

SDS-凝膠電泳檢測羊乳中摻雜牛乳之研究

曹博宏¹林世斌²吳輔祐³

1. 國立宜蘭技術學院應用動物系副教授
2. 國立宜蘭技術學院食品科學系助理教授
3. 國立宜蘭技術學院應用動物系教授，通訊作者

摘要

本實驗探討用 SDS-凝膠電泳(SDS-PAGE)檢測羊乳中摻雜牛乳之簡易方法。生羊乳與牛乳經離心脫脂，調酸沉澱分離酪蛋白及乳清，使用 15%迷你凝膠電泳，凝膠以 coomassie brilliant blue 染色。結果羊乳有一最深色之 band 位於 31 kDa，其上另有一 band 位於 36.5 kDa。牛乳則為兩條相等深色之 30 與 35 kDa band。直接以脫脂生乳未經分離酪蛋白電泳，即可看出差別。以銀染色凝膠則羊乳 36.5 kDa 和牛乳 35 kDa 之 band 較不易呈色。電泳時樣品染液 bromophenol blue 跑出凝膠後，繼續以 20 mA 電泳 2hr，可增加各 band 之分離效果。脫脂羊乳添加 0.5、1、2、5、10、20%脫脂牛乳，依上法電泳，以 coomassie brilliant blue 染色，純羊乳在 31 和 36.5 kDa 之間只有兩條 band，如果添加牛乳則有 3 條 band，亦即多出牛乳之 35 kDa，可檢出 5% 牛乳。以銀染色法則緊臨於羊乳 31 kDa 的主要 band 下面多出牛乳的 30 kDa band，靈敏度可達 2%。牛乳特有之 30 與 35 kDa band 不受添加來源為生乳或還原乳的影響。台灣常見五種山羊品種所產之羊乳，亦不見此牛乳特有之 band。本法簡易，設備普遍，有實際應用的價值。

關鍵詞：羊乳、牛乳、凝膠電泳

Detection of Cow Milk in Goat Milk by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Po-Hung Tsao¹, Shih-Bin Lin² and Fu-Yu Wu³

1. Associate Professor, Department of Applied Animal Science, National Ilan Institute of Technology
2. Assistant Professor, Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology
3. Professor, Department of Applied Animal Science, National Ilan Institute of Technology, Corresponding Author

Abstract

This study was to establish a simple method for detection of cow milk adulterated in goat milk. Goat and cow milks were defatted by centrifugation, acid precipitated to separate casein and whey proteins, electrophorized with 15% mini SDS-PAGE, and stained with coomassie brilliant blue. Goat milk contained a major dark band at location near 31 kDa and a clear light band at 36.5 kDa. However, cow milk contained two evenly dark bands at 30 and 35 kDa. These differences could be clearly distinguished both on the gel of samples with or without milk protein separation. With silver staining, the 36.5 kDa band of goat milk and 35 kDa of cow milk were not stained as dark in proportion as other bands. The banding separation could be enhanced with two more hours of electrophoresis after the dye front eluted from the gel. Defatted goat milk added with 0.5, 1, 2, 5, 10, 20% of cow milk were electrophoresized and stained as above. Gel of goat milk showed only 2 bands between 31 kDa and 36.5 kDa, whereas goat milk added with cow milk showed 3 bands with extra band of 35 kDa from cow milk. The difference could be distinguished down to 5% cow milk adulteration. With silver staining, the cow milk's 30 kDa band appeared closely next to goat milk's 31 kDa, and 2% adulteration could be distinguished. The difference was not affected by the source of cow milk either from raw milk or reconstituted milk. All five breeds of dairy goat commonly raised in Taiwan did not have cow milk's 30 and 35 kDa bands. This method is ease and the equipment is commonly available, thus is practical.

