



公開
 密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：030104U104

行政院農業委員會98年度科技計畫研究報告

計畫名稱： 自豬肝萃製促進食物中鐵質生物可利用率之
生物活性肽 (第1年/全程1年)
(英文名稱) The extraction of bioactive peptide
from swine liver as an accelerant of
iron bioavailability in foods

計畫編號： 98農科-3.1.4-牧-U1(4)

全程計畫期間：自 98年4月1日 至 98年12月31日

本年計畫期間：自 98年4月1日 至 98年12月31日

計畫主持人： 周繼發
研究人員： 郭思吟
執行機關： 私立東海大學



自豬肝萃製促進食物中鐵質生物可利用率之生物活性肽

計畫編號：98 農科-3.1.4-牧-U1(5)

摘要

自市場購得之新鮮豬肝臟(FL)經製備成乾燥肝粉(DFL)、水溶(WSP)、鹽溶(SSP)與不溶性(ISP)肝粉等樣品，再經酵素處理與冷凍乾燥後，分析各樣品之一般組成分、收率、不同 pH 值下相對溶解度。結果顯示，水分以 FL 為最高；灰分與粗脂肪部 DFL 含量最高；蛋白質以 WSP 與經酵素水解之水溶性肝肽粉(DWSP)含量最高。100g 肝臟可製得 28.24g 之 DFL，並萃出 WSP、SSP 與 ISP 分別為 4.62、7.96 及 15.08g，如經酵素水解後則 DWSP 與鹽溶性肝肽粉(DSSP)之收率顯著提高，而不溶性者(DISP)則顯著減少($P < 0.05$)。當以 WSP 於 pH 3.0 之溶解度為 100% 時，各部分樣品之相對溶解度均於 pH 4.0~5.0 時呈現最低，而酵素水解可顯著提高肝粉在水溶液中的相對溶解度約 40-50%。將 DWSP 肝肽粉與卵白、卵黃、鮮乳、雞胸肉、豬里肌肉、駝鳥胸肉、牛里肌肉與 (liver peptide powder) 等不同的動物性蛋白質對外源性非血色質鐵利用性之差異作比較時，藉額外添加三氯化鐵後進行體外消化試驗，再以可透析二價鐵(DFe^{+2})及可透析總鐵($TDFe^{+2,+3}$)作為評估之標準。結果顯示，肝肽粉具有最佳之鐵質利用率。當取硫酸亞鐵($FeSO_4$)、氯化鐵($FeCl_3$)與兩者各半混合鐵劑(Mix)之強化全脂(3.5%含脂率；RWM)、低脂(1.5%含脂率；RLM)與脫脂(0.3%含脂率；RSM)還原乳中，添加 WSP+SSP 肝粉或 DWSP+DSSP 肝肽粉進行體外消化試驗。裂區設計之統計結果顯示，針對三種鐵劑而言，皆以硫酸亞鐵($FeSO_4$)表現最佳，混合鐵劑(Mix)次之，而氯化鐵($FeCl_3$)則最低。於不同脂肪含量之影響而言，則顯示脂肪需高達 3.5%之含量才具有促進各鐵劑生物可利用率之效果，並以 DWSP+DSSP 肝肽粉具有最佳之鐵質利用率。

關鍵語：生物活性肽、鐵質生物可利用率、豬肝

前言

鐵質在人體營養上為一維持正常生理功能所必須的微量元素，但因鐵質的吸收率低下，時至今日，在開發中及已開發國家分別有近 40~50% 及約 10~15% 左右的人口受到潛在性鐵質缺乏問題影響，並造成種種代謝與營養上的疾病。鐵為廣泛存在於地球上的一種元素，一般食物中含鐵者眾多，如動物性的肉類、血液、內臟，植物性的蔬菜、豆類等等。惟雖然含鐵之食物繁多，但無論是在國內外各個國家都有著頻繁的缺鐵症狀存在，其中又以青春期的少女及成年婦女發生比例最高(Tapiero *et al.*, 2001；林，1991；蕭，2001)。

豬肝臟本為一營養優良的高蛋白質食品，亦常為消費者購買作為食補或鐵質補充時的優先選擇。然則，近年來由於亞洲人對豬隻內臟藥物殘留問題造成健

康與衛生安全上的疑慮，以致豬肝臟直到消費形式逐年的降低，加上肝臟入料於食品配方時亦產生特殊腥味與暗紅色，令多數消費者望之卻步，不僅使其銷售低落，更甚者還造成處理上的困難(大成，2006)。隨著豬隻肝臟消費量之逐年降低，若能將此一量多(1.5kg 肝/頭豬/100kg)且極富營養價值之內臟組織(粗蛋白質 72.8%，Dry basis)加以淨化除去異物，並將其色、味淡化成兼具生物活性之高蛋白易溶性粉末產品。

本研究之目的在將豬肝臟經冷凍乾燥及酵素水解處理後，使其成為溶解度高、無藥物殘留之蛋白肽豬肝臟粉末，並擬以仿人體消化道之試管內(*in vitro*)消化試驗，比較各萃取部分對具備使無機三價鐵(Fe(III))離子還原成吸收與利用效率高之二價鐵(Fe(II))離子的能力，進而提高人體對食品中非血色質鐵質之利用性。

