

便携式牛乳蛋白质含量检测仪设计与验证

杨彪¹ 王凯¹ 韩天宇¹ 朱新华¹ 郭文川^{1,2}

(1. 西北农林科技大学机械与电子工程学院, 陕西杨凌 712100; 2. 农业农村部农业物联网重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为了给牛乳蛋白质含量检测提供一种操作简便、成本低廉的便携式仪器,基于 595 nm 下考马斯亮蓝 G-250 染料中的疏水基团在酸性条件下与蛋白质的疏水微区具有较强亲和力,从而影响光透射特性的原理,设计了一种便携式牛乳蛋白质含量检测仪。该检测仪的硬件主要由单片机、光源模块、光传感器模块、输入输出模块和电源模块等组成;软件由 Keil C51 编写,并由主函数、光照度采集子函数、数据预处理子函数、显示子函数和蛋白质含量计算子函数等组成。以生鲜牛乳为对象,研究了透射光照度与蛋白质含量之间的关系,发现随着蛋白质含量的增加,透射光照度减小,二者具有良好的线性关系,其线性决定系数为 0.872。对比该仪器的蛋白质检测结果表明,同凯氏定氮法相比,本检测仪的绝对误差范围是 $\pm 0.08\text{ g}/(100\text{ g})$,平均绝对误差为 $0.05\text{ g}/(100\text{ g})$ 。此外,该检测仪的检测时间小于 2 s,可快速、有效地检测牛乳中蛋白质含量。

关键词: 牛乳; 考马斯亮蓝; 蛋白质含量; 便携式检测仪

中图分类号: S237; TS252.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2019)03-0317-06

Design and Validation on Portable Detector for Protein Content in Milk

YANG Biao¹ WANG Kai¹ HAN Tianyu¹ ZHU Xinhua¹ GUO Wenchuan^{1,2}

(1. College of Mechanical and Electronic Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

2. Key Laboratory of Agricultural Internet of Things, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Protein content is one of the most important quality indicators of milk. The traditional methods used to measure protein content in milk have high precision, but the measurement procedures are tedious and time-consuming, and the measurement equipments are expensive. In addition, these methods can not be used in field or in-situ measurement. Therefore, developing a kind of portable milk protein content detector with simple operation and low cost, which could be used in-situ measurement, would be appreciated by milk producers, processors and consumers. Since the hydrophobic grouping of Coomassie brilliant blue G-250 has strong affinity for protein in acids, a portable milk protein content detector was developed based on light transmission. The hardware of the detector consisted of the modules of single chip micro-computer, light source, light sensor, input/output and power. The software was developed by C51 language, and was made up of main function and several sub-functions to realize light collection, data preprocessing, protein content calculation and display. Raw fresh milk was used to study the relationship between intensity of transmitted light and protein content. It was found that the intensity of transmitted light was decreased with the increase of protein content, and they had strong linear relationship with the coefficient of determination of 0.872. The validation experiment on the developed detector showed that contrasted with Kjeldahl method, the absolute measurement error of the developed detector was within the range of $\pm 0.08\text{ g}/(100\text{ g})$, and its mean absolute error was $0.05\text{ g}/(100\text{ g})$. In addition, the measurement result could be given in 2 s.

Key words: milk; Coomassie brilliant blue; protein content; portable detector

收稿日期: 2018-09-28 修回日期: 2018-11-11
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671935)
作者简介: 杨彪(1993—),男,博士生,主要从事农产品和食品品质无损检测研究,E-mail: yangbiao8169@foxmail.com
通信作者: 郭文川(1969—),女,教授,博士生导师,主要从事农产品和食品品质无损检测技术研究,E-mail: guowenchuan69@126.com

0 引言

牛乳是人类利用最多的动物乳,占乳品消费量的95%^[1]。蛋白质含量是牛乳最重要的品质指标之一,因此备受牛乳生产者、加工者和消费者的关注。文献[2]规定:生鲜乳蛋白质含量(质量比)应在2.8 g/(100 g)以上。因而检测牛乳中的蛋白质含量成为牛乳品质检测的一个常规项目。文献[3]中规定了两种牛乳蛋白质含量检测方法,分别是凯氏定氮法和分光光度法。虽然这两种方法具有检测结果稳定和检测精确的优点,但所需仪器昂贵、操作繁琐、费时、需要专业人员操作,而且不能用于现场检测。

