

食品中蛋白质检测技术研究进展

孙 蓉, 吴文标*

(西南大学食品科学学院, 重庆 400716)

摘 要: 精确地检测食品中的蛋白质含量对质量管理、科学研究等都是必不可少的。本文在综述食品中蛋白质含量检测方法的原理、特点及应用范围的基础上, 介绍最新的研究发展动态, 为研究者在蛋白质检测方法选择或进一步改进和发展方面提供依据, 以使各种方法得到更好的应用, 从而提高食品中蛋白质检测的准确性。

关键词: 食品; 蛋白质检测; 方法; 发展

Research Progress of Protein Detection Technology in Foods

SUN Rong, WU Wen-biao*

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Accurate determination of protein in foods is necessary for quality management and scientific research. The principle, characteristics and application of analytic methods for protein contents are reviewed in this article. Meanwhile, the future development trends are also discussed. These investigations will provide a theoretical reference for improving and developing suitable methods of protein detection in foods.

Key words: food; protein detection; methods; development

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)23-0393-06

蛋白质在生物体内是非常重要的, 参与几乎所有的生命活动, 它们不仅与新陈代谢、免疫和生物进化有很大关系, 而且还给人们提供很多信息^[1]。蛋白质含量常作为衡量食品中营养价值高低的一项重要指标, 因此蛋白质含量的检测在食品分析中尤为重要, 一直以来都是研究的热点, 特别是乳品行业。

至今为止, 全世界已有不少有关蛋白质检测方面的研究及综述论文报道。由于准确、快速、灵敏、低成本测定各种食品中蛋白质含量的问题尚未得到解决, 所以仍然不断有新的研究出现, 试图解决这些问题。

虽然目前已报道的检测蛋白质含量的方法有很多, 但大体可概括为两种: 一种普遍采用的方法是定氮后, 根据含氮量推算出蛋白质含量; 另一种就是根据蛋白质物理或化学性质, 采用相应的仪器设备进行检测, 并通过已知蛋白溶液建立标准曲线, 进而推算出蛋白质含量。虽然这些方法都在不断地改良, 但是, 仍然存在许多尚待解决研究的问题。例如, 凯氏定氮法已由手工操作发展为全自动, 但是由于食品中的蛋白质种类很多, 每种蛋白质的含氮量都是有变化的, 以及大多数食品都含有非蛋白质氮。因此, 采用凯氏定氮法检测蛋白质含量, 对于大多数食品而言, 仍然只能得到一个估测值。

本文的目的在于充分地总结蛋白质检测技术的最新发展动态, 为在选择方法的时候, 提供详实可靠的决策依据, 同时为今后研究和开发出更快速、准确、灵敏的蛋白质检测方法提供一定的理论依据。

1 定氮法及蛋白质含量的推算

1.1 凯氏定氮法

凯氏定氮法是国内外普遍采用的测定食品或其他生物材料中含氮量的经典方法, 分为样品消化、蒸馏和吸收、滴定3个步骤。其基本原理是: 试样与浓硫酸和催化剂一同消化破坏有机物, 使其中的蛋白质氮及其他有机氮转化为氨态氮, 然后与硫酸结合生成硫酸铵加入碱进行蒸馏使氨逸出, 用硼酸吸收后, 再以酸标准溶液滴定, 测出含氮量。

样品的消化过程看似简单, 但是自凯氏定氮法被发明至今128年以来, 虽然经过不断的努力加以改进, 仍然存在耗时过长和损耗较大的难题。Domini等^[2]采用微波和超声辅助消化测定凯氏氮, 经典凯氏定氮法、超声辅助和微波-超声辅助的消化方法的消化时间分别为30、25、7min。金属催化剂(例如Se)的使用可使消化时间缩短为

收稿日期: 2011-10-12

作者简介: 孙蓉(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: xihuasunrong@126.com

*通信作者: 吴文标(1962—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为人体营养学、食品资源学。E-mail: wbwu2006@sina.com

