开放科学（资源服务）
标识码（OSID）
扫一扫，了解文章更多内容

一种快速精准检测各种乳品中牛乳铁蛋白含量的广适性ELISA方法

张 婧[1]，朱孔迪[1]，刘传铭[1]，刘长振[2*]，王鹏杰[1*]，黄家强[1*]

1 中国农业大学营养与健康系，北京 100193
2 中国中医科学院医学实验中心，北京 100080

摘 要：[目的]验证夹心法ELISA技术是否可成为包括风味发酵乳在内的各种乳制品中牛乳铁蛋白含量的精准检测方法。[方法]利用优化的夹心法ELISA检测试剂分别检测牛乳铁蛋白（LTF）标准品溶液、巴氏杀菌乳样本、加标巴氏杀菌乳样本、12 种北京地区市场常见的风味发酵乳、7 种加标风味发酵乳、7 种混合巴氏杀菌乳的风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量，计算加标回收率及CV值。用该检测试剂检测3 种加标风味发酵乳中牛乳铁蛋白对72 ℃热处理的敏感度；并与牛乳铁蛋白国标检测（高效液相色谱法）方法对比检测生乳和巴氏灭菌乳。[结果]该检测试剂可检测牛乳铁蛋白（LTF）标准品溶液和巴氏杀菌乳样本中牛乳铁蛋白，且加标回收率91.7%～106.4%。经检测，12 种风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量为无；7 种加标风味发酵乳的加标回收率86.3%～109.1%，且检测CV值远低于12%；7 种风味发酵乳与巴氏杀菌乳混合乳中牛乳铁蛋白含量与对照组比值在92.3%～110.5%，且大多数检测CV值远低于12%；3 种加标风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量随72 ℃加热时间延长而降低，且下降曲线相似。与国家标准方法对比分析，夹心法ELISA方法检测生乳和巴氏杀菌乳乳铁蛋白含量的符合率分别为97.54%、111.2%，说明该检测方法的准确性达到国标标准。[结论]夹心法ELISA检测试剂可精准检测风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量。

关键词：牛乳铁蛋白；风味发酵乳；夹心法ELISA

文章编号：1671–4393（2025）03–0091–09 DOI:10.12377/1671–4393.25.03.15

0 引言

牛乳铁蛋白（Bovine lactoferrin，LTF）是一种属于转铁蛋白家族的多功能糖蛋白。它与人、山羊、小鼠、骆驼等物种的乳铁蛋白具有高度的同源性，并由于其来源便捷而作为人源乳铁蛋白的替代品添加于婴幼儿配方奶粉和膳食补充剂之中[1]。它已被广

基金项目：河北省创新能力提升计划项目（225A7102D）

作者简介：张 婧（2001–），女，江苏镇江人，本科，研究方向为检验分析；
朱孔迪（1999–），女，河南郑州人，本科，研究方向为食品科学；
刘传铭（2000–），男，山东济南人，本科，研究方向为生物技术。
*通信作者：刘长振，博士，研究员，博士生导师，研究方向为免疫学；
王鹏杰，博士，副教授，博士生导师，研究方向为乳品科学；
黄家强，博士，副教授，博士生导师，研究方向为营养学。

中国乳业线上阅读

泛知晓的两个特性是铁结合能力和抗菌作用。作为一种非血红素铁结合蛋白，具有高铁离子亲和力[2]，在体内通过结合与释放其螯合的铁离子来促进细胞的铁摄取[3]，被认为可安全治疗贫血[4]。同时，它通过竞争结合铁离子而有效抑制以铁离子为必需营养成分的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌等致病菌生长。牛乳铁蛋白的抗菌作用还体现在其因富含正电荷而与富含负电荷的革兰氏阴性菌外膜形成高亲和力的直接结合，随后破坏外膜而导致细菌死亡[5]。此外，它还具有抗病毒、免疫调节、抗氧化及抗肿瘤等功效[6]。

