

团 体 标 准

T/DAHEB007-2020

活性蛋白牛乳（牛奶）

Bioactive Protein Milk

2020-08-20 发布

2020-09-20 实施

河北省奶业协会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》的规则编写。

本标准由河北省奶业协会提出并归口。

本标准首次发布。

本标准起草单位：石家庄君乐宝乳业有限公司、河北冠卓检测科技股份有限公司、华测检测认证集团股份有限公司

本标准主要起草人：朱宏、韩美娜、郭峰、康志远、王雅炜、陆淳、于文花、姚欢、卢晓莉、耿云惠、李飞、杨光、董立雅、崔芳、吉利利。

活性蛋白牛乳（牛奶）

1 范围

本标准规定了活性蛋白牛乳（牛奶）的定义、技术要求、生产加工过程的卫生要求、检验方法、标识、包装、贮存和运输。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 191 包装储运图示标志

GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定

GB 4789.3 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数

GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB 4789.10 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

GB 4789.18 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳与乳制品检验

GB 4789.26 食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验

GB 5009.5 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定

GB 5009.6 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定

GB 5009.11 食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定

GB 5009.12 食品安全国家标准 食品中铅的测定

GB 5009.17 食品安全国家标准 食品中总汞及有机汞的测定

GB 5009.24 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素M族的测定

GB 5009.33 食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定

GB 5009.123 食品安全国家标准 食品中铬的测定

GB 5009.239 食品安全国家标准 食品酸度的测定

GB 5413.39 食品安全国家标准 乳和乳制品中非脂乳固体的测定

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 7718 食品安全国家标准 预包装食品标签通则

GB 12693 食品安全国家标准 乳制品良好生产规范

GB 14881 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范

GB 19301 食品安全国家标准 生乳

GB 28050 食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则

NY/T 939 巴氏杀菌乳和UHT灭菌乳中复原乳的鉴定

JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则

国家质量监督检验检疫总局令第75号《定量包装商品计量监督管理办法》

国家质量监督检验检疫总局令第123号《国家质量监督检验检疫总局关于修改〈食品标识管理规定〉的决定》

3 术语和定义

3.1 直接蒸汽杀菌

为有效杀灭病原性微生物和减少热处理强度（伤害）而采用的加工方法，将蒸汽注入预热牛乳中或将预热牛乳添加至蒸汽中进行加热处理，再经脱气的过程。

3.2 常温活性蛋白牛乳（牛奶）

以生牛乳为原料，经直接蒸汽杀菌工序制得的，可保留部分生物活性物质，在常温条件下贮存的液体产品。

3.3 低温活性蛋白牛乳（牛奶）

以生牛乳为原料，经直接蒸汽杀菌工序制得的，可保留部分生物活性物质，在低温条件下产品保质期不低于15天的液体产品。

4 技术要求

4.1 原料要求

生乳应符合 GB 19301 的规定。

4.2 感官要求

应符合表1的规定。

表1 感官要求

项 目	要 求	检验方法
色泽	呈乳白色或微黄色。	取适量试样置于 50 mL 烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有乳固有的香味，无异味。	
组织状态	呈均匀一致液体，无凝块、无沉淀、无正常视力可见异物。	

4.3 理化指标

应符合表2的规定。

表2 理化指标

项 目	指 标	检验方法
脂肪 ^a /（g/100g）	≥ 3.4	GB 5009.6
蛋白质/（g/100g）	≥ 3.2	GB 5009.5
非脂乳固体/（g/100g）	≥ 8.1	GB 5413.39
酸度/（°T）	12~18	GB 5009.239
a 仅适用于全脂产品。		