为了探索新型的蛋白质检测方法,国内外研究者分别采用近红外光谱法^[4-6]、中红外光谱法^[7-8]、拉曼光谱法^[9-10]、激光散射法^[11]、紫外分光光度法^[12]、超声波法^[13]、杜马斯燃烧法^[14]、染色法^[15]、介电特性法^[16-18]等检测乳中的蛋白质含量,取得了较好的研究结果。其中超声波技术的检测精度有限^[19],而其他检测技术所需的仪器依旧比较庞大和昂贵,也仅局限于实验室检测。虽然目前有快速的乳成分检测仪,例如 MilkoScan FT +^[20]、MilkoScan FT6000^[8](丹麦 FOSS 分析仪器有限公司),Lactoscan Milk Analyzer^[21](保加利亚 Milkotronic 有限公司)等,但同样存在仪器价格昂贵,清洗仪器费时,只能用于实验室检测等缺点。因此,设计一种价格低廉、检测迅速、结果可靠、能用于现场检测的便携式牛乳蛋白质含量检测仪对于牛乳生产、加工和消费均有重要的作用。

由于考马斯亮蓝 G-250 染料中的疏水基团在酸性(磷酸)条件下与蛋白质的疏水微区具有亲和力,通过疏水作用与蛋白质相结合,使得反应后的混合溶液在 595 nm 处有最大吸光度^[22],基于此,本文以单片机为控制器,设计一种便携式牛乳蛋白质含量检测仪,并对检测仪的性能进行验证。

1 便携式牛乳蛋白质含量检测仪设计

1.1 硬件设计

图 1 是牛乳蛋白质含量检测仪的硬件结构图。该检测仪主要由单片机、光源模块、光传感器模块、电源模块和输入输出模块组成。单片机负责数据处理,并控制系统中的其他模块。光源模块负责产生光强稳定且波长为 590 ~ 595 nm 的入射光;光传感器模块将穿过待测样本的光信号转换为数字信号,并将携带有牛乳蛋白质含量相关信息的数字信号传送给单片机;电源模块为整个系统提供稳定的电源;

输入输出模块完成输入信息的处理,并将光传感器的检测数据和蛋白质含量检测值反馈给用户。

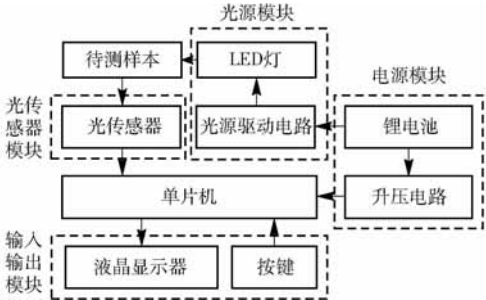


图 1 牛乳蛋白质含量检测仪的硬件结构框图

Fig.1 Structure diagram of portable milk protein content detector

1.1.1 单片机

本设计采用 STC89C52 单片机作为控制核心,该单片机具有 512B 的数据存储器和 8KB 的 flash 可擦写程序存储器。与之配套的电路包括时钟电路、复位电路、串口通信电路。时钟电路采用 11.059 2 MHz 的晶振,串口通信电路采用 CH340 芯片,用于实现单片机与计算机之间的数据交换。单片机的引脚分配如图 2 所示。

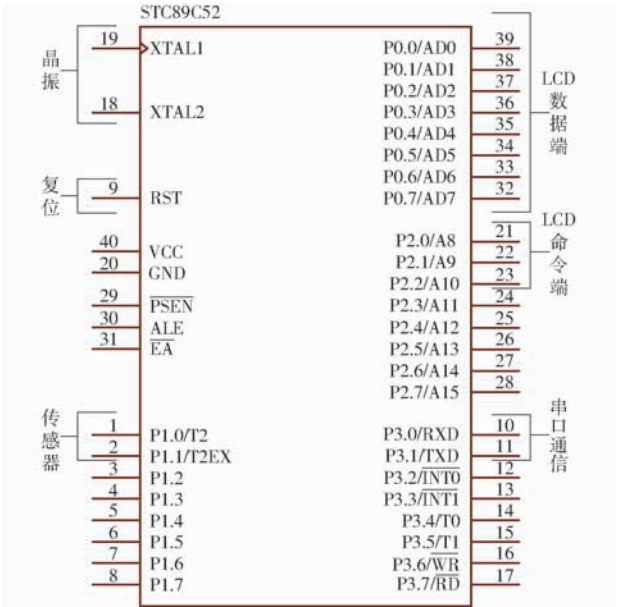


图 2 单片机引脚分配图

Fig.2 Pin assignment diagram of single-chip micro-computer

1.1.2 光源模块

由于考马斯亮蓝 G-250 染料与牛乳中的蛋白质反应后,在 595 nm 处有最大吸收峰,因此光源模块的作用是输出波长为 595 nm 的光。本设计采用 XP-E 3533 型 LED 灯珠(美国 CREE 公司)作为光源。该灯珠工作电压为 2.0 ~ 2.5 V,工作电流 350 ~ 500 mA,输出光的波长范围为 590 ~ 595 nm,可满足设计需求。