材料與方法

一、實驗肝臟材料

(一) 豬肝臟：購自市售之新鮮豬肝臟(FL)，除去筋、膜結締組織，置於 4°C 備用。

(二) 供試酵素、鐵劑及指示劑

1、胃蛋白酵素(pepsin)：購自 Merck 公司(EC 3.4.23.1)。

2、胰蛋白酵素：(trypsin)：購自 Sigma 公司(P-1750)。

3、二氯化鐵(ferrous chloride)及三氯化鐵(ferric chloride)：分別購自片山試藥株式會社。

4、亞鐵離子呈色指示劑：鄰-啡啉 1,10-phenantroline:購自林純藥工業株式會社 (NO. JBL07083)，以 0.1N HCl 稀釋 100mL，至於暗冷處保存備用。

(三) 豬肝粉末之製備：依沼田等 (1993) 之方法修飾敘述如下。取適量豬肝，修整細切後加入 5 倍 (v/v) 冰蒸餾水後攪打細碎 15 分鐘，取一部分直接冷凍乾燥即肝粉(DFL)。另一部分再於 5,000xg，離心 15 分鐘。濾出沈澱物加 5 倍 (v/v) 冰蒸餾水再重複離心及過濾步驟 2 次。收集各次所得之上清液以活性碳過濾後，即得水溶性溶液部分。收集沈澱部分加入 5 倍 (v/v) 0.6M NaCl 溶液重覆以 5,000 xg 離心 15 分鐘 2 次，收集得上清液以活性碳過濾後，即為鹽溶性溶液部分。另外收集所得之沈澱物即為不溶性部分。分別將上述所得樣品冷凍乾燥並磨粉後即分別製得水溶性肝粉(WSP)、鹽溶性肝粉(SSP)及不溶性肝粉(ISP)。

(四) 豬肝粉之水解：依周 (1987) 之方法修飾如下。取肝粉(DFL) 20g，以 1 L 蒸餾水懸溶，然後加入胃蛋白酵素 1:100 (酵素/基質; W/W)，以 0.1N HCl 調整至 pH 2.0，在 37°C 下水浴 2 小時進行水解。續以 0.1N NaOH 調整 pH 至 7.0，加入胰蛋白酵素 1:50 (酵素/基質; W/W)，在 37°C 下水浴 30 分鐘。水解終了即加熱至 80°C 使酵素失活。分解液以 12,000xg 離心 10 分鐘後分別濾出上清液，經冷凍乾燥即得酵素水解水溶性肝肽粉(DWSP)然後再依方法(三)萃製酵素水解鹽溶性肝肽粉(DSSP)與酵素水解不溶性肝肽粉(DISP)二部分。

二、試管內消化試驗材料

(一)三價鐵溶液：三氯化鐵($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)係購自片山試藥株式會社，溶以 0.01 N HCl 並定濃度至所需之 0-35 ppm 與 500 ppm。

(二)胃蛋白酶(pepsin)：4 g 的胃蛋白酶(Merck, EC 3.4.23.1)先溶於 50 mL 之 0.01N HCl 後再以 0.1N HCl 定容至 100 mL。

(三)胰泌素/膽鹽混合物(porcine pancreatin-bile mixture)：0.5 g 的胰泌素(Sigma P-1750)和 3.0 g 的膽鹽(Sigma B-8756)先溶於 125 mL 之 0.01 N 碳酸氫鈉(sodium hydrocarbonate)中，再以 0.1 N 碳酸氫鈉定容至 250 mL。

(四)0.15N PIPES buffer：PIPES (piperazine-*N,N'*-bis-2-ethane-sulfonic acid) 粉末(USB 20428; $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}_2$, FW=346.33)溶於去離子水中至 0.15 N，並以 1 N HCl 調整 pH 至 6.3。

(五)0.3N HEPES buffer：HEPES(*N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethane-sulfonic acid)粉末(Sigma H7006, FW=206.3)溶於去離子水中至 0.3 N，再以 1 N HCl 調整 pH 至 9.9。

(六)蛋白質沉澱及鐵還原溶液(reducing protein precipitant solution)：100 g 的三氯醋酸(trichloroacetic acid; TCA, FW=163.39; 購自片山試藥株式會社)與 50 g 的羥胺鹽酸鹽(hydroxylamine mono-hydrochloride, FW=69.49; 購自石津試藥株式會社)溶於少量去離子水中，再加入 100 mL 的 1 N HCl，最後以去離子水定容至 1 L。

(七)蛋白質沉澱溶液(non-reducing protein precipitant solution)：與蛋白沉澱還原溶液相同，但不加入羥胺鹽酸鹽。

(八)亞鐵呈色劑：取 0.25 g 鄰-啡啉(1,10-phenanthroline, FW=198.22; 購自林純藥工業株式會社)以 0.1 N HCl 稀釋至 100 mL，於暗冷處保存。

(九)透析膜(dialysis tubing)：選用通透性在分子量 6,000-8,000 範圍內之透析膜(Cellu. Sep T2 8030-40, 購自 Membrane Filtration Products, Inc.; MFPI)。

(十)動物性蛋白質樣品：包括卵白與卵黃係自市售石安牧場之有機領鮮蛋分離，無調整成分之鮮乳(光泉)，雞胸肉、豬里肌肉、駝鳥胸肉係購自興農生鮮超市，國產牛里肌肉購自傳統市場，去筋膜分切後，冷凍備用，肝肽粉係萃自豬肝之酵素水解水溶性肝粉(DWSP)及酵素水解鹽溶性肝粉(DSSP)。

三、供試之鐵劑

(一)二價鐵劑：硫酸亞鐵($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sigma F7002, Steinheim, Germany)。

(二)三價鐵劑：氯化鐵(FeCl_3 ; 片山試藥株式會社，日本)。

(三)混合鐵劑：硫酸亞鐵($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sigma F7002, Steinheim, Germany) 與氯化鐵(FeCl_3 ; 片山試藥株式會社, 日本)各半混合。

