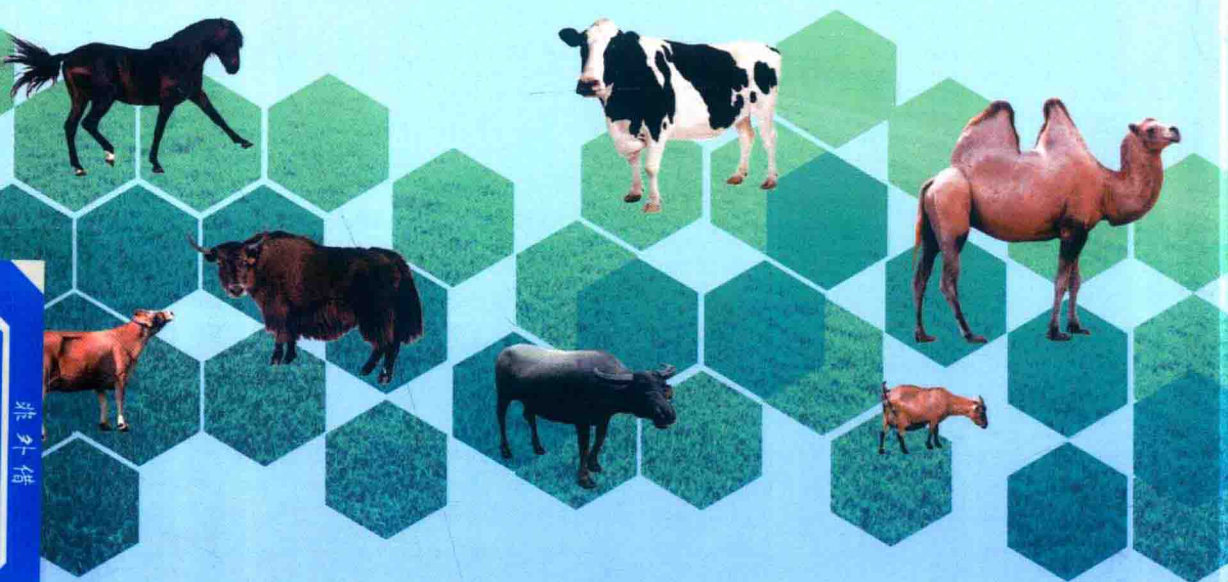


常见乳畜的 乳特征性成分研究

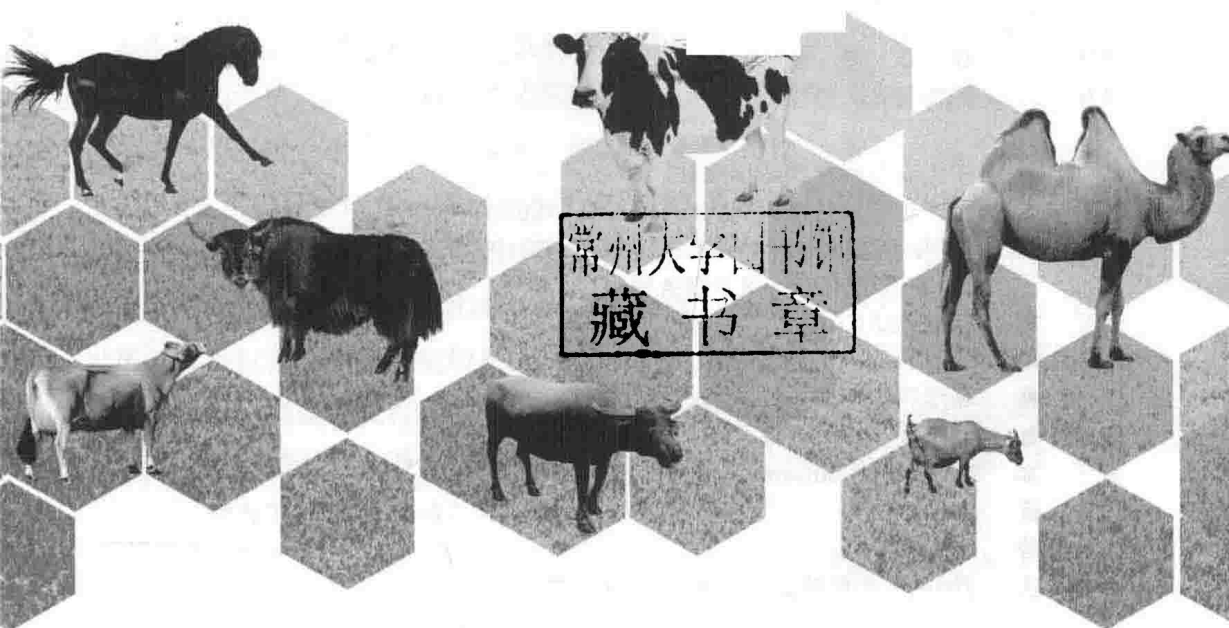
马露 著



中国农业科学技术出版社

常见乳畜的 乳特征性成分研究

马露 著



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

常见乳畜的乳特征性成分研究 / 马露著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2018. 6

ISBN 978-7-5116-3693-5

I. ①常… II. ①马… III. ①乳制品-研究 IV. ①TS252.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 092519 号

责任编辑 崔改泵 金 迪
责任校对 贾海霞

出 版 者 中国农业科学技术出版社
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081
电 话 (010) 82109194 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)
(010) 82109709 (读者服务部)
传 真 (010) 82106650
网 址 <http://www.castp.cn>
经 销 者 各地新华书店
印 刷 者 北京建宏印刷有限公司
开 本 710mm×1 000mm 1/16
印 张 8.5
字 数 136 千字
版 次 2018 年 6 月第 1 版 2018 年 6 月第 1 次印刷
定 价 60.00 元

— 版权所有 · 翻印必究 —

前言