作为乳清蛋白成分之一，牛乳铁蛋白在奶制品制备过程发生不同程度的损失，其中高温热处理是最主要致损因素。例如巴氏杀菌处理方式（72 ℃，15 s）导致40%～50%乳铁蛋白损失，而超高温瞬间灭菌处理方式（135 ℃，4 s）甚至导致乳铁蛋白全部变性失活[7]。鉴于不同处理方式导致乳制品乳铁蛋白含量差异巨大，中国于2024年2月首次发布“食品中乳铁蛋白的测定”的食品安全国家标准（GB 5009.299—2024），规定采用肝素亲和柱纯化-高效液相色谱分析的测定方式来规范测量巴氏杀菌乳、调制乳等食品中牛乳铁蛋白含量。然而，该标准明确表述不适用于风味发酵乳、豆基婴幼儿配方食品中牛乳铁蛋白的测定。酶联免疫吸附试验技术（ELISA）是一种传统但至今仍广泛应用的目标物含量定量检测技术。对于牛乳铁蛋白含量的检测，商业化的ELISA检测试剂主要分为夹心法和竞争法两种类型，其中夹心法类型试剂在特异性、灵敏度、精准性以及操作便捷性等多方面明显高于竞争法类型试剂。然而夹心法、竞争法等其他类型的ELISA检测方式都没有被纳入食品中牛乳铁蛋白含量检测的标准体系，原因可能是其检测精准性和稳定性等不理想[8]。针对此情况，有试剂公司推出优化的ELISA检测试剂。

鉴于风味发酵乳已成为市场广受欢迎的一大类乳制品，其所含乳铁蛋白含量逐渐成为关注点，相应精准测量方案亟需建立。在本研究中，采用已优化的商业夹心法ELISA检测试剂开展多种风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量检测。结果表明，该ELISA技术在检测中具有较好的加标回收率和CV值，可较精准测定风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量。本研究为风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量测定的系统性工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

牛乳铁蛋白ELISA夹心法检测试剂盒（货号：KJ-bLTF-DB01），北京科基隆兴生物技术有限公司；牛乳铁蛋白，日本Wako公司（125-04123）；风味发酵乳：三元益菌多黄桃果粒（20241029B6），三元益菌多草莓果粒（20241027B6），伊利大果粒芒果+黄桃味（20241027E），伊利大果粒黄桃+草莓味（20241027E），惠丰优牧蓝莓+燕麦（20241016B8），惠丰优牧百香果+燕麦（20241022A9），蒙牛冠益乳燕麦核桃味（4P 2024.11.02 Q03），蒙牛冠益乳燕麦草莓味（4P 2024.10.29 R01），蒙牛纯甄酸奶蓝莓味（4M20241009CL05），蒙牛纯甄红西柚风味酸奶（4M20241012CL06），以及巴氏杀菌乳：三元鲜牛奶（20241028B6）；金典鲜牛奶（20241024E）采购于北京大型超市。

1.2 牛乳铁蛋白标准品及巴氏杀菌乳样本的检测

按夹心法ELISA试剂盒说明将试剂盒内bLTF标准品储液配制成牛乳铁蛋白标准品；称取牛乳铁蛋白粉末，利用样本稀释液配制成2 mg/mL作为储液，再将其利用生理盐水分别配制成20 μg/mL和40 μg/mL工作液，随后将生理盐水及两种工作液利用试剂盒中的样本稀释液按说明稀释2 000 倍；将三元鲜牛奶和金典鲜牛奶利用样本稀释液稀释2 000 倍，同时将2 mg/ml蛋白储液加入三元鲜牛奶和金典鲜牛奶中分别制备成50 μg/mL和65 μg/mL加标巴氏乳样本，利用样本稀释液稀释2 000 倍。上述稀释

中国乳业线上阅读

后样本按说明统一加入后续试剂进行ELISA检测。ELISA平板利用Biotek Eon微孔板检测系统分别在450 nm和650 nm波长读数，计算OD450−OD650数值。利用标准品OD数值制作标准曲线，获取标准曲线公式，将各检测样本OD数值带入公式，获取相应浓度值，再乘以2 000 倍，获取稀释前样本中牛乳铁蛋白含量。加标回收率按加标样本蛋白浓度减去样本本身蛋白浓度再除以理论加标值计算。

1.3 风味发酵乳样本及加标样本的检测

将购买各种风味发酵乳利用试剂盒中的样本稀释液分别稀释40 倍、200 倍、1 000 倍，按前述操作进行ELISA检测。将2 mg/mL蛋白储液加入7 种风味发酵乳中，分别制备相应20 μg/mL和40 μg/mL加标样本，将这些加标样本及原样本利用样本稀释液分别稀释200 倍、1 000 倍，按前述操作进行ELISA检测。分别将未加标、加标20 μg/mL和40 μg/mL生理盐水设为对照样本。每个加标样本检测独立开展两次，获取“平均值±标准差”以及CV值。

1.4 风味发酵乳＋巴氏杀菌乳混合样本的检测

将7 种风味发酵乳分别与三元鲜牛奶按体积比1∶1、2∶1、4∶1混合，制备成相应风味发酵乳+巴氏杀菌乳混合样本，随后利用试剂盒中的样本稀释液分别稀释1 000 倍，按前述操作进行ELISA检测。生理盐水与三元鲜牛奶分别按相应体积比稀释设为对照样本。各检测样本数值除以相应对照样本数值，获得相应百分比值。每个检测独立开展两次获取“平均值±标准差”。