4.4 热敏感和生物活性物质指标

应符合表3的规定。

表3 热敏感和生物活性物质指标

项 目	指 标		检验方法
	低温活性蛋白牛乳 (牛奶)	常温活性蛋白牛乳 (牛奶)	
糠氨酸 ^b / (mg/100g 蛋白质) ≤	18	60	NY/T 939
α-乳白蛋白 / (mg/L) ≥	900	500	附录 A
β-乳球蛋白 / (mg/L) ≥	2500	1000	附录 A
乳铁蛋白 / (mg/L) ≥	20	—	附录 B

b 指标应至少每 15 批次检测一次, 在产品保质期内采样并测定。

4.5 微生物指标

4.5.1 常温活性蛋白牛乳 (牛奶) 应符合商业无菌的要求, 按 GB 4789.26 规定的方法检验。

4.5.2 低温活性蛋白牛乳 (牛奶) 应符合表 4 的规定。

表4 微生物指标

项 目	采用方案 ^e 及限量 (若非指定, 均以 CFU/mL 表示)				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数	5	1	5000	10000	GB 4789.2
大肠菌群	5	1	1	5	GB 4789.3 平板计数法
沙门氏菌	5	0	0/25mL	—	GB 4789.4
金黄色葡萄球菌	5	0	0/25mL	—	GB 4789.10 定性检验

c 样品的分析及处理按 GB 4789.1 和 GB 4789.18 执行。

4.6 污染物限量

应符合表5的规定。

表5 污染物限量

项 目	指 标	检验方法
铅 (以 Pb 计) / (mg/kg) ≤	0.05	GB 5009.12
总汞 (以 Hg 计) / (mg/kg) ≤	0.01	GB 5009.17
总砷 (以 As 计) / (mg/kg) ≤	0.1	GB 5009.11
铬 (以 Cr 计) / (mg/kg) ≤	0.3	GB 5009.123
亚硝酸盐 (以 NaNO ₂ 计) / (mg/kg) ≤	0.4	GB 5009.33

4.7 真菌毒素限量

应符合表6的规定。

表6 真菌毒素限量

项 目	指 标	检验方法
黄曲霉毒素 M ₁ / (μg/kg) ≤	0.5	GB 5009.24

4.8 净含量

符合国家质量监督检验检疫总局令第75号《定量包装商品计量监督管理办法》要求。净含量检测按JJF 1070规定进行。

5 生产加工过程中的卫生要求

应符合 GB 12693、GB 14881 的规定。

6 标识、包装、贮存和运输

6.1 标识

6.1.1 产品标签应符合 GB 7718、GB 28050 和国家质量监督检验检疫总局令第 123 号《国家质量监督检验检疫总局关于修改〈食品标识管理规定〉的决定》的规定。

6.1.2 包装贮运标志应符合 GB/T 191 规定。

6.2 包装

包装材料和容器应符合相关标准的要求。

6.3 贮存和运输

6.3.1 产品不得与有毒、有异味、易挥发、易腐蚀的物品混装运输。

6.3.2 低温活性蛋白牛乳(牛奶)应使用冷藏车运输，运输和贮存温度为 2℃~6℃。

附录 A
(规范性附录)
α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白检测

A.1 检测原理

牛奶中酪蛋白的等电点为 4.6, 因此当牛奶样品 pH 调至 4.6 时, 酪蛋白及变性的乳清蛋白可以通过沉淀去除, 滤液中未变性的 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白经高效液相色谱分离, 经 PDA 检测器测定, 外标法标准曲线定量。

A.2 试剂和材料

除非另有规定, 所用试剂均为分析纯, 水为 GB/T 6682 规定的一级水。

A.2.1 试剂和标准品

冰醋酸 (优级纯, 室温保存)、三氟乙酸 (色谱纯, 99.9 %, 4℃ 保存)、乙腈 (色谱纯)、α-乳白蛋白高纯品 (CAS 号 9051-29-0, 纯度 ≥ 85.0 %)、β-乳球蛋白 A 高纯品 (CAS 号 50863-92-8, 纯度 ≥ 90.0 %)、β-乳球蛋白 B 高纯品 (CAS 号 9066-45-9, 纯度 ≥ 90.0 %)。

A.2.2 试剂配制

A.2.2.1 混合标准储备液 (10 mg/mL)

精确称取 0.1176 g 的 α-乳白蛋白、0.1111 g 的 β-乳球蛋白 A 和 0.1111 g β-乳球蛋白 B 标准品, 溶于 10 mL 水中, 于 -20 ℃ 保存, 使用期限不超过 3 个月。

A.2.2.2 混合标准中间液 (2.5 mg/mL)