Key Words : Goat Milk, Cow Milk, SDS-PAGE

一、前言

近年來，羊乳及其相關製品漸受消費者青睞，主要是大眾相信羊乳具有特殊的養生功能，如滋肺、健胃、利腸、養顏美容等。本草綱目【1】亦謂：「羊乳甘溫無毒，補寒冷虛乏、潤心肺、治消渴、療虛勞、益精氣、補肺腎氣和小腸氣」。由於羊乳具有高度之養生保健功效，因此消費者願意付較高之金額購買。隨之而起，羊乳中是否攙有牛乳亦逐漸受到重視。目前中央標準局所公告之標準檢測方法(CNS 14117, N6304)乃採用尿素電泳法【2, 3, 4】，解析度不佳，操作過程中需先分離酪蛋白，步驟繁瑣、耗時且檢驗成本較高，不適用於大量快速的檢驗。雖然，後來 Van Hekken and Thompson【5】利用鹼性尿素電泳法(alkaline urea-PAGE)，以 PhastSystem®跑預鑄之梯度凝膠進而提高解析度，但樣品需經透析除鹽及乳糖，再分離酪蛋白才跑電泳。本實驗室已製備牛乳特有蛋白之單株抗體，並發展為簡易靈敏的酵素免疫分析法【6】，然各實驗室受限於抗體的取得。SDS-PAGE 是目前大部分實驗室都有的設備，且許多廠商已售現成的凝膠，並有自動化電泳及染色設備。亦有持續電泳，待樣品跑出凝膠後以 OD280 偵測，如色層分析者。隨著蛋白質體的進展，甚且有自動化的二維電泳與影像判讀設備。因此如能以 SDS-PAGE 檢測羊乳中添加牛乳，將可增加普及性，並有潛力利用先進設備增加靈敏度與方便性。

二、材料與方法

(一) 樣品處理

取羊、牛生乳，以雙層紗布過濾，經 2,000 x g, 4 離心 15 min 以去除乳脂。去脂生乳以 4M HCl 調 pH，牛乳調至 4.6，羊乳調至 4.2 使酪蛋白沉澱，離心分離酪蛋白與乳清蛋白。

(二) 羊乳與牛乳之蛋白質凝膠電泳分析

脫脂羊、牛乳及分離之乳清與酪蛋白樣品添加含 β -mercaptoethanol 和 SDS 之樣品緩衝液，於 95 加熱 5 min，以 15% SDS-PAGE，以固定電流 20 mA 電泳分離【7】。凝膠片以 coomassie brilliant blue 或銀染色法染色 (Cat # 161-0449, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)，以觀察樣品各 band 之分佈。

確定羊、牛乳蛋白質 band 之差異後，直接以脫脂羊乳依不同比例添加 0.5, 1, 2, 5, 10, 20% 脫脂牛乳或還原脫脂牛乳，依上法電泳分離並染色。此外，台灣常見之山羊品種，如努比亞、薩能、阿爾賓、吐根堡與賴滿嬌等所產之羊乳，經離心脫脂後電泳，以確定不同品種之羊乳蛋白是否含有牛乳特有之蛋白。

三、結果與討論

(一) 羊、牛乳蛋白之電泳圖譜

脫脂羊、牛乳及其分離之酪蛋白與乳清蛋白之電泳膠，經 coomassie brilliant blue 染色後顯示於圖 1A。羊乳有一最深色之 band 位於 31 kDa，其上另有一 band 位於 36.5 kDa。牛乳則為兩條深色之 band，略低於羊乳，分別為 30 與 35 kDa。羊乳於其附近尚有若干微弱之 band，牛乳則僅於 30 kDa 下有一弱 band。此種 band 分佈與酪蛋白液者完全相同，故應屬酪蛋白。另外，羊、牛乳於 14.2 和 18.3 kDa 處各有一 band，此則與乳清分液者相同，推測為乳清之乳白蛋白與 乳球蛋白兩大主要成分。以銀染色(圖 1B)，羊乳 36.5 kDa 和牛乳 35 kDa 之 band 明顯較不易呈色。

Dominic et al. (1996) 報告【8】指出，羊乳 s_{11} 與 酪蛋白比介於 0.11-0.50 而牛乳者則為 1.27，因此羊乳主要酪蛋白為 s_{11} 型 而牛乳之 s_{11} 比例則相近。