四、供試之乳粉：味全即溶全脂乳粉、味全即溶低脂乳粉與安佳即溶脫脂乳粉皆購自台中市西屯區愛買量販店，其水分含量均為5%以下。

五、實驗方法

(一)肝粉之相對溶解度

依周 (1987) 之方法經修飾如下。以 HCl 或 NaOH 配製 pH 2.0~pH 10.0 之溶液 100ml, 然後分別加入肝粉樣品各 0.5g, 充分攪拌 30 分鐘, 於室溫下以 3,000 \times g 離心 30 分鐘, 再以雙脲法 (Biuret method) 測定上清液蛋白質濃度。相對溶解度 (relative solubility) 係以 WSP 在 pH3.0 之蛋白質溶解度為 100%, 再與其他樣品於相同 pH 之結果比較即得。

(二)鐵之分析

入透析袋之透析物與透析袋外之殘留物中之鐵濃度依 Kane and Miller(1984)與 Kapsokefalou and Miller (1991)之方法經修飾後敘述其步驟如下：將透析袋內之總鐵($\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$)取 2.0 mL 透析物, 加入 1.0 mL 蛋白質沉澱及鐵還原溶液, 將 Fe^{3+} 還原為 Fe^{2+} 後與原有之 Fe^{2+} 同時被偵測(可透析總鐵(TDFe($\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$)))。每一透析物僅加 1.0 mL 蛋白質沉澱溶液即為透析袋內之 Fe^{2+} (可透析二價鐵(DFe(Fe^{2+})))。將透析袋外之殘留物各取 2.0 mL, 加入 1.0 mL 蛋白質沉澱溶液, 其被測得之鐵即為已還原而不可透析之 Fe^{2+} (未透析鐵(NDFe(Fe^{2+})))。以上三者分別於室溫下放置隔夜, 並以 2,575 \times g 離心 10 min 後, 取 1 mL 上清液, 加入 2.0 mL HEPES buffer 與 0.25 mL 呈色劑, 以分光光度儀(Jasco V-530 spectrophotometer, 日本)510 nm 檢測其吸光值(Absorbance; Abs), 然後分別計算四類鐵離子(D、DN、R、DN+R)各佔添加總三價鐵(100%)之百分比, 以代表樣品對鐵之透析與還原能力。

(三)試驗樣品之調製

1. 本實驗之對照組為上述試驗材料 2、3 與 4 等三種鐵劑不添加材料 13 與 14, 並以去離子水定容還原後, 作為各鐵劑原始含量之測定值。

2. 本實驗之處理組為上述試驗材料之三種不同脂肪含量乳粉分別添加三種供試鐵劑及肝粉 A(水溶性肝粉(WSP)+鹽溶性肝粉(SSP))、肝肽粉 B(水解水溶性肝肽粉(DWSP)+水解鹽溶性肝肽粉(DSSP))。

3. 取 0.6283 g 氯化鐵溶於去離子水中再定容至 35 ml 成為氯化鐵水溶液。

4. 取 15.461 g 味全全脂乳粉後加入 0.0923 g 之硫酸亞鐵, 再加入少許去離子水, 待混合一段時間後, 加入 80 ml 去離子水並充分攪拌使其達完全溶解, 以 1 N HCl 將 pH 值調整至 2.0, 最後以去離子水定容至 125 ml, 成為含鐵量、總固形物及含脂率分別為 150 ppm、11.75%及 3.5%之硫酸亞鐵強化全脂還原乳。

5. 取 15.461 g 味全全脂乳粉加入少許去離子水, 待混合一段時間後, 加入 5 ml 調配好之氯化鐵溶液, 再加入 80 ml 去離子水並充分攪拌使其達完全溶解,

以 1 N HCl 將 pH 值調整至 2.0，最後以去離子水定容至 125 ml，成為含鐵量、總固形物及含脂率分別為 150 ppm、11.75% 及 3.5% 之氯化鐵強化全脂還原乳。

6. 取 15.461 g 味全全脂乳粉加入 0.04615 g 硫酸亞鐵與 5 ml 對半稀釋之氯化鐵溶液再加入少許去離子水，待混合一段時間後，加入 80 ml 去離子水並充分攪拌使其達完全溶解，以 1 N HCl 將 pH 值調整至 2.0，最後以去離子水定容至 125 ml，成為含鐵量、總固形物及含脂率分別為 150 ppm、11.75% 及 3.5% 之硫酸亞鐵與氯化鐵混合強化全脂還原乳。

7. 另取 12.829 g 味全低脂乳粉及 11.25 g 安佳脫脂乳粉，依方法(d)、(e)、(f)調製成含鐵量、總固形物及含脂率分別為 150 ppm、9.75% 及 1.5% 之低脂鐵強化還原乳與分別為 150 ppm、8.55% 及 0.3% 之脫脂鐵強化還原乳。

六、統計分析

每一種樣品重複 6 次，每次分析再採 3 重覆，並以 Statistical analysis system (SAS)⁽²⁰⁾ 統計套裝軟體分析。本次試驗設計為完全逢機試驗(Completely randomized design; CRD)，將實驗數據以一般線性模式(GLM procedure)進行變方分析與鄧肯氏新多變域分析法(Duncan's new multiple range test)，比較各組鐵劑對不同乳脂肪含量處理組平均值之差異性，再續以裂區實驗設計(Split plot design)⁽²¹⁾ 的統計模式，分別探討不同鐵劑、不同脂肪含量乳粉及不同肝粉樣品對於鐵質生物可利用率分析項目影響之程度。