30min。金属盐类的使用可使消化时间缩短为2h。据所查资料,现在为止能达到的最短消化时间为7min^[2]。然而,某些辅助消化试剂的应用却带来毒性和造成环境污染的负面影响问题。例如,消化产生的SO₂会危害人体健康。另外一个问题就是增加成本,例如,需要消耗试剂量大且有些催化剂价格较昂贵。除了消化时间以外,还有许多研究报道试图减少消化过程中氮的损失。例如,汞作为催化剂会有干扰,它可与氮结合形成稳定的化合物,所以在加入硫酸之前要将其分解。采用密闭消化,可有效地减少易挥发元素的损失,同时也减少了消化时间。

氮的蒸馏过程中,传统的蒸馏装置操作不当容易发生倒吸,且碱的加入量会影响蒸馏,过多会浪费试剂,过少又会使蒸馏不完全,从而造成误差,所以在操作时需要注意。氮的滴定过程,传统的方法采用混合指示剂对颜色变化进行判断滴定终点,由于人对色彩辨别的差异,容易造成误差。而现在多采用酸度计或电位滴定法相结合进行测定,使滴定结果更准确。

由于经典凯氏定氮法操作繁琐、环境污染较大、蒸馏容易倒吸,自动定氮仪测定蛋白质则克服了以上不足,采用自动消化、蒸馏、滴定,操作简单,减少了环境污染,可大批量测定样品,提高了工作效率。目前自动定氮仪在牛乳、小麦、大米、大豆、食用菌、肉制品、调味料等中都得到广泛应用。但全自动定氮仪价格昂贵,增加了前期投入。

1.2 杜马斯定氮法

杜马斯法的基本原理是引起样品的完全裂解并测定燃烧气体中的氮含量。它包括在高温(900℃)室里氧气存在条件下燃烧已知量的样品,导致释放出二氧化碳、水和氮,这些气体通过特殊的柱子吸收掉二氧化碳和水,然后氮通过另一个柱子从残留的二氧化碳和水中分离,再用氮气作为载气的热导检测器测量^[3]。这种方法样品量小(一般在5~50mg范围内),测定速度很快(<5min完成一个样^[4],远快于全自动定氮仪),测定结果精确。其测定结果与凯氏定氮法的测定结果具有很好的相关性,但是前者的测定绝对值高于后者^[5]。这种方法使用较少的强烈反应物,需要较少的劳动力,且具有比凯氏定氮法更有效的温度释放出样品中的氮,可以代替凯氏定氮法作为对常规动物营养实验室氮分析方法^[6]。这种方法特别适用于粮食、豆类、乳粉、米粉、蛋白质粉等固体试样的测定,已作为国家标准中食品蛋白质的检测方法。

Saint-Denis等^[7]采用优化FP-2000设备,对杜马斯法进行优化,表明杜马斯法与凯氏定氮法一样精确,且十分快速(5min)。Hakoda等^[8]进行了实验室间的研究,以日本农业标准(JAS)评定燃烧法测定通心粉制品粗蛋白的重现性,用凯氏定氮法进行了同样的测定,两种方法在测试材料间的差异是0.10%~0.13%。然而,杜马斯法也存

在一些不足之处。例如,Beljkaš等^[4]认为杜马斯燃烧法在复合的谷物制品(谷物早餐和燕麦坚果棒)分析获得的相对标准偏差和同质性检验的结果与凯氏定氮法相比具有差异性。

在实际应用中,这种方法广泛用于有机化学中元素氮的测定,而在食品分析中的使用频率却低于凯氏定氮法。最可能原因是最初的设备投入费用比全自动凯氏定氮仪高几倍。

1.3 核技术

核技术有2种方法,中子活化分析和质子活化分析,具有简单、快速、自动分析及低运行成本的优点,并且没有污染和安全问题。但是这种技术的安装成本极高,所以只可能当涉及大量分析时它们是可行的,目前,这种方法在食品分析中较少使用。

中子活化分析包括14MeV中子束照射已称质量的样品,从而使N¹⁴转化成N¹³的换算。在样品里N¹³衰变湮灭产生0.51MeV γ 射线,并且这些通过闪烁晶体探测器计数,其计数与样品中氮的含量成正相关。虽然磷和硅对其有干扰(它们也能转换成中子放射核素),但是它们的半衰期仅有2.5min左右,所以在氮被计数前已衰变成微不足道的水平。除了用质子束进行照射外,质子活化分析与中子活化分析相似。