s_{21} 、 s_{11} 、 s_{12} 和 酪蛋白的實際分子量分別為 25.2、23.6、24.5 和 18 kDa，然而實際於 SDS 電泳的位置則顯示於 39、35、30 和 25 kDa 處【9】。酪蛋白的生理功能主要為結合鈣磷，提供新生動物骨骼生長所需，其在細胞內被合成時會與鈣磷小粒 (nanocluster) 聚合【10】。酪蛋白含 1 個磷酸中心， s_{11} 酪蛋白則有 2 個以上，每個磷酸中心多含有 4 個磷酸化胺基酸，也正由於酪蛋白含有許多磷酸化之特性及擁有較多之疏水性胺基酸，由於酪蛋白和 SDS 結合力異於一般蛋白質，因此其在 SDS 凝膠的泳動速率與標準分子量不同，會有所延遲。再者雖然牛、羊乳之 s_{11} 酪蛋白均由 199 個胺基酸組成，然而其中有 24 處胺基酸結構不同【11, 12】，因此電泳時兩者可能速率不同。綜合以上，推測圖 1 羊乳之 31 與 36.5 kDa，以及牛乳之 30 與 35 kDa band，應分別為 s_{11} 和 s_{12} 酪蛋白。而 s_{11} 酪蛋白下面淡淡的 band 則應為 s_{12} 酪蛋白。至於乳清之兩大主要成分 乳球蛋白與 乳白蛋白，其分子量分別為 18.3 與 14.2 kDa，因不含磷酸化中心及較少疏水性胺基酸，不受 SDS 結合力量的影響，於 SDS 凝膠電泳之移動速率則與標準分子量相同。

Kaminarides et al. (1993) 報告【13】指出，以陰離子交換管柱 (P.L.-SAX 8 μ 1000A) 之高效率液相層析法(HPLC)分析羊、牛乳蛋白質之差異，亦發現其中兩者之酪蛋白層析圖譜有明顯不同，特別是牛乳 s_{11} 酪蛋白 elute 時間較羊乳

者慢，適合做為羊、牛乳區別之指標。然而，使用 HPLC 鑑定者，其儀器設備較昂貴，未若凝膠電泳之普及。由圖 1 亦可發現，不需分離取得酪蛋白，直接以脫脂生乳電泳即可看出兩者差別，免除尿素電泳法中需先分離酪蛋白之步驟，可達簡化操作之目的。而以 coomassie brilliant blue 染色之凝膠，以 35 kDa 為指標，銀染色者以 30 kDa 為指標，當可明顯檢出牛乳之存在。

(二) 羊乳中添加牛乳或還原牛乳之電泳圖譜

脫脂羊乳依不同比例分別攪入 0.5, 1, 2, 5, 10, 20% 脫脂牛乳。為了增加蛋白質 band 在凝膠的分離效果，待前置染液跑出凝膠後，繼續以 20 mA 電泳 2hr。結果顯示以 coomassie brilliant blue 染色之凝膠(圖 2A)，純羊乳在 31 和 36.5 kDa 之間只有兩條 band，如果添加牛乳則有 3 條 band，亦即多出牛乳之 kDa。10% 的牛乳添加可輕易的看出，於圖 2A 可區別至 5%，而於原來凝膠則可區別至 2%。如果利用持續電泳樣品流出凝膠之設備 (i.e. Mini-prep cell, Cat # 170-2915, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，以 OD280 偵測流出之 peak，當可更靈敏的偵測出多出來的 peak。於銀染色者，仔細觀察羊乳緊臨 31.5 kDa 主要 band 下面，如多出一 band，當為牛乳之 30 kDa，可區別出 2% 的添加。添加還原脫脂牛乳者(圖 3)，雖然乳粉於加工過程因加熱濃縮乾燥，而致部分酪蛋白與乳糖形成梅納反應【9, 14】，使得牛乳之 30 與 35 kDa band 略呈擴散，但本法仍可檢測出 5% 之攪入量。此外，以台灣常見五種不同山羊品種所產之乳進行電泳分析，亦不見牛乳特有之 30 與 35 kDa band (圖 4)，顯示本方法可適用於這些品種羊乳攪入牛乳之檢測。

本實驗證實直接以羊乳樣品，離心脫脂後加樣品溶液加熱，進行 SDS-凝膠電泳，以 coomassie brilliant blue 或銀染色，可檢出 5% 以下的牛乳攪假。本法操作簡單，設備便宜而普遍，不受添加生牛乳或還原牛乳的影響，亦不受不同品種山羊之乳的影響。且對於實際生產業者而言，添加 5% 以下的牛乳，增加生產作業而所得利益有限，不具誘因。因此本法有實際推廣的價值。