1.5 风味发酵乳加标样本 72 ℃敏感度检测

将2 mg/ml蛋白储液分别加入伊利大果粒黄桃+草莓味、蒙牛冠益乳燕麦草莓味、蒙牛纯甄红西柚风味酸奶3 种风味发酵乳中，制备成30 μg/mL加标样本。将每种加标样本按200 μL/管分为7 管，其中第1管置于4 ℃，另6 管置于72 ℃金属浴上并分别于第2、5、10、30、60、120 min取出置于4 ℃放存。利用试剂盒对各样本进行ELISA检测，检测获取OD数值除以第1管OD数值，计算残存蛋白含量的百分比。每个检测都独立开展2 次，获取“平均值±标准差”。

2 试验结果

2.1 各种风味发酵乳样本中牛乳铁蛋白含量的检测

首先测试牛乳铁蛋白夹心法ELISA试剂盒的精准度。按试剂盒说明，建立标准曲线，其R^2值（0.997 4）大于0.99，表明曲线拟合性很好。生理盐水、两种巴氏杀菌乳以及它们的加标样本同时被检测，结果如图1所示。生理盐水作为阴性样品其牛乳铁蛋白为无；两种生理盐水加标样本可被检测到牛乳铁蛋白浓度，经计算加标回收率分别为103.9%及106.4%，都符合理论上加标回收率80%～120%的区间范围；三元鲜牛奶及金典鲜牛奶作为巴氏杀菌乳也如预期一样可被检测到牛乳铁蛋白含量，经过与其加标样本的比较，两者的加标回收率分别为96.3%及91.7%，符合理论上加标回收率80%～120%的区间范围。这些结果表明，本试验采用的试剂盒可特异性和较精准检测到乳品样本中牛乳铁蛋白含量。

随后，利用试剂盒对12 种北京市场常见风味发酵乳进行牛乳铁蛋白含量检测，结果如表1所示。无论是说明书推荐用于低含量巴氏杀菌乳检测的1 000 倍样本稀释度，还是分别提升5 倍和25 倍浓度的200 倍样本稀释度和40 倍样本稀释度，其牛乳铁蛋白含量都为无。结果表明，被检测12 种风味发酵乳制品在加工运输储存等环节之后其所含牛乳铁蛋白可能都已损失。

2.2 风味发酵乳加标回收率的检测

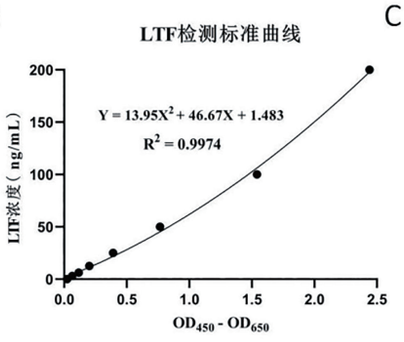
虽然在这些风味发酵乳中未能检测到牛乳铁蛋

中国乳业线上阅读

A

标曲检测（浓度/OD450-OD650）			样本检测(OD450-OD650/样本来源）		
0 ng/mL	0.025	0.022	0.449	0.407	三元巴氏乳
3.125 ng/mL	0.061	0.069	0.778	0.762	三元巴氏乳加标50μg/mL
6.25 ng/mL	0.115	0.116	0.533	0.508	金典巴氏乳
12.5 ng/mL	0.199	0.203	0.964	0.924	金典巴氏乳加标65μg/mL
25 ng/mL	0.394	0.388	0.019	0.016	生理盐水
50 ng/mL	0.788	0.743	0.329	0.324	生理盐水加标40μg/mL
100 ng/mL	1.573	1.509	0.177	0.166	生理盐水加标20μg/mL
200 ng/mL	2.492	2.391			

B



C

样本	LTF浓度（μg/mL）	加标值（μg/mL）	理论加标值（μg/mL）	加标回收率
三元巴氏乳	56.85	------	------	------
三元巴氏乳加标	104.98	48.13	50	96.3%
金典巴氏乳	69.87	------	------	------
金典巴氏乳加标	129.48	59.62	65	91.7%
生理盐水	0.00	------	------	------
生理盐水加标1	42.57	42.57	40	106.4%
生理盐水加标2	20.78	20.78	20	103.9%