乳营养丰富,是人类膳食结构中营养结构比较完善的一种食物,富含人类及新生儿所需的各种重要营养物质,包括氨基酸、维生素、矿物质等,参与人类大脑、免疫、神经和骨骼等系统的发育过程。乳蛋白富含必需氨基酸,具有较高的生物学价值,其中的乳清蛋白在一定程度上能够促进胰岛素的发挥作用,并可通过中短链脂肪酸发挥作用进而促进脂肪代谢。乳脂肪除可为机体提供能量外,还具有一些生理活性,乳脂中的中短链脂肪酸及不饱和脂肪酸均有益于人类健康,共轭亚油酸具有抗癌、抗炎、减少动脉粥样硬化和降低血脂的功效,除乳蛋白和乳脂肪外,乳中还富含大量的维生素和矿物质。然而,不同畜种乳的潜在的营养价值还没有被充分地发掘出来。

本书系统地介绍了常规乳畜的乳特征性成分,以奶牛乳、水牛乳、牦牛乳、娟姗牛乳、山羊乳、骆驼乳和马乳为研究对象,利用质谱技术结合蛋白质组学技术,构建了奶牛乳、水牛乳、牦牛乳、娟姗牛乳、山羊乳、骆驼乳和马乳中乳蛋白及 OBCFA 的特征性图谱,确定了不同物种之间乳蛋白及 OBCFA 的特征性成分及其含量差异,并首次通过转录组学方法分析获得了新鲜奶牛与新鲜山羊乳清中特征性 microRNA 及反复冻融乳清与新鲜乳清样 microRNA 的表达差异性,发现了种属特异性以及对奶样冻融敏感的 microRNAs。通过对不同畜种乳特征乳成分的分析,揭示不同畜种乳特征差异性,为进一步阐释不同畜种乳营养成分及潜在的生物学功能的差异性,及评定乳品质提供一定的理论依据和基础信息,并为进一步区分不同畜种乳提供理论依据。

全书共分为 8 章,内容主要包括不同动物乳成分及其特征的研究进展、基于 RP-HPLC 技术分析不同乳畜乳中主要乳蛋白组分、基于 GC-MS 技术分析不同乳畜乳中 OBCFA 及其组分含量、基于 ICP-MS 方法分析不同畜种乳中常量及微量元素含量、基于 Label-Free 定量蛋白质组学方法分析不同畜种乳 MFGM 蛋白