結果與討論

一、肝臟一般成分分析

新鮮肝臟(FL)、乾燥後之肝粉(DFL)、水溶性肝粉(WSP)、鹽溶性肝粉(SSP)與不溶性肝粉(ISP)等樣品之一般成分分析結果顯示(表 1)，水分方面，以新鮮肝臟(FL) 71.68±1.98% 為最高，其它四者乾燥樣品間則差異不顯著(P>0.05)。灰分方面，以乾燥後肝粉(DFL) 5.18±0.33% 為最高，不溶性肝粉(ISP)次之並與其他樣品比較達顯著差異(P<0.05)。粗脂肪方面，以乾燥後肝粉(DFL)為最高，不溶性肝粉(ISP)次之，兩者間差異不顯著(P>0.05)。粗蛋白質方面則以水溶性肝粉(WSP)與鹽溶性肝粉(SSP)含量最高。經酵素水解之水溶性肝粉(DWSP)、鹽溶性肝粉(DSSP)與不溶性肝粉(DISP)之一般成分分析如表 2 所示。水溶性肝粉(WSP)、鹽溶性肝粉(SSP)、經酵素水解之水溶性肝粉(DWSP)及鹽溶性肝粉(DSSP)等呈淡黃、無異味之粉狀物，其他則色澤較微紅褐色，並帶有脂肪風味。

表 1、肝臟之一般成份分析

Table 1. Proximate analysis from different fraction of liver

樣品 Sample	水分 Moisture	灰分 Ash	粗脂肪 Crude fat	粗蛋白質 Crude protein
		%		
FL ¹	71.68±1.98 ^a	1.52±0.12 ^c	4.10±0.22 ^b	21.36±1.22 ^c
DFL ²	1.46±0.12 ^b	5.18±0.33 ^a	19.23±0.96 ^a	73.83±2.36 ^b
WSP ³	1.26±0.08 ^b	1.12±0.20 ^c	0.23±0.08 ^c	94.32±1.43 ^a
SSP ⁴	1.15±0.06 ^b	1.02±0.12 ^c	0.68±0.07 ^d	93.55±3.12 ^a
ISP ⁵	1.18±0.05 ^b	3.17±0.52 ^b	17.86±1.98 ^a	75.49±2.54 ^b

1: 新鮮肝臟(Fresh liver; FL)。

2: 經乾燥處理之肝粉Dry fresh liver.

3: 水溶性部分肝粉Water-soluble fraction from porcine liver。

4: 鹽溶性部分肝粉Salt-soluble fraction from porcine liver。

5: 不溶性部分肝粉Insoluble fraction from porcine liver.

6: a-d: 同行中不同字母表示有顯著差異(P<0.05)。

表 2、經酵素水解之肝臟一般組成分

Table 2. Proximate analysis from different fraction of liver digested with pepsin and trypsin

樣品 Sample	水分 Moisture	灰分 Ash	粗脂肪 Crude fat	粗蛋白質 Crude protein
		%		
DWSP ¹	1.22±0.09 ^a	1.65±0.22 ^b	0.29±0.13 ^c	94.12±2.45 ^a
DSSP ²	1.25±0.06 ^a	1.52±0.20 ^b	0.59±0.19 ^b	92.95±1.86 ^a
DISP ³	1.22 ±0.03 ^a	3.98±0.29 ^a	15.87±1.06 ^a	77.40±2.02 ^c

1: 經酵素處理之水溶性部分肝粉Water-soluble fraction from porcine liver digested with pepsin and trypsin。

2: 經酵素處理之鹽溶性部分肝粉Salt-soluble fraction from porcine liver digested with pepsin and trypsin。

3: 經酵素處理之不溶性肝粉Insoluble fraction from porcine liver digested with pepsin and trypsin。

a-c: 同行中不同字母表示有顯著差異(P<0.05)。

二、肝臟各樣品收率之比較

未經酵素水解肝臟各樣品之收率如以新鮮肝臟(FL)重量為 100g，則乾燥肝粉(DFL)收率為 28.24%最高，不溶性肝粉(ISP) 15.08%次之，鹽溶性肝粉(SSP) 為 7.96%，水溶性肝粉(WSP)收率為 4.62%最低(表 3)。經酵素水解肝臟各部分之收率如以新鮮肝臟(FL)重量為 100g，經酵素水解之不溶性肝粉(DISP)、鹽溶性肝粉(DSSP)及水溶性肝粉(DWSP)之收率分別為 11.01、10.66 及 8.84%，其中僅經酵素水解乾燥肝粉(DDFL)之收率約 30.65%與吳等(1998)結果相似。

比較經酵素水解作用前後收率結果之差異發現，水解後之水溶性肝粉 (DWSP) 收率增加約一倍，而鹽溶性部分 (DSSP) 收率增加約 34%，水解後之不溶性肝粉 (DISP) 收率則降低約 27%(表 4)。造成此等增減之原因可能係經酵素水解後蛋白質分子變小，而致使其在水與鹽溶液中之溶解度增加，此顯示經酵素水解後確可有效增加水溶性與鹽溶性肝粉 (DWSP, DSPF) 兩部分之收率。

表 3、肝臟各區劃之收率

Table 3. The dry weight and percentage of different fraction from liver

樣品 sample	重量 (g)	收率 ⁶ (%)	收率 ⁷ (%)
FL ¹	100.00	—	—
DFL ²	28.24	28.24	—
WSP ³	4.62	4.62	16.35
SSP ⁴	7.96	7.96	28.19
ISP ⁵	15.08	15.08	53.40

¹⁻⁵: 敘述同表 1。Same as table 1.