图 1 利用牛乳铁蛋白夹心法 ELISA 试剂检测巴氏杀菌乳样本、生理盐水加标样本以及巴氏杀菌乳加标样本的牛乳铁蛋白含量

注：A：ELISA试剂标曲蛋白与各种样本的检测OD值；B：根据标曲蛋白OD值所作的标准曲线；C：为根据标准曲线测算的各种样本中牛乳铁蛋白含量以及计算获得加标回收率。每个检测都独立开展两次以获取“平均值±标准差”

表 1 夹心法 ELISA 试剂盒对 12 种北京地区市场常见风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量检测

项目	1 000 倍稀释		200 倍稀释		40 倍稀释	
	$OD_{450}-OD_{650}$	LTF 含量（μg/mL）	$OD_{450}-OD_{650}$	LTF 含量（μg/mL）	$OD_{450}-OD_{650}$	LTF 含量（μg/mL）
生理盐水（本组空白）	0.043	0	------	------	------	------
蒙牛冠益乳燕麦核桃味	0.031	0	0.031	0	0.032	0
蒙牛冠益乳燕麦草莓味	0.031	0	0.030	0	0.030	0
惠丰优牧蓝莓＋燕麦	0.031	0	0.027	0	0.026	0
三元益菌多草莓果粒	0.037	0	0.032	0	0.032	0
伊利大果粒黄桃＋草莓味	0.038	0	0.031	0	0.033	0
蒙牛纯甄酸奶蓝莓味	0.034	0	0.031	0	0.028	0
伊利大果粒黄桃＋草莓味	0.043	0	0.037	0	0.032	0
伊利大果粒芒果＋黄桃味	0.035	0	0.040	0	0.030	0
惠丰优牧百香果＋燕麦	0.033	0	0.030	0	0.028	0
蒙牛纯甄红西柚风味酸奶	0.035	0	0.031	0	0.029	0
三元益菌多黄桃果粒	0.032	0	0.032	0	0.034	0
三元益菌多草莓果粒	0.035	0	0.032	0	0.030	0

白，但建立相关精准检测方法对未来风味发酵乳产品生产质控，以及高乳铁蛋白含量产品开发与鉴定有价值。分别利用风味发酵乳加入标准蛋白和与巴氏杀菌乳混合方式模拟含牛乳铁蛋白的风味发酵乳样本。首先选取7 种风味发酵乳，分别制备加标20 μg/mL和40 μg/mL样本，利用开展1 000 倍样本稀

释度和200 倍样本稀释度的检测，结果如表2、表3所示。7 种风味发酵乳在两种样本稀释度以及两种加标量的情况下分别被获取相应牛乳铁蛋白含量。两次平行试验之后计算CV值，其最大CV值分别为5.02%（1 000×，加标20 μg/mL组）、4.06%（1 000×，加标40 μg/mL组）、10.68%（200×，加标20 μg/mL组）、5.17%（200×，加标40 μg/mL组）基本所有的CV值远低于通常ELISA检测标准的CV界值12%。同时，全部检测样本的加标回收率86.3%～109.1%，完全符合理论上加标回收率80%～120%的区间范围。

用风味发酵乳与巴氏杀菌乳混合方式模拟更天然状态下的牛乳铁蛋白含量检测，结果如表4所示。与生理盐水+巴氏杀菌乳的对照组相比，各组风味发酵乳+巴氏杀菌乳中牛乳铁蛋白含量都与其相近，百分比值都在92.3%～110.5%，仅有一组样本的CV值13.56%，其所有CV值远低于CV界值12%。3 种混合方式的结果相比，风味发酵乳与巴氏杀菌乳之间的比例对检测没有影响。

2.3 风味发酵乳中牛乳铁蛋白的 72 ℃热处理敏感性检测

为进一步探讨该检测方式对风味发酵乳生产过程中可能会起到的监测作用，利用3 种加标风

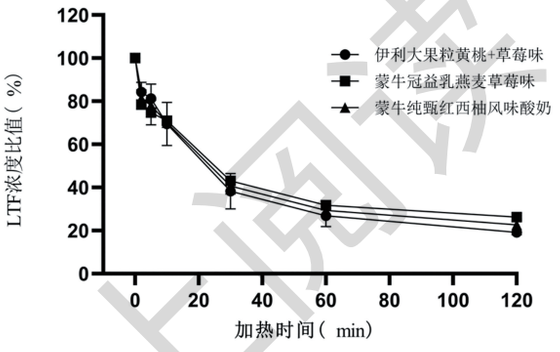


图 2 72 ℃热处理对 3 种加标风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量的影响

注：加标风味发酵乳分别置于72 ℃金属浴上0、2、5、10、30、60、120 分钟（min），利用ELISA试剂检测牛乳铁蛋白的残留值。每个检测都独立开展两次以获取“平均值±标准差”