1.4 氮-蛋白质换算系数

食品中蛋白质含量估测的传统方法是通过换算系数乘以氮的含量。对于大多数食品,一般使用的换算系数为6.25,这是基于许多食品蛋白质约含16%的氮^[9]。但是每个食品中的蛋白质的氨基酸组成差异很大,含氮量差异也很大,因此需要不同的系数,尤其是在混合食品中^[5],如其余一些氮-蛋白质换算系数为:谷物和谷物制品5.70~5.83、干燥的粮食豆类5.46~5.71、坚果和种子5.18~5.46、乳和乳制品6.38。因此氮换算系数能否准确反映出食品中的蛋白质含量仍然是一个值得考虑的问题。因为切达奶酪的蛋白质成分与牛乳有显著差异,所以,Rouch等^[10]研究了乳制品标准氮换算系数6.38是否能准确反映切达奶酪的蛋白质含量的问题,结果显示平均氮换算系数计算得 6.394 ± 0.004 ,比标准乳品氮换算系数6.38略高。Salo-Viiinhen等^[11]研究发现不同食品中氮-蛋白质换算系数均比官方的系数小,总结出传统的粗蛋白值(N $\times$ 6.25)偏离真蛋白值,建议蛋白质的定义和测定方法应该在适当的国际组织进行重新评估,并适时地与现有的知识和分析能力保持一致以使其具有科学性。

此法得到的是总氮含量而不是蛋白氮的含量,因此还有一个问题就是定氮法需要区分非蛋白氮和总蛋白氮之间的不同^[12]。有机物质腐烂产生的氮转变为氨,导致氮的含量转变为蛋白质的含量^[13]。一些次生化合物如生物碱、叶绿素和某些苷类包含氮,各种其他非蛋白氮化

合物包括酰胺、游离氨基酸、非蛋白氨基酸、含氮的脂类和铵盐等也存在于植物组织中^[14]。因此如何去除非蛋白氮的干扰是一个准确测定蛋白质含量的难题。因此有科学家开展这方面的研究^[5,15]。除去非蛋白氮的步骤会增长操作时间,增加操作成本费用,因此,使得采用定氮法不太适合于测定大量样品中的真实蛋白含量。

2 其他化学测定法

除了定氮法外,还有各种化学方法可对蛋白质含量进行检测。其中光度法应用最多,适用范围较广,对该类方法的研究较多并在不断发展。这类方法的优点是检测速度快、设备投入低、操作费用低,所测出的是样品中的真实蛋白含量,非常适合于检测大量样品。但是,目前尚未找到一种能与蛋白质发生等当量反应的化学试剂。当前普遍采用的此类方法仍然是经验和间接型的,需要预实验确定实验步骤和操作条件,并且需要一种标准的直接方法(例如定氮法)加以校正。

2.1 分光光度法

2.1.1 双缩脲法(Biuret)

凡具有2个酰胺基或2个直接连接的肽键,或间隔1个碳原子相连的肽键结构的化合物都可以发生双缩脲反应。在碱性溶液中双缩脲与 Cu^{2+} 形成紫色配合物,在540nm波长处有最大吸收。在一定条件下,蛋白质含量与双缩脲反应所呈的颜色成正比,而与蛋白质的氨基酸组成和分子质量无关。如果反应混合物包含颗粒物质(如谷物),则需要先过滤或离心进行分离。

尽管这种方法广泛用于生物化学中蛋白质和蛋白质材料的分析,但除了谷物中蛋白质的评定外,很少应用在食品分析中。少量的还原剂和洗涤剂会干扰检测,因为反应混合物的碱性,可能会影响铜离子的反应。另一个缺点是只能检测水溶性蛋白质,不能对不溶性蛋白质进行检测。

2.1.2 Folin酚法(Lowry)

Lowry法是双缩脲法的发展,它结合了双缩脲试剂和酚试剂与蛋白质的反应。在碱性条件下,蛋白质中的肽键与铜结合生成复合物,该复合物通过芳香族氨基酸残基、酪氨酸和色氨酸残基把Folin酚试剂中的磷钼酸盐-磷钨酸盐还原,产生深蓝色(钼蓝和钨蓝的混合物),在750nm波长处有最大吸收。在一定的条件下,蓝色深度与蛋白质含量成正相关。