以及基于转录组学方法分析新鲜奶牛与新鲜山羊乳清中特征性 microRNA 及反复冻融奶牛乳清与新鲜奶牛乳清样 microRNA 的差异性。

本书涉及的相关课题研究是在中国农业科学院北京畜牧兽医研究所反刍动物营养研究室完成的，也受到了内蒙古农业大学动物科学学院的大力支持。本书由国家奶业“973 计划”项目课题（编号：2011CB100805）、“十二五”国家科技支撑计划课题（编号：2010BAD12B02）以及中国农业科学院科技创新工程项目资助（编号：ASTIP-IAS07）。

由于作者水平有限，书中疏漏或不妥之处在所难免，恳请同行和读者批评指正。

作者

2018 年 3 月

目 录

1 不同乳畜乳成分及其特征的研究进展	1
1.1 国内外的研究进展	1
1.1.1 动物的乳产量及分布	1
1.1.2 不同畜种乳成分	3
1.2 乳成分内在特征的研究	5
1.2.1 乳蛋白特征的研究	5
1.2.2 乳蛋白含量的研究	8
1.2.3 乳脂球膜蛋白的研究	9
1.2.4 乳脂肪的研究	10
1.2.5 乳中矿物质元素的研究	14
1.2.6 乳中 microRNA 的研究	14
2 研究内容、目的及意义	18
2.1 研究内容与技术路线	18
2.2 研究的目的及意义	19
3 基于 RP-HPLC 技术分析不同乳畜乳中主要乳蛋白组分	21
3.1 引言	21
3.2 试验材料与方法	22
3.2.1 样品采集	22
3.2.2 试剂与蛋白标准品	22
3.2.3 样品的前处理	22



3.2.4	仪器与色谱条件	23
3.2.5	标线的制定	23
3.2.6	数据分析	24
3.3	结果	24
3.3.1	酪蛋白与乳清蛋白的分离	24
3.3.2	乳中总蛋白含量	24
3.3.3	回收率测定	26
3.3.4	酪蛋白和乳清蛋白的量化	27
3.3.5	主成分 (principal component analysis, PCA) 分析	28
3.4	讨论	29
3.5	小结	33
4	基于 GC-MS 技术分析不同乳畜乳中 OBCFA 及其组分含量	34
4.1	引言	34
4.2	试验材料与方法	35
4.2.1	样品采集	35
4.2.2	脂肪酸标准品	35
4.2.3	试剂	35
4.2.4	样品的前处理	36
4.2.5	仪器设备	36
4.2.6	气相色谱条件	36
4.2.7	质谱条件	37
4.2.8	数据分析	37
4.3	结果	37
4.3.1	不同畜种乳中 OBCFA 的含量测定分析	37
4.3.2	不同畜种乳中 OBCFA 的 PCA 分析	41
4.3.3	不同畜种乳中 OBCFA 的 Cluster 分析	43



4.4 讨论	45
4.5 小结	47
5 基于 ICP-MS 方法分析不同畜种乳中常量及微量元素含量	48
5.1 引言	48
5.2 试验材料与方法	49
5.2.1 样品采集	49
5.2.2 试剂	49
5.2.3 标准曲线的制备	50
5.2.4 仪器设备	50
5.2.5 样品消解与测定条件	50
5.2.6 数据分析	52
5.3 结果	52
5.3.1 测定过程的质量控制	52
5.3.2 不同畜种乳中常量元素的测定	53
5.3.3 不同畜种乳中微量元素的测定	54
5.3.4 不同畜种乳中元素 (Na、Mg、K、Ca、Mn、Co、Zn、Fe 和 Se) 含量的 PCA 分析	55
5.4 讨论	57
5.5 小结	58
6 基于 Label-Free 定量蛋白质组学方法分析不同畜种乳 MFGM 蛋白	60
6.1 引言	60
6.2 试验材料与方法	61
6.2.1 样品采集	61
6.2.2 样品前处理	61
6.2.3 蛋白消解	62