表 2 利用夹心法 ELISA 试剂盒对 7 种加标风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量进行检测（样品稀释倍数为 1 000 倍）

项目	加标 20 μg/mL		加标 40 μg/mL	
	LTF 含量（μg/mL）	加标回收率（%）	LTF 含量（μg/mL）	加标回收率（%）
生理盐水（对照）	19.20 ± 0.05	96.0 ± 0.2	37.06 ± 0.60	92.7 ± 1.5
伊利大果粒黄桃 + 草莓味	18.77 ± 0.66	93.8 ± 3.3	36.77 ± 1.12	91.9 ± 2.8
伊利大果粒芒果 + 黄桃味	18.28 ± 0.10	91.4 ± 0.5	35.65 ± 0.93	89.1 ± 2.3
蒙牛冠益乳燕麦草莓味	17.23 ± 0.08	86.2 ± 0.4	35.02 ± 0.36	87.6 ± 0.9
蒙牛冠益乳燕麦核桃味	17.61 ± 0.30	88.1 ± 1.5	35.01 ± 0.61	87.5 ± 1.5
蒙牛纯甄红西柚风味酸奶	17.72 ± 0.34	88.6 ± 1.7	35.04 ± 0.51	87.6 ± 1.3
三元益菌多黄桃果粒	17.72 ± 0.89	88.6 ± 4.4	34.51 ± 1.40	86.3 ± 3.5
惠丰优牧百香果 + 燕麦	19.76 ± 0.11	98.8 ± 0.6	36.67 ± 0.10	91.7 ± 0.3

表 3 利用夹心法 ELISA 试剂盒对 7 种加标风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量进行检测（样品稀释倍数为 200 倍）

项目	加标 20 μg/mL		加标 40 μg/mL	
	LTF 含量（μg/mL）	加标回收率（%）	LTF 含量（μg/mL）	加标回收率（%）
生理盐水（对照）	21.07 ± 0.96	105.4 ± 4.8	40.09 ± 0.56	100.2 ± 1.4
伊利大果粒黄桃 + 草莓味	21.81 ± 0.85	109.1 ± 4.3	40.36 ± 1.06	100.9 ± 2.7
伊利大果粒芒果 + 黄桃味	19.24 ± 0.77	96.2 ± 3.8	37.24 ± 0.82	93.1 ± 2.0
蒙牛冠益乳燕麦草莓味	20.32 ± 2.17	101.6 ± 10.8	38.53 ± 0.43	96.3 ± 1.1
蒙牛冠益乳燕麦核桃味	20.46 ± 0.84	102.3 ± 4.2	39.11 ± 0.79	97.8 ± 2.0
蒙牛纯甄红西柚风味酸奶	20.52 ± 0.61	102.6 ± 3.0	39.30 ± 2.03	98.2 ± 5.1
三元益菌多黄桃果粒	20.86 ± 0.13	104.3 ± 0.7	39.20 ± 0.54	98.0 ± 1.4
惠丰优牧百香果 + 燕麦	20.69 ± 1.23	103.5 ± 6.1	40.56 ± 1.51	101.4 ± 3.8

中国乳业线上阅读

味发酵乳检测72 ℃热处理对其牛乳铁蛋白含量的影响，结果如图2所示。3 种加标风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量随72 ℃加热时间延长而降低，呈初期急速下降，后期降幅变缓；三组百分比下降曲线较相似，说明本研究选取3 种风味发酵乳不同成份对牛乳铁蛋白72 ℃热处理的敏感性影响不大。

2.4 ELISA 检测方法准确性验证

为进一步验证ELISA检测方法检测乳品中乳铁蛋白的准确性，选取生乳和巴氏杀菌乳比较测定。按的高效液相色谱检测方法，生乳和巴氏杀菌乳的乳铁蛋白含量分别为132.6 mg/L和66.9 mg/L （表5）。ELISA检测方法分别进行10 次重复检测，生乳乳铁蛋白含量120.6mg/mL～146.5 mg/L，平均含量为129.34 mg/L，符合率为97.54%；巴氏杀菌乳乳铁蛋白含量在68.4mg/mL～84.4 mg/L，平均含量74.38 mg/L，符合率111.2%（表5），ELISA检测方法的准确性达到国标标准。