这种方法的灵敏度比双缩脲法高100倍,较紫外光光度法高10~20倍。但Lowry法精确度不高、反应速率低、耗费时间较长,某些试剂具有不稳定性,且标准曲线呈非线性^[16]。且这种方法比其他方法更易受干扰^[17],如酚类、氨基酸、清洁剂、还原剂、脂类、糖类、核酸等均

有干扰作用。为此,Lindeboom等^[18]测试了3种方法纠正酚类化合物干扰Lowry法的效果,其中采用铜的存在和缺乏在660nm波长处有不同吸收值的分析方法是纠正酚类干扰Lowry法的最佳方法。

2.1.3 染料结合法

染料结合法检测蛋白质含量重现性好、灵敏度高。除考马斯亮蓝法外,采用染料结合法检测食品中蛋白质的基本原理是:样品中的蛋白质与一种磺化的酸性染料溶液在低酸缓冲液中(通常为pH2)混合形成一种不溶性蛋白质染料络合物。至今为止,已有很多关于采用有机染料检测蛋白质含量的报道,所涉及的染料包括考马斯亮蓝G-250、酸性橙12、偶氮胭脂红G、变色酸2B、变色酸2C、偶氮氯膦I、偶氮胂III等。近年来,有关于金属-有机染料结合检测蛋白质方面的报道,如Fe(III)-茜素红S、Cu(II)-硝基磺酚C。Smith等^[19]介绍了染料结合法定量48种6~32年黑比诺葡萄酒中的蛋白质,这是一种简单、较快的分析方法。但是,应用于食品及原料中蛋白质检测较广的仍然为酸性橙12和考马斯亮蓝法。

2.1.3.1 考马斯亮蓝法(Bradford)

1976年Bradford建立了考马斯亮蓝法,根据蛋白质与染料相结合的原理设计,是定量检测微量蛋白质浓度的灵敏、快速的方法。考马斯亮蓝G-250染料,在酸性溶液中呈红色,吸收峰在波长465nm处。当染料与蛋白质结合后,主要是与蛋白质中的碱性氨基酸(特别是精氨酸)和芳香族氨基酸残基相结合,其最大吸收波长由465nm变为595nm,溶液的颜色也由红色变为蓝色,且在595nm波长处检测的吸光度与蛋白质含量成正比。

这种方法已得到广泛应用,在乳与乳制品、啤酒、果汁、蛋黄、粮食等检测中都有报道。考马斯亮蓝法快速、简便、干扰物质少、重现性好,染料与蛋白质的结合反应在2min左右即可完成且在1h内基本稳定。但这种方法只能检测水溶性蛋白质,无法检测不溶蛋白质。例如,Anjalie等^[20]发现考马斯亮蓝法能较容易地检测每个食品中的蛋白质含量,当检测再生乳粉中的蛋白质浓度时,结果与预期的一样,并且三聚氰胺和三聚氰酸对检测结果无干扰,但对猫粮来说要低10~30倍(因为蛋白的溶解度低)。多糖类(如果胶)对其有显著性干扰,研究发现在糖和蛋白质的混合液中糖类干扰远高于预期的单个糖分子,从真菌培养的肉汤中沉淀的蛋白质估计值比实际含量高2~4倍^[21]。且由于各种蛋白质的性质不同每单位量蛋白质的吸收也不同,因此用于不同蛋白质检测时颜色变化有较大的偏差^[22]。线性范围和结果的准确性比双缩脲法差。

2.1.3.2 酸性橙12染色法(C.I. Acid Orange 12)

由于酸性橙12在纯净的状态下适合作为分析试剂,这种染料是应用于食品中蛋白质含量检测的染料中研究

和应用得最多以及使用范围最广的一种。这种染料还有一个优势就是既能检测水溶性蛋白,又能检测不溶性蛋白。研究表明这种方法能精确地检测多种食品或原料,例如土豆、谷物、牛乳、豆类等中的蛋白质含量。Romo等^[23]用酸性橙12染色法检测了5种谷物种子的蛋白质含量,结果表明染色法检测值与凯氏定氮法的检测值有很高的相关性。Wu Wenbiao等^[24]采用酸性橙12染料检测土豆组织中的真实蛋白质含量,表明酸性橙12能够快速、低成本地检测土豆粉中的真蛋白含量。