6.2.4	液相色谱法和串联质谱法分析	62
6.2.5	蛋白质的鉴别和定量	63
6.2.6	数据分析	63
6.3	结果	63
6.3.1	鉴定蛋白质的分析	63
6.3.2	鉴定蛋白质的功能分析	64
6.3.3	鉴定蛋白质的统计分析	66
6.3.4	聚类分析	70
6.4	讨论	70
6.5	小结	73
7	基于转录组学方法分析新鲜奶牛与新鲜山羊乳清中特征性 microRNA 及 反复冻融奶牛乳清与新鲜奶牛乳清样 microRNA 的差异性	75
7.1	引言	75
7.2	试验材料与方法	76
7.2.1	样品采集	76
7.2.2	乳清的提取	77
7.2.3	乳清总 RNA 的提取	77
7.2.4	高通量测序分析仪	78
7.2.5	建库测序实验流程	78
7.2.6	生物信息分析流程	80
7.2.7	RT-PCR	80
7.2.8	数据分析	83
7.2.9	差异 miRNA 筛选	85
7.3	结果	85
7.3.1	鲜牛奶乳清与鲜羊奶乳清中 microRNA 的鉴定	85
7.3.2	鲜牛奶与冻融牛奶乳清中差异 microRNA 聚类分析	86



7.3.3 鲜羊奶与冻融羊奶乳清中差异 microRNA 聚类分析	88
7.3.4 鲜牛奶和羊奶差异 microRNA 的 RT-PCR 测定	88
7.4 讨论	94
7.5 小结	95
8 结论与展望	97
8.1 总体结论	97
8.2 创新点及展望	98
8.2.1 创新点	98
8.2.2 展望	98
缩略语表	99
参考文献	101

不同乳畜乳成分及其特征的研究进展

乳营养丰富,是人类膳食结构中营养结构比较完善的一种食物,富含人类及新生儿所需的各种重要营养物质,包括氨基酸、维生素、矿物质等,参与人类大脑、免疫、神经和骨骼等系统的发育过程^[1]。而草食性动物可以将自然界较为丰富但不易消化的纤维类物质消化发酵进而形成挥发酸、多肽、氨基酸和微生物等,然后经由乳腺合成分泌形成乳。乳蛋白富含必需氨基酸,具有较高的生物学价值。其中的乳清蛋白在一定程度上能够促进胰岛素发挥作用^[2],并可通过中短链脂肪酸发挥作用进而促进脂肪代谢^[3]。乳脂肪除可为机体提供能量外,还具有一些生理活性,研究指出,乳脂中的中短链脂肪酸及不饱和脂肪酸均有益于人类健康^[4];此外,也有研究报道,共轭亚油酸具有抗癌、抗炎、减少动脉粥样硬化和降低血脂的功效^[1,5]。除乳蛋白和乳脂肪外,乳中还富含大量的维生素和矿物质。

1.1 国内外的研究进展

1.1.1 动物的乳产量及分布

目前全球食谱复杂多样,食品安全、营养的平衡以及疾病的流行等不容乐观。在发展中国家,乳畜是小规模牲畜养殖户保证家庭食物安全的一个重要因素,且其乳制品份额占据很大的市场[联合国粮农组织(FAO),2008]。奶牛、山羊和绵羊的乳产量占据全球乳产量的87%(FAO,2008)。然而,在一些国家,小的泌乳动物在其营养供给及经济发展中起着重要的作用^[6]。但是,生物多样性以及未充分利用物种乳对营养健康的贡献一直被忽视,且不同畜种乳潜在的营养



价值还没有被充分地发掘出来。奶牛乳、水牛乳、山羊乳、绵羊乳和骆驼乳及其乳制品占据人类乳品消费的大部分，但从乳糖含量和乳蛋白结构的角度而言，驴乳的成分更接近于人乳^[6-7]。水牛乳产量占世界乳产量的第二位，约占世界乳产量的13%（FAO，2010）。而在中国的山区，蒙古、俄罗斯、尼泊尔、印度、不丹、塔吉克斯坦和乌兹别克斯坦等国，由于没有其他的牛科类可以饲养，故大部分的人类主要依靠牦牛来提供肉类和乳类^[8]。此外，麋鹿和驼鹿等的乳也是一些偏远山区居民的乳品来源，而有关其成分等的相关信息却甚少^[6]，且对其营养价值及对人类健康所起的作用也了解甚少。