⁶: 與新鮮肝臟重量比較之各部分肝粉百分率。The weight of percentage compare with fresh liver.

⁷: 與乾燥後全肝粉重量比較之各部分肝粉百分率。The weight of percentage compare with dry whole fresh liver.

表 4、經酵素水解之肝臟各區劃之收率

Table 4. The dry weight and percentage of different fraction from liver digested with pepsin and trypsin

樣品 sample	重量 (g)	收率 ⁵ (%)	收率 ⁶ (%)
FL ¹	100.00	—	—
DWSP ²	8.84	8.84	28.84
DSSP ³	10.66	10.66	34.78
DISP ⁴	11.01	11.01	35.92

¹⁻⁶: 敘述同表 2。

¹⁻⁶: Same as table 2.

三、不同 pH 對各樣品於水中溶解度之影響

如將水溶性肝粉 (WSP) 在 pH 3.0 時之最佳溶解度訂為 100%，經換算後鹽溶性肝粉 (SSP) 與不溶性肝粉 (ISP) 之相對溶解度如圖 1 所示。水溶性肝粉 (WSP) 在 pH 4.0~5.0 其溶解度低於 10%，pH 6.0 時略低於 80%，其餘皆高於 80%；鹽溶性肝粉 (SSP) 在 pH 4.0~5.0 其相對溶解度低於 10%，並較水溶性肝粉 (WSP) 低，pH 7.0 時略低於 80%，其餘皆高於 80%；不溶性肝粉 (ISP) 其相對溶解度皆低於 50%，且在 pH 3.0~9.0 間更低於 10%；故水溶性肝粉 (WPF) 與鹽溶性肝粉 (SPF) 如應用在一般食品之 pH 6.0~8.0 範圍時，其相對溶解度均能維持在 80% 左右。圖 2 為將水溶性肝粉 (WPF) 在 pH 3.0 時溶解度訂為 100%，經酵素水解之水溶性肝粉 (DWSP)、鹽溶性肝粉 (DSSP) 與不溶性肝粉 (DISP) 三者在不同 pH 值下相對溶解度。經酵素水解之水溶性肝粉 (DWSP) 除在 pH 4.0~5.0 其相對溶解度約在 60% 外，其餘皆高於 120%，並以在 pH 3.0 之 147.25% 為最高；酵素水解之鹽溶性肝粉 (DSSP) 在 pH 4.0~5.0 其相對溶解度約在 50% 左右，其餘皆介於 110-135%，且略低於水溶性肝粉 (DWSP) 於相同狀況下之溶解度；經酵素水解之不溶性肝粉 (DISP) 其相對溶解度皆低於 90%，且在 pH 4.0~7.0 間低於 50%。經酵素水解後各部分肝粉其相對溶解度均較未水解前提高約 40-50%。

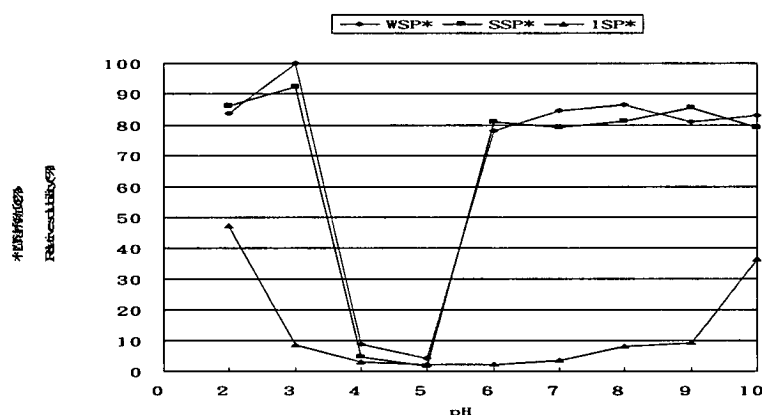


圖 1 - WSP、SSP 與 ISP 在不同 pH 下之相對溶解度。
 Fig. 1. The relative solubility of WSP, SSP and ISP under different pH values.
 * The same as Table 1.
 ** The solubility of WSP under pH 3.0 was expressed as 100%.

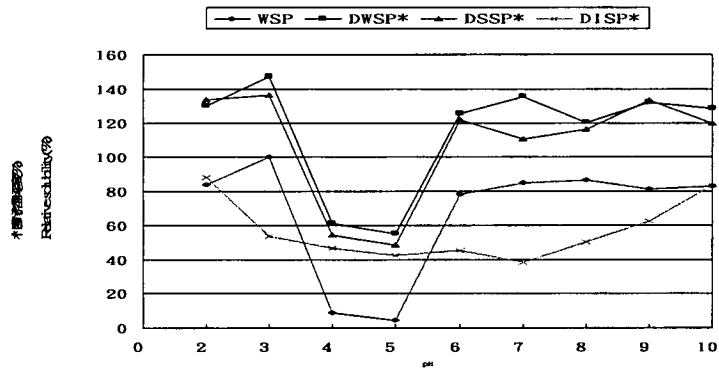


圖 2、WSP、DWSP、DSSP與DISP於不同pH下之相對溶解度。
 Fig. 2. The relative solubility of WSP, DWSP, DSSP and DISP under different pH values.