至今为止,酸性橙12是开发出全自动检测设备的一种基础染料,主要运用于牛乳蛋白的检测,早期开发的自动化设备是Udy-Color Analyzer^[25],近期开发的设备是Rapid Protein Analyzer^[26]。这种自动化检测技术能否应用于其他多种食品中蛋白质的检测,尚无研究报道。

2.2 甲醛滴定法

这是蛋白质检测最古老的方法之一,通常需要添加过量的甲醛到样品中,蛋白质的氨基与中性甲醛作用,生成六次甲基四胺,同时释放出定量的酸,然后用碱标准溶液直接滴定。该法节省试剂、分析速度快、操作简便易行。但是,由于检测结果不稳定,很早以前就已被染料结合法代替^[27]。

3 其他物理测定法

大多数蛋白质的物理检测方法具有操作快速和简单的特点,并且与化学方法相比他们通常具有更少的技术要求。每个分析的费用也比较少,但是初始安装费用及仪器购买费用比较高。这些方法的准确度与化学方法是相似的。

3.1 毛细管电泳法

电泳是指在电场作用下带电粒子向着与其电荷相反的电极移动的现象。20世纪90年代以来,毛细管电泳因具有高解析能力、高灵敏度和选择性、易于量化及样品和溶剂消耗少的优点^[28]而被认为是最重要的分离分析手段之一,被广泛用于蛋白质的分析。结合了自动电泳的高分辨率和高效液相色谱的易操作特点的高效毛细管电泳具有高分辨率和快速分离蛋白质的优点^[29]。尽管毛细管电泳检测是非常灵敏的,但是检测的浓度限制却非常高,即进行毛细管光度检测时,需要注射量小(约1nL)及其有限的波长^[30]。Miralles等^[31]用毛细管电泳成功检测了由贮藏导致的不同程度水解的原料乳和超高温灭菌乳中乳清蛋白与总蛋白的比率,可考虑将其作为一种衍生光谱法检测牛乳中乳清蛋白与总蛋白的替代方法,还可以用来检测水解样品。操作繁琐及非蛋白类带电粒子的干扰仍属于这一方法难以克服的困难,并且无法检测不溶性蛋白。

3.2 共振瑞利散射法

光的散射是当一束光通过介质时,在入射光方向以外的方向观察到的一种光强现象,它是电磁辐射与物质间相互作用的一种表现形式。光散射粒子的尺度远小于入射光波长时,称为瑞利散射(Rayleigh scattering, RS)^[32]。当瑞利散射位于或接近于散射分子吸收带时,其散射强度不再遵守瑞利散射定律,而且某些波长的散射强度急剧提高,这种现象被称为共振瑞利散射(resonance Rayleigh scattering, RRS)或称共振光散射(resonance light scattering, RLS)^[33]。在静电作用为主的体系中,当在蛋白质的等电点前,阴离子染料与肽链上带正电荷的基团通过静电作用结合形成复合物聚集体,即染料在蛋白质上堆积形成较大的粒子引起光散射信号增强,并与加入蛋白质的浓度呈线性关系。一般要求染料具有带负电荷亲水基团(如羟基、羧基、磺基等),使其有较好水溶性,且便于与蛋白质进行静电结合。