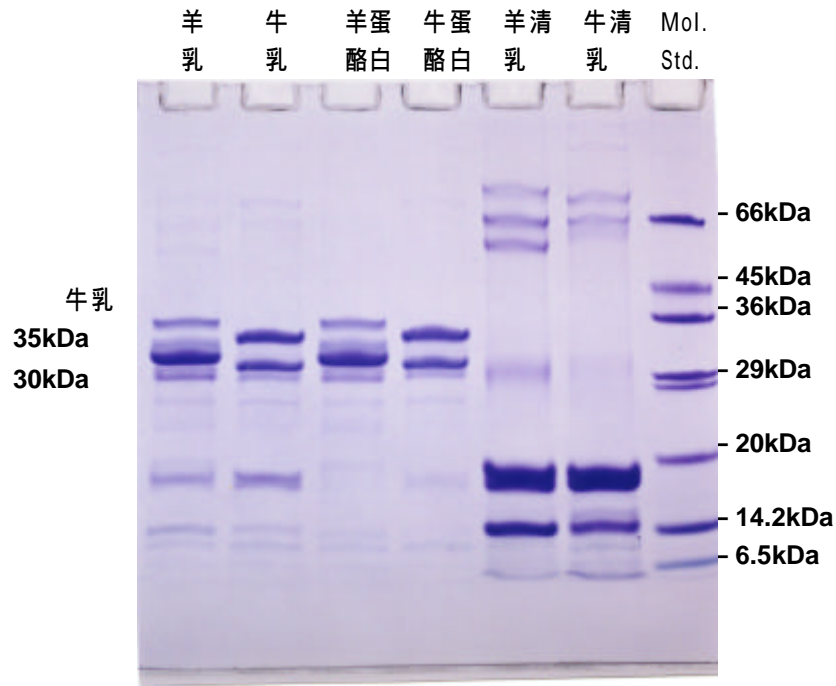
四、參考文獻

1. 李時珍。明朝。本草綱目。卷 50(獸部)：54。宏業書局。台北市。
2. Aschaffenburg, R. and J. E. Dance. (1968), "Detection of cow milk in goat milk by gel electrophoresis", *J. Dairy Res.*, Vol.35, pp.383-385.
3. Furtado, M.M. (1983), "Detection of cow milk in goat milk by polyacrylamide gel electrophoresis", *J. Dairy Sci.*, Vol.66, pp.1822-1824.
4. CNS 14117, N6304, (1998) 乳品檢驗法—羊乳中牛乳之檢出，中國國家標準，台北市，中華民國。
5. Van Hekken, D. L. and M. P. Thompson. (1992), "Application of PhastSystem to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrylamide gel electrophoresis", *J. Dairy Sci.*, Vol.75, pp.1204-1210.
6. 吳輔祐、曹博宏、林欣、蔡宜珏、郭智璋、游潮琨。(1999)。牛乳蛋白之單源抗体製備。中國畜牧學會會誌 第 28 卷 (suppl)：第 89 頁。
7. Laemmli, U. K. (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄", *Nature*, Vol.227, pp.680.
8. Dominic, W.S., M. Wayne and A. E. Pavlath. (1996), "Structures and functionalities of milk proteins", *Critical Reviews in Food Sci. Nutr.*, Vol.36, No.8, pp.807-844.
9. Basch, J.J., R.W. Douglas Jr, L.G. Procino, V.H. Holsinger and H.M. Farrell Jr. (1985), "Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure", *J. Dairy Sci.*, Vol.68, pp.23-31.
10. Holt, C. (1992), "Structure and stability of the bovine casein micelle. In advances in protein chemistry", Eds. C.B. Anfinsen, J.D. Edsall, F.K. Richards and D.S. Eisenberg, pp.63-151. Academic Press, New York.
11. Mercier, J.C., F. Grosclaude and B. Ribadeau-Dumas. (1971), "Primary structure of bovine s1 casein. Complete sequence", *European J Biochem.*, Vol.23, No.1, pp.41-51.
12. Brignon, G., M.F. Mahe, F. Grosclaude and B. Ribadeau-Dumas. (1989), "Sequence of caprine alpha s1-casein and characterization of those of its genetic variants which are synthesized at a high level, alpha s1-CnA, B and C. Protein Sequences & Data Analysis", Vol.2, No.3, pp.181-188.
13. Kaminarides, S. E. and E. M. Anifantakis. (1993), "Comparative study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using HPLC", *J. Dairy Res.*, Vol.60, pp.495-504.