1.1.3 光传感器模块

采用 GY-30 型数字光照传感器模块检测透射光照度。该传感器模块采用分辨率为 16 位的数字型光传感器芯片 BH1750FVI 检测透射光照度,其响应波段为 400 ~ 700 nm,峰值响应波段为 500 ~ 600 nm,输入电压为 3 ~ 5 V,满足设计要求。该传感器模块共有 5 个接口,其中:VCC 和 GND 用于供电;ADDR 为器件选择端口,低电平有效,接 GND 即可;SCL、SDA 分别为串行时钟线和串行数据线,分别与单片机的 P1.0、P1.1 接口相连接。单片机与传感器模块之间通过 I²C 协议通信,电路原理图如图 3 所示。

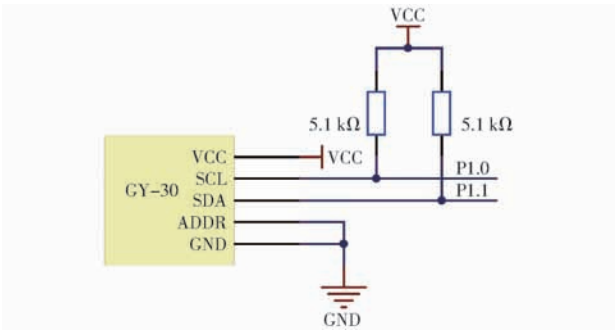


图 3 光传感器模块电路原理图

Fig.3 Schematic of used light sensor model

1.1.4 电源模块

为了减轻仪器质量,提高仪器便携性,采用 18650 型锂电池配合 DD06CVSA 电源管理模块为整个仪器供电。DD06CVSA 电源管理模块可以将锂电池输出的 3.6 ~ 4.2 V 电压转换为稳定的 5.0 V,并输出 2.1 A 的电流。

1.1.5 输入输出模块

综合考虑仪器的功能和便携性,本检测仪只设计了两个按键,分别是开关键和复位键。显示器为液晶显示器 LCD1602,显示器的电路原理图如图 4 所示,其数据线与单片机 P0.0 ~ P0.7 接口相连,控制线 RS、RW、E 分别与单片机 P2.0、P2.1、P2.2 相连,电阻 R1 用于控制显示器的亮度。

1.1.6 整体结构设计

检测仪整体结构用 SolidWorks 软件设计,尺寸为 120 mm × 90 mm × 65 mm,外壳用 3D 打印技术制作,耗材采用 PLA(聚乳酸)。牛乳与考马亮蓝的混合溶液盛于比色皿内,而比色皿置于设计的比色皿支架上。图 5 是便携式牛乳蛋白质含量检测仪样机。

1.2 软件设计

本检测仪的软件在 Keil μVision4 中使用 C51 语言编写。主要包括主函数以及光照度数据采集、数据预处理、蛋白质含量计算和显示子函数等。其

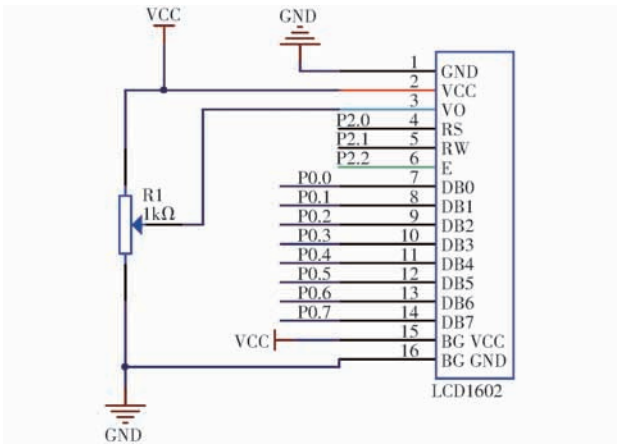


图 4 显示器电路原理图

Fig.4 Schematic of used display



图 5 便携式牛乳蛋白质含量检测仪样机

Fig.5 Prototype of developed portable milk protein content detector

1. 外壳 2. 显示器 3. 单片机 4. 比色皿支架 5. 待测样本

中,主函数,主要完成光传感器模块等主要元器件的初始化、协调各子函数运行等;光照度数据采集子函数和数据预处理子函数,主要完成光传感器与单片机数据交换和光照度数据的预处理;蛋白质含量计算子函数负责根据光传感器输出的数据计算出样本的蛋白质含量;显示子函数负责将检测结果显示至显示器。控制软件流程如图 6 所示。