3 讨论

《GB 5009.299—2024 食品安全国家标准食品中乳铁蛋白的测定》为乳制品行业提供统一的牛乳铁蛋白含量检测执行标准，消除因测定方法不规范导致误差与争议，对消费者权益保护，更多、更优质含乳铁蛋白乳制品出现与发展起重要促进作用。然而，该标准应用领域上却存有局限性，制订时提出不适用于风味发酵乳和豆基婴幼儿配方食品中牛乳铁蛋白含量检测，在正式实施几个月后，明确指出不适用于含有水解蛋白的婴幼儿配方食品（其中包括特殊医学用途婴儿配方食品）。这些不适用的乳制品品种，尤其是风味发酵乳，已在现有市场形成较大市场规模，因此内含牛乳铁蛋白含量监管缺乏对食品安全构成隐患，也对这些品种长远发展造成不利影响。因此，国家标准检测方法之外，可用于这些品种牛乳铁蛋白精准检测的测量方案亟需建立。

表 4 利用夹心法 ELIS 试剂盒对 7 种风味发酵乳与巴氏杀菌乳混合乳中牛乳铁蛋白含量进行检测

项目	风味发酵乳与巴氏杀菌乳 1:1 混合		风味发酵乳与巴氏杀菌乳 2:1 混合		风味发酵乳与巴氏杀菌乳 4:1 混合	
	LTF 含量（μg/mL）	与对照组相比的百分比值（%）	LTF 含量（μg/mL）	与对照组相比的百分比值（%）	LTF 含量（μg/mL）	与对照组相比的百分比值（%）
生理盐水（对照）	29.74 ± 0.33	100.0 ± 0	20.18 ± 0.24	100.0 ± 0	11.54 ± 0.36	100.0 ± 0
伊利大果粒黄桃 + 草莓味	31.50 ± 0.63	105.9 ± 0.9	20.37 ± 0.67	100.9 ± 4.5	11.84 ± 0.63	102.5 ± 2.3
伊利大果粒芒果 + 黄桃味	28.77 ± 0.44	96.7 ± 0.4	18.91 ± 1.69	93.7 ± 9.5	10.77 ± 0.55	93.3 ± 1.9
蒙牛冠益乳燕麦草莓味	30.17 ± 2.11	101.4 ± 6.0	20.50 ± 2.78	101.6 ± 15.0	11.43 ± 0.44	99.0 ± 0.7
蒙牛冠益乳燕麦核桃味	28.49 ± 1.78	95.8 ± 4.9	18.62 ± 0.82	92.3 ± 5.2	10.88 ± 0.48	94.3 ± 1.2
蒙牛纯甄红西柚风味酸奶	28.86 ± 1.71	97.1 ± 6.8	18.79 ± 1.73	93.1 ± 7.5	10.85 ± 0.25	94.1 ± 5.1
三元益菌多黄桃果粒	29.90 ± 1.28	100.5 ± 5.4	19.01 ± 0.54	94.2 ± 1.5	11.66 ± 1.00	101.2 ± 11.8
惠丰优牧百香果 + 燕麦	30.60 ± 1.98	102.9 ± 7.8	20.49 ± 0.06	101.5 ± 0.9	12.75 ± 0.38	110.5 ± 0.2

中国乳业杂志社版权

表 5 利用夹心法 ELISA 试剂盒和国标方法对生乳与巴氏杀菌乳中牛乳铁蛋白含量进行检测

国标方法检测结果	生乳中乳铁蛋白含量 132.6 mg/L		巴氏杀菌乳中乳铁蛋白含量 66.9 mg/L	
	生乳中乳铁蛋白含量（mg/L）	符合率（%）	巴氏杀菌乳中乳铁蛋白含量（mg/L）	符合率（%）
夹心法 ELISA 试剂盒检测结果	146.50	110.48	76.7	114.6
	136.80	103.17	68.4	102.2
	129.90	97.96	76.9	114.9
	124.20	93.67	74.7	111.7
	135.40	102.11	74.7	111.7
	127.60	96.23	84.4	126.2
	122.10	92.08	76.9	114.9
	123.70	93.29	71.1	106.3
	126.60	95.48	68.7	102.7
	120.60	90.95	71.3	106.6
平均值	129.34	97.54	74.38	111.2