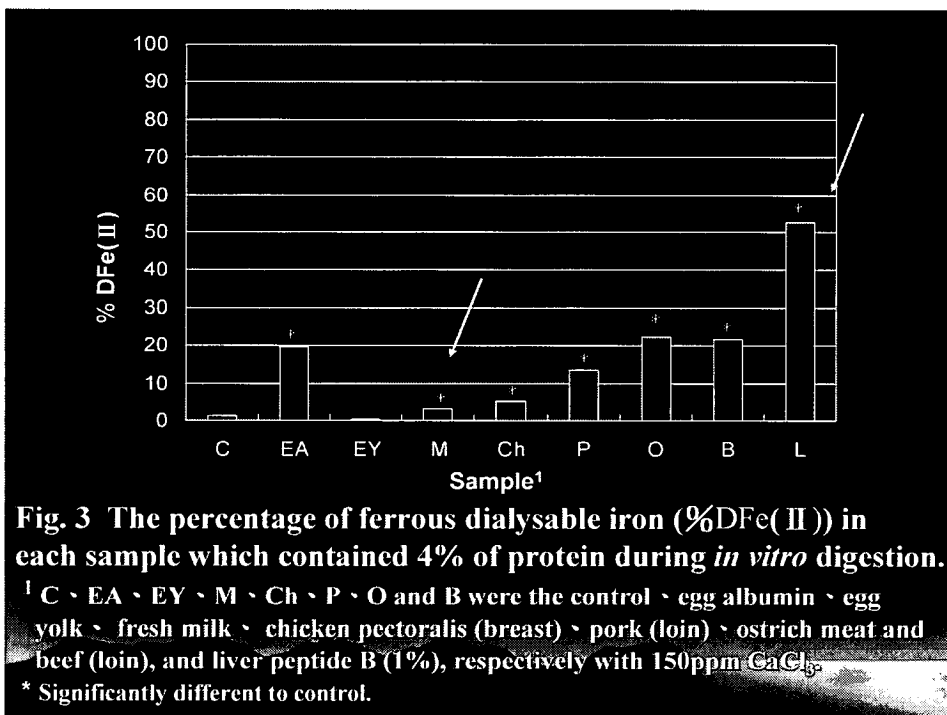
* The same as Table 2.

** The solubility of WSP under pH 3.0 was expressed as 100%.

二、等蛋白質含量試驗

圖 3 為等蛋白質含量之樣品經體外消化後之可透析二價鐵所佔之比例(%DFe²⁺)。除卵黃外(P>0.05)其他各組均與控制組達顯著差異，肝肽粉在可透析二價鐵數值中亦為表現最佳者為第一群，卵白、鮫鳥肉與牛肉效果次之為第二群，豬肉效果再次之為第三，鮮乳與雞肉效果較低為第四群，四群間差異均達顯著水準(P < 0.05)，此結果與定量試樣試驗相似。與總可透析鐵比較之下可發現鮮乳之數值下降比例最大，可透析二價鐵比例僅佔總可透析鐵量的 12.86%，此結果亦與定量試樣之結果類似且數值較 19%為更低。

圖 4 為等蛋白質含量之樣品經體外消化後之可透析總鐵所佔之比例(%TDFe(Fe²⁺ + Fe³⁺))。在可透析總鐵量中，各組均與控制組達顯著差異，肝肽粉效果最佳為第一群，卵白、鮮乳、鮫鳥肉及牛肉效果亦佳為第二群，豬肉、雞肉較低為第三群，卵黃有顯著之負差異，表示其透析效果不佳且可能還有抑制效果為第四群，四群間差異均達顯著水準(P < 0.05)。在定量蛋白質下，肉類中仍以雞肉表現最差。



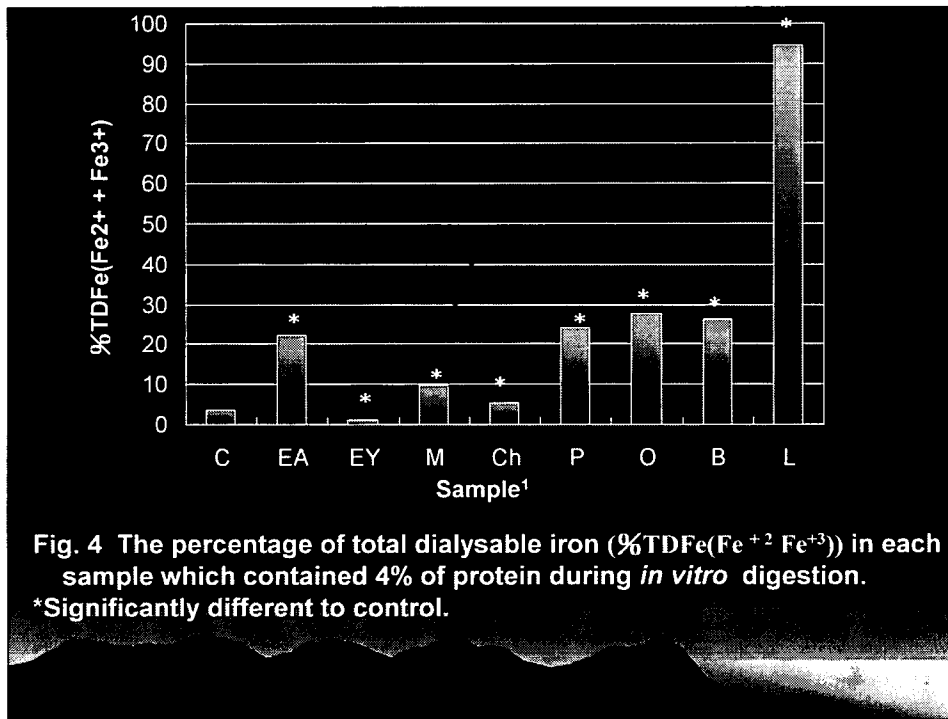


Fig. 4 The percentage of total dialysable iron (%TDFe(Fe²⁺ + Fe³⁺)) in each sample which contained 4% of protein during *in vitro* digestion.
*Significantly different to control.