FAO 公布（2008），截至 2011 年，全世界奶牛乳、山羊乳、绵羊乳、水牛乳和骆驼乳的产量分别是 6.1 亿吨、1 586 万吨、926 万吨、9 302 万吨和 226 万吨，其中奶牛乳、水牛乳和山羊乳产量分别占乳总产量的 84%、13% 和 2%，如图 1-1 所示。

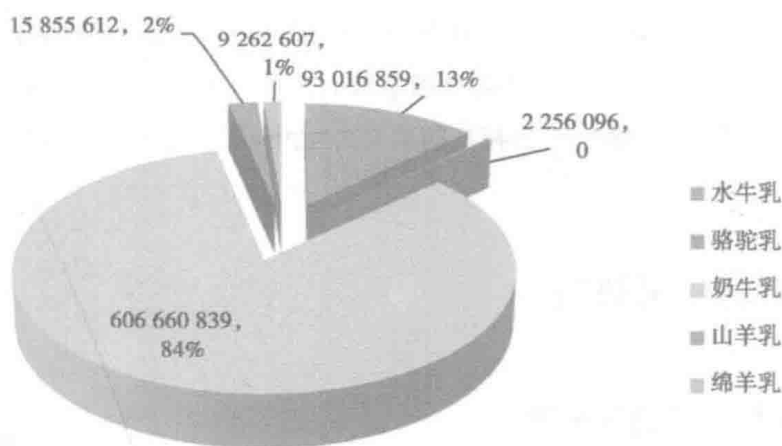


图 1-1 2011 年不同畜种乳产量（吨）及所占比例

Fig. 1-1 Milk yield and proportion of different species in 2011 (1 000 kg)



1.1.2 不同畜种乳成分

1.1.2.1 常规乳成分

不同畜种乳成分如表 1-1 所示, 不同畜种乳成分含量存在一定的差别。其中, 马乳和驴乳中的乳蛋白、乳脂肪含量和能量值都较低, 乳糖含量则较其他畜种乳高; 而牦牛乳和绵羊乳中乳蛋白和乳脂肪含量均较其他畜种高。

不同畜种乳中矿物质元素含量见表 1-2, 不同畜种乳矿物质元素含量差异显著, 由于乳中的矿物质元素参与机体的很多代谢过程, 尤其是钙 (Ca)、钠 (Na)、镁 (Mg)、钾 (K)、磷 (P)、碘 (I) 等元素。而乳中元素的含量同时影响着乳的生物学价值。Gaucheron (2005) 的研究指出, 乳中的 Ca 与酪蛋白结合后极易被消化吸收^[9], 而这与乳中酪蛋白的浓度有较强的相关性^[10]。水牛乳和山羊乳中的 Ca 元素含量较高, 而马乳中的 Ca 含量较少。

表 1-1 不同畜种乳成分

Table 1-1 Different species milk components

乳成分 Milk components	蛋白 Protein (g/100 g)	脂肪 Fat (g/100 g)	乳糖 Lactose (g/100 g)	能量 Energy (kJ/100 g)	灰分 Ash (g/100 g)
奶牛 Cow	3.2	3.3	5.1	317~373	0.7
水牛 Buffalo	4.0	7.4	4.4	345	0.8
牦牛 Yak	5.2	6.8	4.8	368	0.8
绵羊 Ewe	5.73	6.99	4.75	593	—
山羊 Goat	3.26	4.07	4.51	302	—
骆驼 Camel	3.26	3.80	4.30	328	0.8
马 Mare	2.0	1.6	6.6	184~205	0.4
驴 Donkey	1.6	0.7	6.4	208~245	0.4

注: 引自 Barłowska 等 (2011) 和 Medhammar 等 (2012)^[6,11]