近年来,共振光散射法因灵敏度高、简单、快速并且稳定性好,广泛用于溶液中蛋白质和核酸的检测^[34]。对不同蛋白质的检测范围为0.38~0.45ng/mL,能用于微量蛋白质的检测^[35]。这种方法对人血清、豆浆、尿液、牛乳、牛血清等中蛋白质的检测都有研究,特别是用于生物化学方面的人血清和牛血清蛋白研究较多^[36]。但共振光散射法的重现性对不稳定的染料染色系统是不满意的,而且改进的共振光散射技术对于完成自动分析也不容易,所以需要连接自动注射系统来克服这些缺点^[37]。张爱梅等^[38]研究了加入十二烷基磺酸钠及在pH3.05的介质中,曙红Y与蛋白质的结合反应,结果发现它们通过分子间作用力形成复合物,并在365nm波长处共振光散射信号加强,根据共振光散射的增强程度,可对蛋白质进行定量检测,牛血清白蛋白、 γ -球蛋白的线性范围分别为0.05~3.7、0.10~5.6mg/L,检测限分别为12、18 μ g/L。这种方法的缺点是不具备专一或特异性,任何一种在水溶剂中能形成乳浊液的胶体颗粒,视其尺寸大小不同都能反射、折射或散射光线,因此,会干扰这种方法的检测结果。

3.3 近红外光谱法

近红外光谱法作为一种质量控制工具广泛用于食品工业中。在目前的报道中,近红外光谱技术检测食品样品中蛋白质的应用相对普遍^[39]。近红外光谱技术是根据被检测样品中某一物质对近红外光谱的特征吸收而进行定量检测的一种手段^[40]。它具有测试快速、高效、适用范围广、测试重现性好、无试剂污染、样品一般无需预处理、分析成本较低,可实现无损检测。由于谐波和组合振动激发化程度低,近红外的吸收程度低,因此可以传输测量数毫米厚的样品^[41]。但测试灵敏度不高,被测组分含量一般应大于0.1%。由于化学分析物在近红外光

谱处有强烈的重叠峰,加上样品的其他物理现象,例如,散射光可引起干扰问题,因此近红外光谱法需要通过标准方法校正以进行定量检测^[42]。且含大量水分时有干扰,还需要复杂的仪器^[43]。这种方法在谷物、液态乳^[44]、小麦、棉仁、鱼制品^[45]等中都已应用研究报道。

Vaknin等^[46]研究了近红外反射光谱法估测麻风树种子中的含油量、脂肪酸组成和蛋白质含量的潜能,结果表明近红外光谱是一个可靠、准确和无损的技术,为筛选完整麻风树核提供了一个快速、简单和划算的替代方法。

4 结 语

食品中蛋白质含量的检测对于质量管理、科学研究等都是非常重要的。已广泛应用的、能直接测定食品的含氮量及推算蛋白质含量的经典凯氏法仍然是发展其他方法的参照方法;检测速度更快及操作成本更低的杜马斯法正在迅速地发展,阻碍其发展速度的决定因素仍然是最初的设备投入过大;虽然核技术也具有简单、快速、自动分析及低运行成本的优点,但是因为需要使用放射性元素,而阻碍了其广泛应用。由于定氮法检测蛋白质需要去掉非蛋白氮、针对不同的食品需使用不同的换算系数,所以发展至今,即使采用自动化设备,这种方法仍然操作复杂、耗时、且只能给出一个估测值。酸性橙12等染色法既能检测水溶性蛋白,又能检测不溶性蛋白,并且以此为染料已开发出自动化检测设备,在多种食品中都有成功应用;尽管目前已研究过的染料与蛋白质不能发生等当量反应,只要通过实验建立良好的操作步骤,其精确性会很高。而其他的一些化学方法基本都只能检测溶解性蛋白,应用范围相对较窄。近红外等物理检测法的干扰物质较多,其应用受到限制。对于食品蛋白质的检测方法仍然需要大量的研究,例如寻找能与蛋白质发生等当量反应的化学试剂。

参考文献:

- [1] WEI Qin, WU Dan, DU Bin, et al. A spectrophotometric method for determination of total proteins in cow milk powder samples using the *o*-nitrophenylfluorone/Mo(VI) complex[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(1): 76-82.
- [2] DOMINI C, VIDAL L, CRAVOTTO G, et al. A simultaneous, direct microwave/ultrasound-assisted digestion procedure for the determination of total Kjeldahl nitrogen[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, 16(4): 564-569.
- [3] JUNSOMBOON J, JAKMUNEE J. Flow injection conductometric system with gas diffusion separation for the determination of Kjeldahl nitrogen in milk and chicken meat[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 627(2): 232-238.
- [4] BELJKAŠ B, MATIĆ J, MILOVANOVIĆ I, et al. Rapid method for determination of protein content in cereals and oilseeds: validation, measurement uncertainty and comparison with the Kjeldahl method[J]. Accreditation and Quality Assurance, 2010, 15(10): 555-561.
- [5] WU Wenbiao. Recovery of proteins from potato juice[D]. Reading: University of Reading, 1991.
- [6] ETHERIDGE R D, PESTI G M, FOSTER E H. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory[J]. Animal Feed Science and Technology, 1998, 73(1/2): 21-28.
- [7] SAINT-DENIS T, GOUPY J. Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 515(1): 191-198.
- [8] HAKODA A, YUSUKE II, NAITO S, et al. Determination of crude protein in macaroni products by the combustion method and comparison with the Kjeldahl method: interlaboratory study[J]. Food Science and Technology Research, 2011, 17(3): 227-232.
- [9] MOORE J C, DEVRIES J W, LIPP M, et al. Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2010, 9(4): 330-357.
- [10] ROUCH D A, ROGINSKI H, BRITZ M L, et al. Determination of a nitrogen conversion factor for protein content in cheddar cheese[J]. International Dairy Journal, 2008, 18(2): 216-220.
- [11] SALO-VIIHNIINEN P P, KOIVISTOINEN P E. Determination of protein in foods: comparison of net protein and crude protein ($N \times 6.25$) values[J]. Food Chemistry, 1996, 51(1): 21-31.
- [12] KAMIZAKEA N K K, GONCALVES M M, ZAIA C T B V, et al. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2003, 16(4): 507-516.
- [13] MARIA R C I, MARIA F V M, KÁSSIO M G L. Classification and determination of total protein in milk powder using near infrared reflectance spectrometry and the successive projections algorithm for variable selection[J]. Vibrational Spectroscopy, 2011, 57(2): 342-345.
- [14] EZEAGU I E, PETAKE J K, METGES C C, et al. Seed protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for some uncultivated tropical plant seeds[J]. Food Chemistry, 2002, 78(1): 105-109.
- [15] 鲁健章, 孙丽华, 周彦钢. 凯氏定氮法测定鱼蛋白质含量的干扰因素分析[J]. 食品科学, 2011, 31(19): 453-456.
- [16] CAPITÁN-VALLVEYA L F, DUQUEB O, MIRÓN-GARCA G, et al. Determination of protein content using a solid phase spectrophotometric procedure[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 433(1): 155-163.
- [17] OKUTUCU B, DINCER A, HABIB O, et al. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration[J]. Journal of Biochemistry Biophysical Methods, 2007, 70(5): 709-711.
- [18] LINDEBOOM N, WANASUNDARA P K J P D. Interference of phenolic compounds in *Brassica napus*, *Brassica rapa* and *Sinapis alba* seed extracts with the Lowry protein assay[J]. Food Chemistry, 2007, 104(1): 30-38.
- [19] SMITH M R, PENNERT M H, BENNETT S E, et al. Quantitative colorimetric assay for total protein applied to the red wine pinot Noir[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(13): 6871-6876.
- [20] ANJALIE F, JEFFREY F. Melamine and cyanuric acid do not interfere with Bradford and Ninhydrin assays for protein determination[J]. Food Chemistry, 2010, 121(3): 912-917.
- [21] BANIK S P, PAL S, GHORAI S, et al. Interference of sugars in the Coomassie blue G dye binding assay of proteins[J]. Analytical Biochemistry, 2009, 386(1): 113-115.