三、不同鐵劑、脂肪含量與肝粉對還原乳中鐵質生物可利用率之影響

裂區設計之優點可將複合多因子產生大量實驗數據之影響簡化為單一因子之影響。本實驗之設計為分別針對 DFe(II)、TDFe 與 NDFe(II) 值探討不同鐵劑、不同脂肪含量與不同維生素強化因子對還原乳中上述鐵質生物可利用率評估指標影響程度之大小，其中將最欲了解其影響程度的鐵劑因子擺於主區，不同脂肪含量與不同肝粉樣品則置於副區。

圖 5 為不同鐵劑經體外消化後對鐵質生物可利用率指標 DFe(II)、TDFe 與 NDFe(II) 之影響。由圖中可發現針對三項鐵質生物可利用率指標 DFe(II)、TDFe 與 NDFe(II) 而言，亦皆以硫酸亞鐵(FeSO₄)表現最佳，混和鐵劑(Mix) 次之，而氯化鐵(FeCl₃)則皆最低，此結果與實驗一中純鐵劑之實驗結果相吻合，也符合本實驗室先前所做出硫酸亞鐵(FeSO₄)於還原乳體外消化實驗中具最佳鐵質生物可利用率之實驗結果^(12, 19 24)。

圖 6 為不同脂肪含量經體外消化實驗後對鐵質生物可利用率指標 DFe(II)、TDFe 與 NDFe(II) 之影響。由圖可發現針對可透析二價鐵 (DFe(II)) 與未透析二價鐵 (NDFe(II)) 數值之影響而言，以全脂還原乳(RWM)最高，低脂還原乳(RLM)與脫脂還原乳(RSM)次之。對可透析總鐵 (TDFe) 數值之影響，則以全脂還原乳(RWM)表現最佳，脫脂還原乳(RSM)次之，而低脂還原乳(RLM)則為最低。這表示較高的脂肪含量似乎有助於鐵劑維持二價鐵的型態，而二價鐵型態也最容易被人體所吸收，惟對於促進全部鐵質透析能力而言，脂肪含量可能需高達一定含量至 3.5% 才會有較好的效果，否則倒不如選用脫脂還原乳 (RSM)。

圖 7 為不同肝粉樣品經體外消化實驗後對鐵質生物可利用率指標 DFe(II)、TDFe 與 NDFe(II) 之影響。綜合不同類型鐵劑生物可利用率評估指標項目之結果，三種肝粉強化因子中以肝粉 A 與肝肽粉 B 於各項評估指標中的效果最好，尤以肝肽粉具顯著促進鐵劑生物可利用率之效應，應有利於人體之吸收利用。

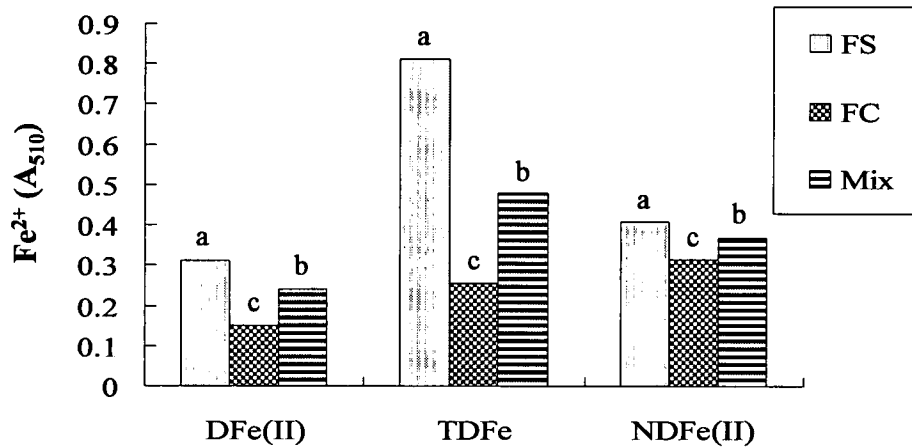


Fig. 5 The effect of different iron compounds on iron compounds bioavailability indexes of DFe(II), TDFe, and NDFe(II) during *in vitro* digestion.

FS, FC, and Mix were the ferrous sulfate, ferric chloride, and 1/2 ferrous sulfate with 1/2 ferric chloride mixed irons, respectively.

^{a-c} Mean in each data region by different letters are significantly different (P < 0.05).

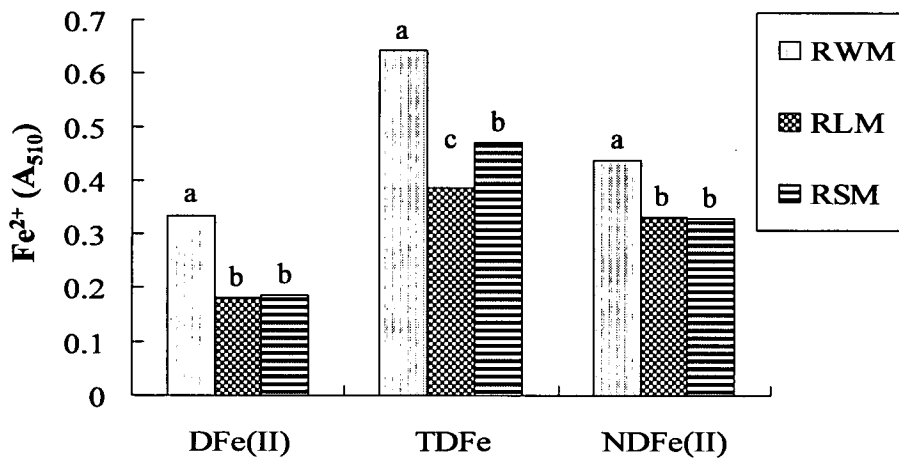


Fig. 6 The effect of different fat levels reconstituted milk on iron compound bioavailability indexes of DFe(II), TDFe, and NDFe(II) during *in vitro* digestion.