表 1-2 不同畜种乳中矿物质含量

Table 1-2 Mineral contents in different species milk

	奶牛 Cow	水牛 Buffalo	牦牛 Yak	山羊 Goat	骆驼 Camel	母马 Mare
钙 Ca (mg/100 g)	113	191	129	132~134	114~116	95
磷 P (mg/100 g)	84	185	106	97.7~121	87.4	58
钠 Na (mg/100 g)	43	47	29	41~59.4	59	16
钾 K (mg/100 g)	132	112	95	152~181	144~156	51
镁 Mg (mg/100 g)	10	12	10	15.8~16	10.5~12.3	7
铁 Fe (μ g/100 g)	30	170	570	7~60	230~290	100
铜 Cu (μ g/100 g)	30	20	410	5~80	240	50
锌 Zn (μ g/100 g)	400	500	900	56~370	530~590	200

注：引自 Barlowska 等 (2011) 和 Medhammar 等 (2012)^[6,11]

乳中富含水溶性维生素和脂溶性维生素。Park (2007) 的研究指出, 山羊乳和绵羊乳中均含有丰富的维生素 A^[12]。此外, Barlowska 等 (2011) 报道指出, 山羊乳中维生素 A、泛酸、硫胺素、核黄素和烟酰胺含量丰富, 而维生素 B₁₂ 和叶酸的含量仅为奶牛乳的 1/6^[11], 而这两种维生素的缺乏易引起人类贫血症的发生^[12-13]。骆驼乳维生素 C 的含量很高, 是奶牛乳中维生素 C 含量的 30 倍, 是人乳中维生素 C 含量的 6 倍^[11]。

此外, 根据乳畜在系谱树上占据的位置, 可以将不同的乳畜进行归类, 如图 1-2 所示^[14]。马和驴属于奇蹄目; 牛科类动物、山羊和绵羊属于偶蹄目和反刍亚目, 而牦牛在系谱树上与奶牛同属于牛属; 骆驼虽具有反刍特性, 却属于胼足亚目, 而非反刍动物。Smiddy 等 (2012) 的研究表明, 许多乳成分的含量及分布也呈物种种属内相似性以及种属间差异性, 马乳和驴乳中的乳蛋白、乳脂肪和乳糖的含量相近, 而与其他畜种乳中的差异显著; 甘油三酯的组成上, 马乳和驴



乳中的甘油三酯相似性较高,而奶牛乳、绵羊乳、水牛乳、山羊乳中的甘油三酯组成相似^[14];Blasi等(2008)研究指出,水牛和奶牛乳脂中n-3脂肪酸的含量是n-6脂肪酸含量的9.5~10.0倍,山羊和绵羊乳脂中相对应的比例是3.2和3.4,而驴乳中相对应的比例仅为1.8^[15];相对于乳蛋白而言,采用二维凝胶测定的水牛和奶牛乳蛋白的图谱相似,但在骆驼乳蛋白中检测出许多 κ -酪蛋白(κ -CN)亚型,且没有检出 β -乳球蛋白(β -Lg),而马乳中未检出 κ -CN,山羊乳的酪蛋白则主要以 β -Lg为主^[16]。

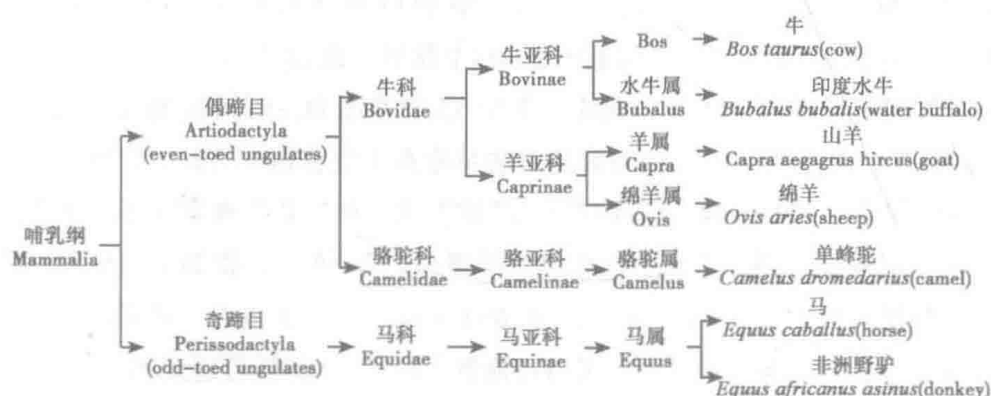


图 1-2 不同哺乳动物的系谱树 (Barłowska 等, 2011)