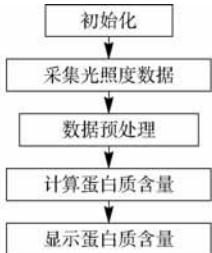


图 6 检测仪软件流程

Fig.6 Program flow chart of developed detector

2 试验材料与方法

2.1 材料

试验用牛乳样本购自陕西省杨陵区某牛场,奶牛品种为“荷斯坦”。每天随机采集 4 ~ 6 头奶牛的牛乳,共采集 35 份牛乳样本。样本采集后 30 min 内带回实验室置于 4℃ 环境下冷藏。试验前将样本

取出恢复至室温(25℃)时进行试验。所有样本在采集后 10 h 内完成试验。

2.2 试验方法

2.2.1 牛乳蛋白质含量测量

牛乳样本蛋白质含量用 Kjeltec 8400 型全自动凯氏定氮仪(丹麦 FOSS 分析仪器有限公司)测量,具体测量方法参考文献[3]。

2.2.2 考马斯亮蓝溶液配制

使用 FA2104N 型电子分析天平(上海菁海仪器有限公司)准确称量 100 mg 的粉末状考马斯亮蓝 G-250 染料(安徽酷尔生物工程有限公司),将其加入 50 mL 95% 的酒精中,待充分溶解后,再向该酒精溶液中加入 100 mL 85% 的磷酸,用蒸馏水将反应后的溶液稀释并定容至 1 000 mL,最后用中性滤纸过滤,从而得到考马斯亮蓝溶液^[23]。

2.2.3 牛乳-考马斯亮蓝混合液制备

当蛋白质含量为 0~0.18 g/(100 g)时,考马斯亮蓝法对蛋白质的检测精度较高^[24]。由于牛乳中蛋白质含量通常为 2.8~3.6 g/(100 g),因此用去离子水对牛乳样本进行稀释,稀释比例为 1:50。进而用移液枪吸取 5 mL 稀释后的牛乳和 20 mL 考马斯亮蓝溶液放入试管中摇匀,静置 1 min 后得到牛乳-考马斯亮蓝混合液。

2.2.4 透射光照度测量

打开牛乳蛋白质含量检测仪的电源,预热 2 min。然后用移液枪取适量的牛乳-考马斯亮蓝混合溶液加入 10 mm 比色皿(12.5 mm×12.5 mm×45 mm)中,将比色皿放入检测仪的比色皿座内,盖上比色皿盖和仪器盖,观察并记录显示屏上给出的透射光照度。每个样品重复 3 次,3 次测量结果的平均值作为该样品的测量结果。

3 试验结果分析与建模

图 7 是 35 个牛乳样本的蛋白质含量与由检测仪测得的透射光照度之间的关系。由图 7 可知,透射光照度随牛乳中蛋白质含量的增加而减小,说明牛乳样本中的蛋白质含量越高,对波长 595 nm 处的光的吸收作用越强,而透射光照度越小^[25]。对牛乳中的蛋白质含量与透射光照度进行线性拟合,决定系数为 0.872,可见二者相关性较好,拟合关系式为

$$P = -0.004\,78L + 3.27 \quad (R^2 = 0.872) \quad (1)$$

式中 P ——蛋白质含量, g/(100 g)

L ——透射光照度, lx

根据式(1)中牛乳的蛋白质含量与透射光照度之间的关系调整程序,使得该检测仪直接输出基于透射光照度计算得到的牛乳蛋白质含量。

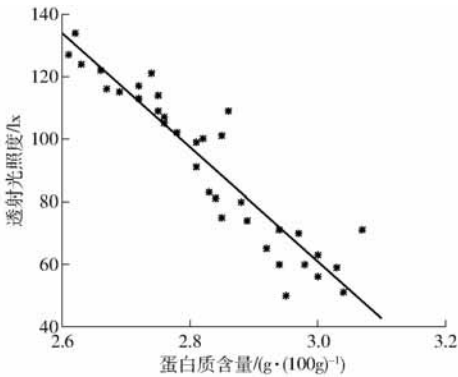


图 7 牛乳蛋白质含量与透射光照度之间的关系
Fig.7 Relationship between protein content of milk and illuminance of transmitted light