本研究中，采用经典定量检测技术——夹心法ELISA技术开展风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量检测。商业ELISA检测试剂是常用的牛乳铁蛋白检测手段之一，然而研究以及其他用户的测试对其精准性的反馈不佳。其问题不仅在于市场上ELISA检测试剂良莠不齐，似乎还在于牛乳铁蛋白自身特殊性，即牛乳铁蛋白容易形成自体蛋白的多聚化形式[1, 9]以及与酪蛋白（Casein）、β-乳球蛋白（Beta-lactoglobulin）等乳清蛋白形成异源多聚体[10~13]。基于ELISA检测中抗原-抗体有效浓度及结合速率对检测结果构成影响的作用原理，牛奶中牛乳铁蛋白不恒定的聚合状态改变被检测物的实际有效浓度，同时牛乳铁蛋白与其他蛋白组成异源多聚体也形成基质效应而改变与抗体结合速率，因此常规状态下的ELISA检测可能无法获得较好精准性和稳定性。这些问题已引起试剂开发公司关注并针对其开展试剂改良。本研究所用ELISA检测试剂在其说明中提到通过调整样品稀释液等方式将各种多聚状态下的牛乳铁蛋白稳定释放，大幅提升检测精准度和稳定性。

首先检测该优化ELISA检测试剂的特异性和加标回收率。结果表明，该检测试剂可测量巴氏杀菌乳中的内源牛乳铁蛋白以及生理盐水以及巴氏杀菌乳中的加标牛乳铁蛋白，其回收率在91.7%～106.4%，优于理论上80%～120%的区间范围（图1）。这表明该ELISA检测试剂在巴氏杀菌乳介质牛乳铁蛋白含量检测方面具有较好性能。随后12 种北京地区市场常见风味发酵乳检测结果表明，这些乳制品中牛乳铁蛋白含量都为无（表1）。该现象可能与现有风味发酵乳制备工艺有关，即可能存在的超高温处理环节导致牛乳铁蛋白含量损失。为验证该检测可靠性，将牛乳铁蛋白标准品和巴氏杀菌乳加入其中7 种风味发酵乳中，进一步检测回收率和CV值（表2、表3）。检测结果显示这7 种风味发酵乳介质对加入牛乳铁蛋白标品及巴氏杀菌乳中内源牛乳铁蛋白的检测都没有影响，说明该检测方法在风味发酵乳中可正常检测牛乳铁蛋白含量。此外，3 种加标风味发酵乳在72 ℃热处理过程中牛乳铁蛋白含量变化的检测结果表明，该检测方法可用作风味发酵乳生产工艺对牛乳铁蛋白保留程度的评判工具（图2）。

以上研究说明，采用优化检测试剂的夹心法ELISA技术可较精准测定风味发酵乳中牛乳铁蛋白的含量。该方法有望被用作食品中牛乳品蛋白含量测定标准在风味发酵乳领域的补充[14]。所知，目前国内外尚无针对风味发酵乳中牛乳铁蛋白含量测定的系统性研究，本研究为今后相关工作开展以及检测标准制定可提供一定的研究基础和数据支持。

参考文献

[1] Dyrda-Terniuk T，Pomastowski P.The multifaceted roles of bovine lactoferrin：Molecular structure，isolation methods，analytical characteristics，and biological properties[J].Journal

中国乳业线上阅读

of Agricultural and Food Chemistry，2023，71（51）：20500–20531.

[2] Nhan C，Rix C J，May B K，et al.Temperature–induced structural changes of apo–lactoferrin and their functional implications：A molecular dynamics simulation study[J].Molecular Simulation，2019，45（7）：533–548.

[3] Barros C A，Sanches D，Marques de Carvalho C A，et al.Influence of iron binding in the structural stability and cellular internalization of bovine lactoferrin[J].Heliyon，2021，7（9）：e08087.

[4] Baker E N.Structure and Reactivity of Transferrins[A].In：Advances in Inorganic Chemistry[C].Edited by Sykes A G，vol. 41：Academic Press，1994.

[5] Gruden S，Poklar Ulrih N.Diverse mechanisms of antimicrobial activities of lactoferrins，lactoferricins，and other lactoferrin–derived peptides[J].International Journal of Molecular Sciences，2021，22（20）：11264.

[6] Superti F.Lactoferrin from bovine milk：A protective companion for life[J].Nutrients，2020，12（9）：2562.

[7] Williams A M，Zhou Y，Luo N，et al.Determination of native lactoferrin and other whey proteins at different pH conditions after UHT using reverse phase HPLC[J].International Dairy Journal，2023，141：9.

[8] 张君超，胡素丽.乳制品及其相关食品中乳铁蛋白常用检测方法[J].食品安全导刊，2020（19）：40–42.

[9] Mela I，Aumaitre E，Williamson A M，et al.Charge reversal by salt–induced aggregation in aqueous lactoferrin solutions[J].Colloids & Surfaces B Biointerfaces，2010，78（1）：53–60.