Fig. 1-2 Phylogenetic tree of the mammalian species (Barłowska et al, 2011)

1.2 乳成分内在特征的研究

1.2.1 乳蛋白特征的研究

乳蛋白作为牛奶重要的营养指标,其含量及组成直接影响牛奶的品质。乳蛋白主要包括酪蛋白和乳清蛋白,其中酪蛋白含量约为总蛋白的80%,主要以 α_{s1} -酪蛋白(α_{s1} -CN)、 α_{s2} -酪蛋白(α_{s2} -CN)、 β -酪蛋白(β -CN)和 κ -酪蛋白(κ -CN),而乳清蛋白则主要以 β -乳球蛋白(β -LG)、 α -乳白蛋白(α -LA)、免疫球蛋白和乳铁蛋白等蛋白为主。其中 α_{s1} -CN、 α_{s2} -CN、 β -CN、 κ -CN



存在于许多动物的乳中,并含有许多亚型^[17]。

二维凝胶电泳(2-DE)是目前串联质谱蛋白质组学常用的一种分析技术,分析研究乳蛋白表达情况较为直接。D'auria等(2005)通过2-DE研究证实其作为蛋白质学的一种检测技术可以有效地区别不同哺乳动物物种乳蛋白^[18]。Aslam等(1994)运用2-DE技术分析处于干乳期的奶牛乳蛋白表达模式得出,酪蛋白的含量在整个干乳期降低^[19]。Smolenski等(2009)通过对泌乳高峰期、泌乳初期及患有乳房炎的脱脂牛奶、乳清及乳脂球膜蛋白采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)、2-DE及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法进行测定(MALDI-TOF-MS),LC-MS共鉴定2903个肽类,通过2-DE鉴定出2770个蛋白点,95个不同的基因产物被确定,其中53个通过LC-MS/MS和57个通过2-DE确定^[20]。有研究通过免疫吸附的方法移除高丰度蛋白质(β -CN和免疫球蛋白)后,采用2-DE分离和微序列以及质谱方法对奶牛初乳和常乳中低丰度蛋白质进行鉴定得出,奶牛初乳中含有血纤维蛋白原 β -链、 α -抗胰蛋白酶和阿朴脂蛋白等特异蛋白质^[21]。由于 α_{s1} -CN和 β -CN属于高丰度蛋白,在采用2-DE分离乳蛋白时会有一部分低丰度的蛋白被掩盖,如 κ -CN,但可通过利用 α_{s1} -CN和 β -CN缺少半胱氨酸的特点,采用 κ -CN半胱氨酸的亲和富集的方法消除 α_{s1} -CN和 β -CN对其的影响,此外,经过MALDI-TOF-MS鉴定后,牛乳中含有16种 κ -CN形式,其中在等电点为4.47~5.81含有10种 κ -CN形式,且表现为A和B两种变异体,并通过串联质谱鉴定,得出其中含有 κ -CN磷酸化形式,含有磷酸基团为1~3个^[22]。Reinhardt和Lippolis(2008)对奶牛乳脂球膜(milk fat globule membrane, MFGM)蛋白运用SDS-PAGE分离,微毛细管高效液相色谱耦连串联质谱的方法鉴定,在鉴定的120个蛋白质中有71%是膜联蛋白,仅有15%的蛋白质是与鼠或人MFGM蛋白研究中鉴定的蛋白质相同。对鉴定的蛋白质进行归类发现:23%为膜-蛋白转运蛋白质,23%为细胞信号蛋白质,11%为脂肪转运-代谢蛋白质,9%为运输蛋白质,7%为蛋白质合成蛋白,4%为免疫蛋白和21%未知功能蛋白。这些与细胞信号或膜-蛋白转运相关的蛋白质可为分析MFGM的分泌机制提供基础;功能免疫蛋白质CD14、Toll样受体(toll like receptor, TLR)TLR2和TLR4可为监测乳腺组织的感染提供直接的证据^[23]。为了进



