖色谱图

样品葡萄糖、半乳糖和乳糖的色谱图与葡萄糖、半乳糖和乳糖标准色谱图如图3所示。将测出的色谱图分别与标准色谱图对比,通过保留时间进行定性;通过多点校正定量脱脂酸奶在储存期间游离氨基酸含量。其中图3中的b和c均是脱脂酸奶储存第7天的测出的色谱图。

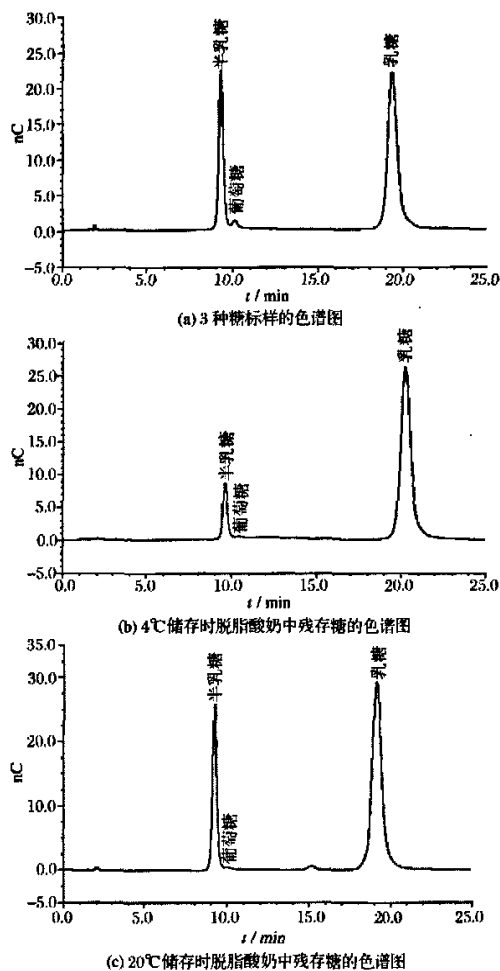


图3 糖的色谱图

2.3 相关系数、精密度和线性范围

使用离子色谱检测样品中残糖含量和氨基酸含量,进行精密度和重复实验,得出3种糖工作曲线的相关系数均在0.99,保留时间和峰面积标准偏差分别为2.509%和2.573%,回收率平均为87.83%;16种氨基酸工作曲线的相关系数均在0.99以上(组氨酸除外),保留时间标准偏差平均为0.541%,峰面积标准偏差3.528%,回收率在92.21%~98.24%。

2.4 4℃储存期间混合菌脱脂酸奶的主成分分析

根据主成分分析中有贡献主成分所占权数(见表1),结合样品在因子分析中的因子得分(表2),对样品进行综合评分,其评判式为:

$$Z_1 = 0.950x + 0.859y + 0.924t + 0.700m + 0.069n$$

$$Z_2 = -0.281x + 0.406y + 0.313t - 0.618m + 0.897n$$

x :脱脂酸奶储存期间的保加利亚乳杆菌活菌数; y :脱脂酸奶储存期间的嗜热链球菌活菌数; t :脱

脂酸奶储存期间酸奶的酸度; m :脱脂酸奶储存期间残糖含量; n :脱脂酸奶储存期间游离氨基酸含量。

表 1 4℃ 储存脱脂酸奶主成分特征值及其累计变异百分比

因子	特征值	贡献率/%	累计特征值	累计贡献率/%
1	2.991	59.818	2.991	59.818
2	1.529	30.578	4.520	90.396

色谱柱: CarboPac PA10 分析柱(4×250 mm);柱温:30℃;淋洗液: A 超纯水(>18.0MΩ·cm), B 250 mol/L NaOH; 淋洗条件: 0~25 min, 90% A10%B, 曲线 5。