从混合标准储备液中准确移取 0.25 mL 溶液, 用水定容 1 mL, 混匀, 现用现配。

A.2.2.3 混合标准工作液

从混合标准中间液中分别准确吸取 2 μL、4 μL、8 μL、20 μL、40 μL、80 μL 到 1 mL 进样小瓶中, 用水定容至 1 mL, 即该标准工作液浓度为: 5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L。该工作液现用现配。

A.3 仪器和设备

超高效液相色谱仪 (带紫外检测器)、pH 计 (精度 0.1)、离心机 (转速 ≥ 10000 转/分钟)、天平 (感量为 0.01 mg)。

A.4 分析步骤

A.4.1 处理方法

取 5.0 mL 牛奶至 50 mL 离心管中，加入 15.0 mL 水混匀，加入冰醋酸（约 30 μ L）调节 pH 为 4.6 \pm 0.1，涡旋震荡 1 min，室温静置至少 20 min，10000 转，4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min。取 1 mL 上清液稀释 10 倍后，过 0.22 μ m 滤膜，上机检测。（如浓度太低，不用稀释，离心后直接上机）。

A. 4. 2 参考色谱条件

色谱柱：BEH300 C4 Column 柱，100 mm \times 2.1 mm，1.7 μ m, 300 Å ，或具同等性能的色谱柱。

流动相 A: 水溶液（含 0.1% 三氟乙酸）

流动相 B: 乙腈（含 0.08% 三氟乙酸）

梯度洗脱：

时间 (min)	流动相 A	流动相 B
0	95	5
1.5	62	38
2.5	62	38
5.5	59	41
5.6	5	95
7.0	5	95
7.1	95	5
9.0	95	5

流速：0.3 mL/min；检测波长：280 nm；柱温：60 $^{\circ}$ C；进样量：10 μ L。

注：根据出峰、峰形等实际情况可适当调整梯度洗脱的流速、时间、比例。

A. 4. 3 标准曲线的制作

将混合标准系列工作液分别注入超高效液相色谱仪中，测定各组分的峰面积，以相应标准工作液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

A. 4. 4 试样溶液的测定

将试样溶液注入超高效液相色谱仪中，得到各组分相应的峰面积，根据标准曲线得到待测试样溶液中 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白 A 和 β -乳球蛋白 B 的浓度。

A. 5 分析结果表述

试样中 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白 A 或 β -乳球蛋白 B 的含量以浓度 X 计，单位为 mg/L，按下式计算

$$X = \frac{C \times V_2}{V_1}$$

式中 C-上机液中 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白 A 或 β -乳球蛋白 B 浓度，单位为毫克每升 (mg/L)；

V_1 -吸取样品的体积，单位为毫升 (mL)；

V_2 -加入水后体积，单位为毫升 (mL)。

注： β -乳球蛋白的含量以 β -乳球蛋白 A 和 β -乳球蛋白 B 含量之和计。结果保留至整数位。

A.6 精密度

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值小于 15 %。

A.7 检出限

检出限为 10 mg/L。

全国团体标准信息平台

附录 B
(规范性附录)
乳铁蛋白检测

B.1 检测原理

试样中的乳铁蛋白经磷酸盐缓冲液提取，肝素亲和柱净化，反相高效液相色谱分离，二级管阵列检测器检测于 280 nm 处检测，外标法定量。

B.2 试剂和材料

B.2.1 乙腈 (CH_3CN): 色谱纯。

B.2.2 氯化钠 (NaCl)。

B.2.3 磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)。

B.2.4 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)。

B.2.5 三氟乙酸 (CF_3COOH)。

B.2.6 结合缓冲液: 称取 30.083 g 十二水合磷酸氢二钠, 2.496g 二水合磷酸二氢钠, 加入 800 mL 去离子水溶解, 最后定容至 1000 mL。

B.2.7 淋洗液: 称取 15.04 g 十二水合磷酸氢二钠, 1.248 g 二水合磷酸二氢钠, 5.84 g 氯化钠, 加入 800 mL 去离子水溶解, 最后定容至 1000 mL。

B.2.8 洗脱液: 称取 7.52 g 十二水合磷酸氢二钠, 0.624 g 二水合磷酸二氢钠, 29.2 g 氯化钠, 加入 400 mL 去离子水溶解, 最后定容至 500 mL。