一步改善乳脂肪球膜蛋白的提取纯化,以获取更多的蛋白质表达信息,Vanderghem等(2008)采用包括CHAPS在内的四种方法溶解抽提脂肪球膜蛋白,质谱鉴定了2-DE凝胶中95个蛋白点,涉及脂肪分泌和传递、蛋白信号转导和调节等功能^[24]。采用标记蛋白质组学技术对初乳和常乳MFGM蛋白的研究发现,相对于初乳而言,常乳中有26个蛋白表达量增加,包括黏蛋白1、黏蛋白15和嗜乳脂蛋白等;19个蛋白的表达量降低,包括载脂蛋白A1、载脂蛋白E等^[23]。此后,Affolter等(2010)将MFGM分为乳清和乳酪蛋白两种组分,经液相色谱串联质谱分别鉴定了244个和133个蛋白,并将这些蛋白据其功能分为信号转导、蛋白水解、免疫和防御及脂肪代谢相关蛋白^[25]。

乳蛋白中酪蛋白的含量占80%,酪蛋白含量及组分也是检测乳蛋白特征的重要指标。由于色谱技术的发展,近几年的研究中许多学者采用该项技术进行乳蛋白含量及特征的分析。Bramanti等(2002)通过色谱分离技术,在UV检测器280 nm处酪蛋白含量(0.5~40 $\mu\text{mol/L}$)和峰面积线性相关, $\alpha\text{-CN}$ 、 $\beta\text{-CN}$ 和 $\kappa\text{-CN}$ 的检测限为0.33~0.65 $\mu\text{mol/L}$, $\alpha_{s1}\text{-CN}$ 、 $\alpha_{s2}\text{-CN}$ 、 $\beta\text{-CN}$ 和 $\kappa\text{-CN}$ 的RSD值为4.4%~6.2%^[26]。Bonizzi等(2009)通过反相高效液相色谱法从乳样中分离 $\alpha_{s1}\text{-CN}$ 、 $\alpha_{s2}\text{-CN}$ 、 $\beta\text{-CN}$ 和 $\kappa\text{-CN}$,并通过电喷雾离子质谱技术进行定量分析,结果显示,该项技术可以高效的分离奶牛乳蛋白并进行量化^[27]。此外,采用高效液相色谱技术测定其他物种乳蛋白的研究较多。Chen等(2004)采用高效液相色谱串联电喷雾离子质谱的方法测定了奶牛乳清和山羊乳清中蛋白的含量,得出两者乳清蛋白总离子流图谱存在一定的差异,并指出在牛乳中掺入山羊乳时,最低检出限为5%^[28]。Feligini等(2009)通过反相高效液相色谱串联质谱法测定水牛乳酪蛋白的试验得出, $\beta\text{-CN}$ 和 $\alpha_{s2}\text{-CN}$ 均存在一个峰值, $\alpha_{s1}\text{-CN}$ 和 $\kappa\text{-CN}$ 则存在多个峰值^[29]。通过微芯片电泳及反相高效液相色谱法(reversed phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)测定水牛乳中乳蛋白的结果显示,水牛乳中 $\beta\text{-CN}$ (18266Da)、 $\alpha\text{-CN}$ (14236Da)和血清白蛋白(66397Da)的含量分别是4.04 g/L、2.45 g/L和0.35 g/L^[30]。Bonfatti等(2008)的研究结果显示,通过反相高效液相色谱法可有效的分离和量化牛乳中主要的蛋白组分及其基因型,鉴定出 $\beta\text{-CNI}$ 、 $\alpha_{s1}\text{-CNB}$ 和 $\alpha_{s1}\text{-CNC}$ 等基因型的存