4 仪器性能检验

为了对设计的便携式牛乳蛋白质含量检测仪的性能进行验证,另取 21 份牛乳样本分别用凯氏定氮法和本仪器测量其蛋白质含量,测量结果如图 8 所示。图 8 说明,测量结果紧密地分布在 45°线的附近。同凯氏定氮法的测量结果相比,当牛乳蛋白质含量在 2.54~2.95 g/(100 g)范围内时,本检测仪的绝对误差范围是 ±0.08 g/(100 g),平均绝对误差为 0.05 g/(100 g)。可见本仪器对于牛乳中蛋白质含量的检测具有良好的检测精度。此外,该仪器测量每个样品蛋白质含量的时间小于 2 s。

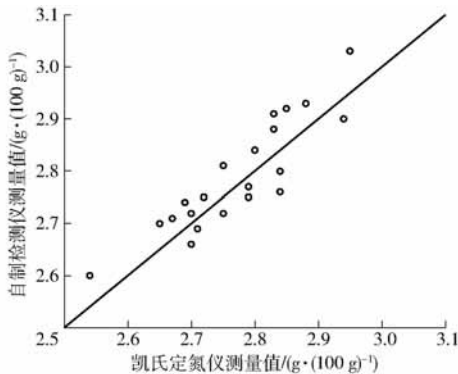


图 8 凯氏定氮法测量值与自制仪器测量值的比较
Fig.8 Comparison on the measured protein contents by Kjeldahl method and by using developed milk protein content detector

5 结论

- (1) 基于考马斯亮蓝染色法原理设计了由单片机、光源模块、光传感器模块、电源模块和输入输出模块组成的牛乳蛋白质含量检测仪硬件系统,用 C51 语言编写了仪器的控制软件,实现了检测透射光照度和牛乳蛋白质含量的功能。
- (2) 透射光照度与蛋白质含量之间具有良好的线性关系,线性决定系数为 0.872。

(3)对本仪器的检测性能验证试验结果表明,平均绝对误差为 $0.05\text{ g}/(100\text{ g})$,可以较准确地检测牛乳中的蛋白质含量。此外,该检测仪的检测时间小于 2 s 。