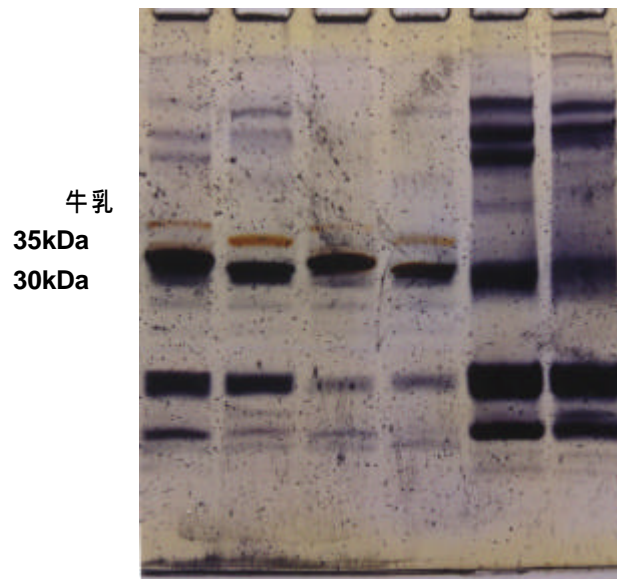
14. Dalgleish, D.G. (1990), "Denaturation and aggrigation of serum proteins and caseins in heated milk", J. Agri. Food Chem., Vol.38, No.11, pp.1995-1999.

91年09月02日投稿

91年09月24日接受



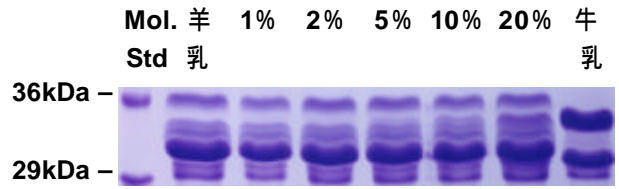
A. Coomassie brilliant blue staining



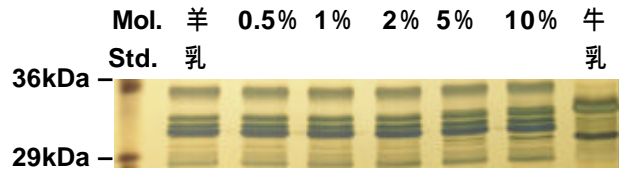
B. Silver staining (the samples same as above)

圖 1. 脫脂羊、牛乳及其酪蛋白與乳清蛋白分液之電泳凝膠圖。

Fig 1. SDS-PAGE profiles of skim milk, casein and whey fractions from goat and cow.



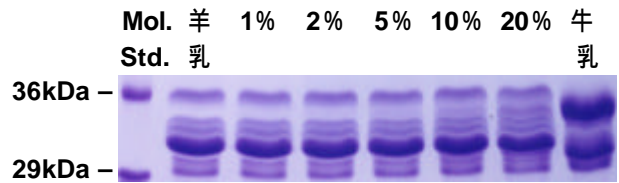
A. Coomassie brilliant blue staining



B. Silver staining

圖 2. 羊乳添加不同%生牛乳之電泳凝膠圖。

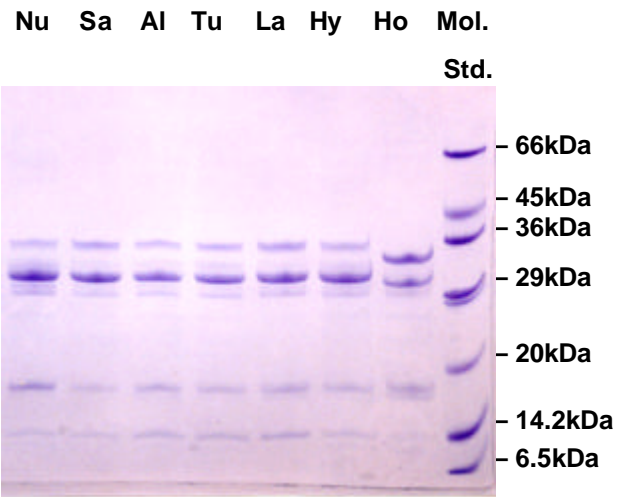
Fig 2. Electrophoresis gel of goat milk added with different percentage of raw cow milk.



Coomassie brilliant blue staining

圖 3. 羊乳添加不同%還原牛乳之電泳凝膠圖。

Fig 3. Electrophoresis gel of goat milk added with different percentage of reconstituted cow milk.



努比亞(Nu)、薩能(Sa)、阿爾賓(AI)、吐根堡(Tu)、賴滿嬌(La)、雜交山羊(Hy)、荷蘭牛(Ho)

圖 4.台灣常見山羊品種之羊乳蛋白質凝膠電泳比較。

Fig 4. SDS-PAGE profiles of raw milks from different breeds of goat and Holstein cow.