将 2 因子 varimax 旋转后, Z_1 反映杆菌活菌数和 pH 值的信息, Z_2 反映残糖含量和游离氨基酸含量的信息, 即 Z_1 代表了酸奶的基本指标, Z_2 代表了乳酸菌的对碳氮源的需求。将此温度下储存的混合菌脱脂酸奶的相应指标标准化后带入 Z 的表达式, 结果(表 2) 显示在储存的前 13 天 Z_1 的值大, 其后 Z_2 的值大。也就是说在储存的前 13 天是 pH 值和杆菌活菌数对酸奶后酸化起关键作用, 其后是残糖含量和游离氨基酸的含量在对酸奶后酸化起关键作用。在储

存的前 13 天, 由于保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌之间的共生关系, 及其菌体自身对乳基质酸性环境的调节能力, 因而在这期间主要表现为菌体增殖和酸性的变化; 但在 13 天后由于乳基质的酸性增加, 菌体活力下降, 菌体自身的耐酸调解能力的下降, 因而其后的储存时间主要表现为对乳基质中氮碳源的代谢。因此第 13 天可能是 4℃ 储存是这 2 株杆菌共存时一些特征和代谢能力发生大转变的一天, 这一天可能是脱脂酸奶后酸化的关键时间点。而且这个时间与 4℃ 储存酸奶发生后酸化的时间基本是一致的, 这说明主成分分析得出的结果是正确的。测得储存第 13 天的 pH 值为 4.06; 糖含量虽没有大的变化, 但甘氨酸含量、谷氨酸含量、亮氨酸含量、天冬氨酸含量和酪氨酸含量相对于储存的前一天分别下降了或增加了: 615%、917.9%、1095%, 另外甘氨酸和亮氨酸在第 13 天后再也没有检测到。这说明赖氨酸、甘氨酸、谷氨酸、亮氨酸、天冬氨酸和酪氨酸可能是 4℃ 储存混合菌脱脂酸奶后酸化的生物标志物。

表 2 4℃ 储存混合菌脱脂酸奶样品的因子得分表

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Z_1	0.547	0.234	0.507	0.693	0.688	1.397	1.735	1.026	0.779	0.434
Z_2	2.371	1.976	1.418	0.792	0.630	-0.713	-1.282	-0.869	-0.897	-0.652
样品	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Z_1	0.141	0.235	-0.319	-0.607	-0.830	-1.006	-0.894	-1.499	-1.589	-1.674
Z_2	-0.299	-0.883	-0.525	-0.130	0.174	0.316	-0.364	0.050	-0.201	-0.913

2.5 20℃ 储存脱脂酸奶的主成分分析

根据主成分分析中有贡献主成分所占权数(见表 3), 结合样品在因子分析中的因子得分(表 4), 对样品进行综合评分, 其评判式为:

$$Z_1 = 0.921x + 0.889y + 0.886t + 0.690m - 0.134n$$

$$Z_2 = -0.315x - 0.312y - 0.350t + 0.569m + 0.712n$$

表 3 20℃ 储存脱脂酸奶主成分特征值及其累计变异百分比

因子	特征值	贡献率/%	累计特征值	累计贡献率/%
1	2.919	58.376	2.919	58.376
2	1.150	23.008	4.069	81.384

将 2 因子 varimax 旋转后, Z_1 反映 pH 值和残糖含量变化的信息; Z_2 反映来自杆菌活菌数和游离氨基酸含量变化的信息, 即 Z_2 代表了乳酸菌的对氮源的需求。将此温度下储存的混合菌脱脂酸奶的相应指标标准化后带入 Z 的表达式, 结果(表 4) 显示在储存的前 9 天 Z_1 的值大, 其后 Z_2 的值大。也就是说在

储存的前 9 天是 pH 值和残糖含量对酸奶后酸化起关键作用, 其后是杆菌活菌数和游离氨基酸的含量在对酸奶后酸化起关键作用。即在储存的前 9 天, 由于保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌之间的共生关系和储存温度的影响, 因而在这期间主要表现为菌体对乳基质碳源的代谢以及引起的乳基质酸性的降低; 但在第 9 天后由于乳基质的酸性增加, 菌体活力下降, 菌体自身的耐酸调解能力的下降, 因而其后的储存时间主要表现为活菌数和对乳基质中氮碳源的代谢。因此第 9 天可能是 20℃ 储存时这 2 株杆菌一些特征和代谢能力发生大转变的一天。第 9 天可能是 20℃ 储存混合菌脱脂酸奶后酸化的关键时间点。这个时间与 20℃ 储存的脱脂酸奶发生后酸化的时间基本是一致的, 这说明主成分分析得出的结果是正确的。测得混合菌脱脂酸奶 20℃ 储存第 9 天的 pH 值为 3.64; 没有检测到葡萄糖; 精氨酸含量、丙氨酸含量和