参 考 文 献

- [1] 张熙桐,关博元,孔繁华,等. 人乳、牛乳、羊乳中乳清部分氨基酸组成及乳清蛋白中蛋白质二级结构的对比[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 107–112.
ZHANG Xitong, GUAN Boyuan, KONG Fanhua, et al. Comparative study of amino acid composition and secondary structure of whey proteins in human milk, cow milk, and goat milk[J]. Food Science, 2017, 38(24): 107–112. (in Chinese)
- [2] GB 19301—2010 食品安全国家标准 生乳[S]. 2010.
- [3] GB 5009. 5—2016 食品中蛋白质的测定[S]. 2016.
- [4] FENG X D, SU R, XU N, et al. Portable analyzer for rapid analysis of total protein, fat and lactose contents in raw milk measured by non-dispersive short-wave near-infrared spectrometry [J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2013, 29(1): 15–19.
- [5] 王加华, 张晓伟, 王军, 等. 基于便携式近红外技术的生鲜乳品质现场评价[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(10): 2679–2684.
WANG Jiahua, ZHANG Xiaowei, WANG Jun, et al. On-site evaluation of raw milk qualities by portable vis/NIR transmittance technique[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2014, 34(10): 2679–2684. (in Chinese)
- [6] BOGOMOLOV A, BELIKOVA V, GALYANIN V, et al. Reference-free spectroscopic determination of fat and protein in milk in the visible and near infrared region below 1 000 nm using spatially resolved diffuse reflectance fiber probe[J]. Talanta, 2017, 167: 563–572.
- [7] BONFATTI V, DI M G, CARNIER P. Effectiveness of mid-infrared spectroscopy for the prediction of detailed protein composition and contents of protein genetic variants of individual milk of Simmental cows[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(12): 5776–5785.
- [8] NIERO G, PENASA M, GOTTARDO P, et al. Short communication: selecting the most informative mid-infrared spectra wavenumbers to improve the accuracy of prediction models for detailed milk protein content[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(3): 1853–1858.
- [9] MAZUREK S, SZOSTAK R, CZAJA T, et al. Analysis of milk by FT-Raman spectroscopy[J]. Talanta, 2015, 138: 285–289.
- [10] HUANG Y, GU J, XIANG G, et al. Detection of total protein in milk using phosphomolybdic acid-mediated surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2016, 47(3): 277–282.
- [11] XIN Q, LING H Z, LONG T J, et al. The rapid determination of fat and protein content in fresh raw milk using the laser light scattering technology[J]. Optics & Lasers in Engineering, 2006, 44(8): 858–869.
- [12] RUKKE E O, OLSEN E F, DEVOLD T, et al. Technical note: comparing calibration methods for determination of protein in goat milk by ultraviolet spectroscopy[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(7): 2922–2925.
- [13] 孙选. 牛奶质量超声检测基础理论及实验研究 [D]. 天津: 天津大学, 2007.
SUN Xuan. Study on theories and experiments of milk quality ultrasonic measurement [D]. Tianjin: Tianjin University, 2007. (in Chinese)
- [14] HAKODA A, LI Y, 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 & Technology Research, 2011, 17(3): 227–232.
- [15] AMAMCHARLA J K, METZGER 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.
- [16] 郭文川, 康飞, 朱新华. 频率、温度和大豆蛋白对牛乳介电特性的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2015, 46(10): 274–278.
GUO Wenchuan, KANG Fei, ZHU Xinhua. Influence of frequency, temperature and soy protein on dielectric properties of raw milk [J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(10): 274–278. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20151036&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2015.10.036. (in Chinese)
- [17] ZHU X, GUO W, KANG F, et al. Determination of protein content of raw fresh cow's milk using dielectric spectroscopy combined with chemometric methods[J]. Food & Bioprocess Technology, 2016, 9(12): 1–11.
- [18] 郭文川, 孔繁荣. 不同类型蛋白质及其添加量对牛乳介电特性的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2016, 47(8): 248–254.
GUO Wenchuan, KONG Fanrong. Influence of different proteins and their additive amounts on permittivities of milk [J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2016, 47(8): 248–254. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20160832&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2016.08.032. (in Chinese)
- [19] 丁英强. 超声波牛奶成分快速检测方法 & 仪器研究 [D]. 天津: 天津大学, 2006.
DING Yingqiang. Study on the method and instrument of milk components rapid analysis by ultrasonic [D]. Tianjin: Tianjin

University, 2006. (in Chinese)

[20] LIN Y, O'MAHONY J A, KELLY A L, et al. Seasonal variation in the composition and processing characteristics of herd milk with varying proportions of milk from spring-calving and autumn-calving cows[J]. Journal of Dairy Research, 2017, 84(4): 444 – 452.

[21] MUSAAD A M, FAYE B, ALMUTAIRI S E. Seasonal and physiological variation of gross composition of camel milk in Saudi Arabia[J]. Emirates Journal of Food & Agriculture, 2011, 25(8): 618 – 624.

[22] 王永刚, 杨光瑞, 马雪青, 等. 荧光光谱法和分子模拟技术研究考马斯亮蓝 G – 250 与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(8): 2474 – 2479.

WANG Yonggang, YANG Guangrui, MA Xueqing, et al. Study on interaction between Coomassie brilliant blue G – 250 and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017, 37(8): 2474 – 2479. (in Chinese)

[23] 乐薇, 刘乐. 数码成像比色法测定牛乳中蛋白质的含量[J]. 食品科学, 2016, 37(4): 154 – 157.

LE Wei, LIU Le. Determination of the protein content of milk by digital imaging colorimetry [J]. Food Science, 2016, 37(4): 154 – 157. (in Chinese)

[24] 冯昕, 王吉中, 尧俊英, 等. 考马斯亮蓝法测定乳与乳制品中蛋白质含量[J]. 粮食与食品工业, 2010, 17(3): 57 – 59.

FENG Xin, WANG Jizhong, YAO Junying, et al. Determination of protein content in milk and dairy products by Coomassie brilliant blue method [J]. Cereal & Food Industry, 2010, 17(3): 57 – 59. (in Chinese)

[25] 孙红, 陈香, 孙梓淳, 等. 基于透射光谱的玉米叶片含水率快速检测仪研究[J/OL]. 农业机械学报, 2018, 49(3): 173 – 178.

SUN Hong, CHEN Xiang, SUN Zichun, et al. Rapid detection of moisture content in maize leaves based on transmission spectrum [J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2018, 49(3):173 – 178. http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20180321&flag=1&journal_id=jcsam. DOI:10. 6041/j. issn. 1000-1298. 2018. 03. 021. (in Chinese)