B.2.9 乳铁蛋白标准品: CAS号 112163-33-4, 纯度 \geq 85.0 %。

B.2.10 标准溶液的制备

B.2.10.1 乳铁蛋白标准储备溶液 (10 mg/mL): 精确称取乳铁蛋白标准品用水溶解, 定容至 10 mL。置于-20 °C 冰箱中保存, 可保存三个月。

B.2.10.2 乳铁蛋白标准中间液 (1 mg/mL): 从乳铁蛋白标准储备液中准确移取 1mL 溶液, 用水定容 10mL, 混匀, 现用现配。

B.2.10.3 乳铁蛋白标准工作液: 从乳铁蛋白标准中间液中分别准确吸取 5 μ L、10 μ L、20 μ L、50 μ L、100 μ L、200 μ L 到 1 mL 进样小瓶中, 用水定容至 1ml, 即该标准工作液浓度为: 5 mg /L、10 mg /L、20 mg /L、50 mg /L、100 mg /L、200 mg /L。临用前配制。

B.2.11 肝素亲和柱: 于 4 °C 冰箱内储存。

B.2.12 0.45 μ m 微孔水相滤膜。

B.3 仪器和设备

B.3.1 高效液相色谱仪：配有二极管阵列检测器（DAD）或紫外检测器。

B.3.2 电子天平：感量为 0.01 g 和 0.01 mg。

B.3.3 冷冻离心机：转速 ≥ 10000 r/min。

B.3.4 涡旋振荡器。

B.4 分析步骤

B.4.1 液体试样

常乳中乳铁蛋白参考浓度为 20.0~350 mg/100g。

称取 1~10 g（精确至 0.01 g）样本于 100 mL 三角瓶中，先加入 30 mL 结合缓冲液，涡旋振荡混匀 1 min，将样品全部转移至容量瓶，再加入结合缓冲液定容至 50 mL 后混匀；将样本转移至离心管于 4℃ 条件下以 12000 r/min 转速离心 10 min，离心后轻轻取出中间层，上层有脂质，下面有沉淀，用大量程的移液器将中间液体部分吸出，注意不要吸取上层脂质和下层沉淀。取其中的 10 mL~30 mL 作为上样液。

B.4.2 净化

肝素亲和柱先加入 5 mL 结合缓冲液平衡，处理完毕后加入样品提取液，待样液完全流出后，再用 10 mL 淋洗液淋洗，弃去全部流出液。最后用 2.5 mL 洗脱液洗脱，收集全部流出液，定容至 3.5 mL。将收集溶液过滤膜，供液相色谱检测分析用。

B.4.3 仪器参考条件

B.4.3.1 色谱柱：BEH300 C4 Column 柱，100 mm×2.1 mm，1.7 μ m，300Å，或具同等性能的色谱柱。

B.4.3.2 检测波长：280 nm。

B.4.3.3 柱温：60 ℃。

B.4.3.4 进样体积：10 μ L。

B.4.3.5 流速：0.45 mL/min。

B.4.3.6 流动相：A 水溶液（含 0.1% 三氟乙酸），B 乙腈（含 0.08% 三氟乙酸），梯度洗脱参数见表 1。

表 1：流动相梯度洗脱程序表

时间 (min)	流动相 A	流动相 B
0	95	5
1.5	62	38
2.5	62	38
5.5	55	45
5.6	5	95
7.0	5	95
7.1	95	5

9.0	95	5
-----	----	---

B.4.4 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中,测定相应的峰面积,以标准工作液的浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

B.4.5 试样溶液的测定

将净化后的试液注入高效液相色谱仪中,得到相对应的峰面积,根据标准曲线得到试液中乳铁蛋白的浓度,平行测定次数不少于2次。

B.5 分析结果表述

试样中乳铁蛋白的含量以浓度 X 计,单位为 mg/100g,按下式计算

$$X = \frac{c \times V \times n}{m} \times \frac{100}{1000}$$

式中 C—上机液中乳铁蛋白浓度,单位为毫克每升(mg/L)。

V—试样定容体积,单位为毫升(mL)。

m—试样质量,单位为克(g)。

n—试样稀释倍数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

B.6 精密度

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值小于 15%。

B.7 检出限

检出限为 0.1 mg/100g。