谷氨酸含量相对于储存的前1天分别下降了或增加了:100%、55.76%、100%。这有说明葡萄糖、精氨

酸、丙氨酸和谷氨酸可能是20℃储存的混合菌脱脂酸奶发生后酸化的生物标志物。

表4 20℃储存脱脂酸奶的主成分得分

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Z ₁	2.368	1.056	0.454	0.018	0.548	-0.490	-0.618	0.174	-0.899	-0.887	0.727	-0.997
Z ₂	-0.543	0.074	0.365	0.998	0.206	1.887	0.928	-0.960	0.275	-0.442	-1.283	-1.505

参 考 文 献

- 1 Sumner L W, Mendes P, Dixon R A. Plant Metabolomics; Large Scale Phytochemistry in the Functional Genomics Era[J]. Phytochemistry, 2003, 62: 817~836
- 2 Grivet JP, Delort AM, Portais JC. NMR and Microbiology, from Physiology to Metabolomics [J]. Biochimie, 2003, 85:823~840
- 3 Joseph J Dalluge, Sean Smith. Potential of Fermentation Profiling via Rapid Measurement of Amino Acid Metabo-

lism by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2004, 1043:3~7

- 4 王再花, 叶庆生, 欧孟昌. 代谢物组学的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2003, 14(6):517~521
- 5 邵 华. 生物标志物的研究进展[J]. 职业与健康, 2002, 18(9):7~9
- 6 王江山, 赵新捷, 郑宏伟, 等. 超相液相色谱/飞行时间质谱用于人参皂苷 Rg3 作用后大鼠尿液代谢植物图谱分析及标志物的鉴定[J]. 色谱, 2006, 24(1):5

Determination of Biomarker of Skim Yoghurt Postacidification by High Performance Anion Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Amperometric Detection

Xue Xiangju, Liu Ning

(Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural, Harbin 150030, China)

ABSTRACT In order to position biomarker of skim yogurt postacidification, high performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD) was used to analyze the content of remnant sugar and free amino acid during the storage in this research. At the same time, the pH value and lactobacillus of skim yogurt during storage had been measured. The principal components analysis (PCA) was analyzed. The data analysis showed that the postacidification time of yogurt stored at 4℃ was 13th and the biomarker, which could be lysine, glycine and glutamic acid; the postacidification time of yogurt stored at 20℃ temperature was 9th day and the biomarker was arginine and alanine.

Key words high performance anion exchange (HPAEC), pulsed amperometric detector (PAD), skim yogurt; postacidification, PCA, biomarker

政策法规标准

新修订的《计量基准管理办法》2007年7月10日开始实施

新修订的《计量基准管理办法》(以下简称新《办法》)已于2007年7月10日开始实施。新《办法》参考国际上对计量基准的定义,从计量基准的实际作用方面对计量基准的内涵做出了重新规定。

计量基准是我国量值的源头,也是我国量值与国际接轨的接口,在计量领域占有非常重要的地位。我国早在1987年制定发布了《计量基准管理办法》(以下简称原《办法》),原《办法》发布施行20年来,科学技术飞速发展,我国的计量基准体系已不能满足各方面的需求。

考虑到原《办法》中关于计量基准的定义与国际不接轨,同时也不能满足实际工作的需要,新《办法》没有继续沿用原《办法》的定义,而是参考国际上的定义,从计量基准的实际作用方面对计量基准的内涵做出了规定。

新《办法》加强了对计量基准保存单位的要求,对计量基准保存单位的法律保障、运行经费、技术保障、人员、环境条件、质量体系、参与和组织比对的能力以及进行量值传递的能力等方面做出了明确规定。