[10] Anema S G，de Kruif C G.Interaction of lactoferrin and lysozyme with casein micelles[J].Biomacromolecules，2011，12（11）：3970–3976.

[11] Shibuya N，Yoshikawa Y，Watanabe K，et al.Iron–dependent binding of bovine milk alpha–casein with holo–lactoferrin，but not holo–transferrin[J].Biometals，2012，25（5）：1083–1088.

[12] Yan Y，Kizilay E，Seeman D，et al.Heteroprotein complex coacervation：Bovine beta–lactoglobulin and lactoferrin[J].Langmuir，2013，29（50）：15614–15623.

[13] Kizilay E，Seeman D，Yan Y，et al.Structure of bovine beta–lactoglobulin–lactoferrin coacervates[J].Soft Matter，2014，10（37）：7262–7268.

[14] 邓波，江春铃，杨晓君，等.国内外牛羊乳标准比对与标准体系建设的建议[J].中国乳业，2024（11）：138–143.

A Versatile ELISA Method for the Rapid and Accurate Detection of Bovine Lactoferrin Content in Various Dairy Products

ZHANG Jing[1]，ZHU Kongdi[1]，LIU Chuanming[1]，LIU Changzhen[2*]，WANG Pengjie[1*]，HUANG Jiaqiang[1*]

[1]Department of Nutrition and Health，China Agricultural University，Beijing 100193

[2]Medical Experimental Center，China Academy of Chinese Medical Sciences，Beijing 100080

Abstract：[Objective]To verify whether the Sandwich ELISA technique can become an accurate detection method for the content of Bovin lactoferrin in various dairy products，including flavored fermented milk.[Method]Using optimized sandwich ELISA detection reagent to detect the content of Bovin lactoferrin in standard solutions，pasteurized milk samples，spiked pasteurized milk samples，12 common flavored fermented milks in the Beijing market，7 spiked flavored fermented milks，and 7 flavored fermented milks mixed with pasteurized milk，calculating the recovery rate and CV value. Using this detection reagent to test the sensitivity of milk lactoferrin to 72 ℃ heat treatment in 3 spiked flavored fermented milks；and comparing the detection of raw milk and pasteurized milk with the national standard detection method for milk lactoferrin.[Result]The detection reagent can detect milk lactoferrin in standard solutions and pasteurized milk samples，with a recovery rate 91.7%～106.4%.It was found

中国乳业线上阅读

that the content of milk lactoferrin in 12 flavored fermented milks was none; the recovery rate of 7 spiked flavored fermented milks was between 86.3%~109.1%, and the CV values were all far below 12%; the ratio of milk lactoferrin content in 7 flavored fermented milks mixed with pasteurized milk compared to the control group was between 92.3%~110.5%, and most CV values were far below 12%; the content of milk lactoferrin in 3 spiked flavored fermented milks decreased with the extension of heat time at 72 ℃, and the decline curves were similar. Through comparative analysis with the national standard method, the compliance rates of milk lactoferrin content detected by the ELISA method in raw milk and pasteurized milk were 97.54% and 111.2%, respectively, indicating that the accuracy of this detection method meets national standards.[Conclusion] The optimized sandwich ELISA detection reagent can accurately determine the content of milk lactoferrin in flavored fermented milk.

Keywords: bovine lactoferrin; flavored fermented milk; Sandwich ELISA

▲上接90页

[1]Mengniu Dairy (Qiqihar) Co., Ltd., Qiqihar Heilongjiang 161000
[2]Mengniu Dairy (Shangzhi) Co., Ltd., Harbin Heilongjiang 150600
[3]Mengniu Dairy (Shenyang) Co., Ltd., Shenyang Liaoning 100122

Abstract: [Objective]To investigate the influencing factors of *Bacillus contamination* in raw milk and analyze the reasons for the different forms of *Bacillus*.[Method]The species of *Bacillus* in raw milk were determined by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).[Result]In this study, 8 strains of *Brevibacillus* and 2 strains of *Paenibacillus* were isolated, among which there were 2 types of colony and morphology of *Brevibacillus invocatus*, and the long rod or filamentous form belonged to the special morphology of *Brevibacillus invocatus*.[Conclusion]The morphology of colonies changed regularly with the passage times and culture time, but there was no obvious pattern. The main factors of *Bacillus* contamination were related to the disinfection of cow bed, milkers'hands, wiping towels and equipments in the milk area. This study provided new morphological insights for the prevention and control of *Bacillus* and provided theoretical basis for related prevention and control.

Keywords: *Bacillus*; morphological change; raw milk; MALDI-TOF-MS

中国乳业线上阅读