- [22] GIANFRANCO G, CLAUDIO B, CRISTINA G. Inaccuracy of the Bradford method for the determination of protein concentration in steroid-horseradish peroxidase conjugates[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 337(1): 93-97.
- [23] ROMO C R, LAKIN A L, ROLFE E J. Properties of protein isolates prepared from ground seeds I. Development and evaluation of a dye binding procedure for the measurement of protein solubility[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 1975, 10(5): 541-546.
- [24] WU Wenbiao, LAKIN A L. Estimation of protein in potato tissue by dye binding[J]. *Food Chemistry*, 1993, 46(1): 49-53.
- [25] KHAM M I. Lysine estimation with the modified Udy-dye binding method in hexaploid wheat[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1977, 34(6): 711-712.
- [26] AMAMCHARLA J K, METAGER L E. Evaluation of a rapid protein analyzer for determination of protein in milk and cream[J]. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(8): 3846-3857.
- [27] LAKIN A L. Determination of nitrogen and estimation of protein in food[M]. London: Science Publishers, 1978.
- [28] MANSO M A, MIGUEL M, LÓPEZ-FANDIÑO R. Application of capillary zone electrophoresis to the characterisation of the human milk protein profile and its evolution throughout lactation[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1146(1): 110-117.
- [29] BEAN S R, BIETZ J A, LOOKHART G L. High-performance capillary electrophoresis of cereal proteins[J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 814(1/2): 25-41.
- [30] DONG Yiyang. Capillary electrophoresis in food analysis[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10(3): 87-93.
- [31] MIRALLES B, RAMOS M, AMIGO L. Influence of proteolysis of milk on the whey protein to total protein ratio as determined by capillary electrophoresis[J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(9): 2813-2817.
- [32] 栾吉梅, 张晓东. 有机染料共振光散射法测定蛋白质的研究进展[J]. *理化检验: 化学分册*, 2007, 43(2): 159-163.
- [33] 梁金虎, 唐英, 张进, 等. 共振光散射技术的原理与研究进展[J]. *重庆文理学院学报: 自然科学版*, 2010, 29(4): 31-36.
- [34] FENG Suling, PAN Zihong, FAN Jing. Determination of proteins at nanogram levels with bordeaux red based on the enhancement of resonance light scattering[J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2006, 64(3): 574-579.
- [35] LI Ying, DONG Lijun, WANG Weiping, et al. Flow injection analysis: Rayleigh light scattering detection for online determination of protein in human serum sample[J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 354(1): 64-69.
- [36] LIU Shaopu, YANG Zhuo, LIU Zhongfang, et al. Resonance Rayleigh-scattering method for the determination of proteins with gold nanoparticle probe[J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 353(1): 108-116.
- [37] DONG Lijun, LI Ying, ZHANG Yaheng, et al. A flow injection sampling resonance light scattering system for total protein determination in human serum[J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2007, 66(4/5): 1317-1322.
- [38] 张爱梅, 臧运波. 曙红Y-SDS体系共振瑞利散射法测定蛋白质[J]. *食品科学*, 2005, 26(7): 191-193.
- [39] BADDINI A L Q, CUNHA L E R, OLIVEIRA A M C, et al. Determination of total protein in hyperimmune serum samples by near-infrared spectrometry and multivariate calibration[J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 397(2): 175-180.
- [40] 金华丽, 许春红, 徐泽林. 近红外光谱法测定小麦籽粒中的蛋白质含量[J]. *河南工业大学学报: 自然科学版*, 2010, 31(6): 21-24.
- [41] KHODABUX K, L'OMELETTE M S S, JHAUMEER-LAULLOO S, et al. Chemical and near-infrared determination of moisture, fat and protein in tuna fishes[J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(3): 669-675.
- [42] ALMENDINGEN K, MELTZER H M, PEDERSEN J I, et al. Near infrared spectroscopy: a potentially useful method for rapid determination of fat and protein content in homogenized diets[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 54(1): 20-23.
- [43] QI Xin, HOU Zhiling, TIAN Jianlong, et al. The rapid determination of fat and protein content in fresh raw milk using the laser light scattering technology[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2006, 44(8): 858-869.
- [44] 朱向荣, 单杨, 李高阳, 等. 近红外光谱法快速测定液态奶中蛋白质和脂肪含量[J]. *食品科学*, 2011, 32(12): 191-195.
- [45] 王锡昌, 陆烨, 刘源. 近红外光谱技术快速无损测定狭鳕鱼糜水分和蛋白质含量[J]. *食品科学*, 2010, 31(16): 168-171.
- [46] VAKNIN Y, GHANIM M, SAMRA S, et al. Predicting *Jatropha curcas* seed-oil content, oil composition and protein content using near-infrared spectroscopy: a quick and non-destructive method[J]. *Industrial Crops and Products*, 2011, 34(1): 1029-1034.