RWM, RLM, and RSM mean reconstituted whole milk, reconstituted low-fat milk, and reconstituted skim milk, respectively.

^{a-c} Mean in each data region by different letters are significantly different (P < 0.05).

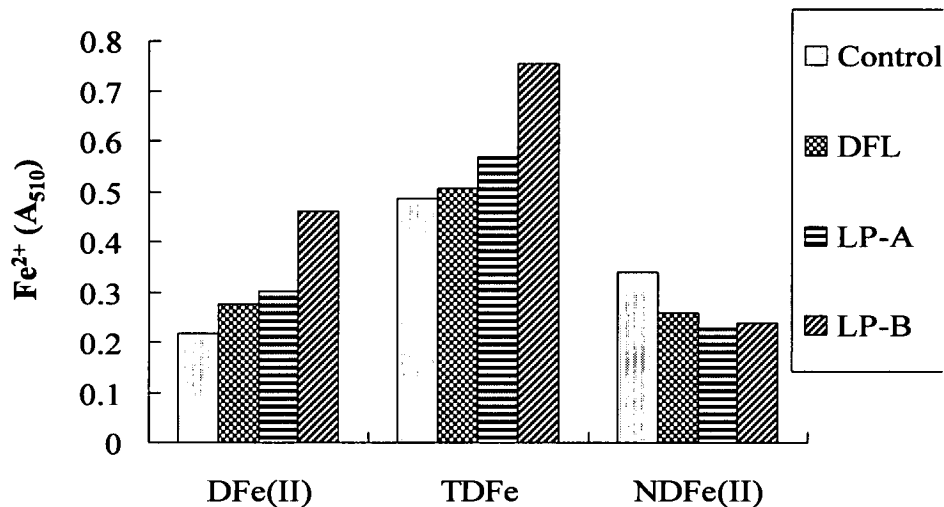


Fig. 7 The effect of different liver peptide on iron compound bioavailability indexes of DFe(II), TDFe, and NDFe(II) during *in vitro* digestion.

Control mean only different iron fortified reconstituted milk without liver product.

結論

綜合上述結果，自豬肝臟製備之水、鹽溶性肝粉及酵素水解之水、鹽溶性肝肽粉有最佳溶解度，除含高量蛋白質與具備良好對非血色質 Fe (III) 之還原能力外，如以 0.5-1.0% 添加於以硫酸亞鐵及氯化鐵各半 (150ppm) 強化之全脂乳粉還原乳時，可具有良好之鐵生物可利用率，且不影響乳粉之風味與色澤。

參考文獻

1. 林仁混。1991。生化學通論，第 263-274 頁。聯經出版社，台北市。
2. 蕭寧馨。2001。國人鐵營養狀況之研究。台大校友雙月刊 12:12-13。
3. 趙繼嫻、葉玉霜、林東茂、周繼發：動物性蛋白質對非血色質鐵利用效率之比較。中畜會誌，34: 107-116 (2005)。
4. 林東茂、李丹昂、葉玉霜、閻立平、周繼發：鐵劑之篩選及其於鐵強化乳粉中體外生物可利用性之評估。台灣農業化學與食品科學，45: 155-162 (2007)。
5. 沼田正寬、副田理美、中村豐郎。1992。豚血液由來へム鉄濃縮物のラットにおける生体利用性。日畜會報 63:1195-1202。
6. 沼田正寬、副田理美、近藤良房、中村豐郎。1993。牛肝臟および肝消化物の腸内 pH における非へム鉄の溶解性に及ぼす影響。日畜會報 64:645-651。
7. 大成 清。2006。以豬隻副產物做為飼料之應用。畜産の研究。50(7):797-802。
8. Berner, L. A. and D. D. Miller. 1985. Effects of dietary proteins on iron bioavailability : a review. Food Chem. 18:47-69.
9. Carpenter, C. E. and A. W. Mahoney. 1992. Contribution of heme and

- nonheme iron to human nutrition. Food Sci. and Nutr. 31(4):333-367.
10. Johnson, R. L. 1997. Gastrointestinal Physiology, 5th ed., pp.143-144. Mosby-Year Book, Inc. New York.
 11. Sharp P. and S. K. Srail. 2007. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. World J. Gastroenterol, 13(35): 4716-4724
 12. Tapiero, H., L. Gate and K. D. Tew. 2001. Iron: deficiencies and requirements. Bio. Pharm. 55:324-332.

The Extraction of Bioactive Peptide from Swine Liver as an Accelerant of Iron Bioavailability in Foods

ABSTRACT

The fresh porcine liver samples (FL) were bought from traditional market and dried to fresh powder (DFL). The DFL was extracted by distilled water followed by salt solution and dried to get water-soluble powder (WSP), salt-soluble powder (SSP) and insoluble powder (ISP), respectively. The DFL was also digested by enzyme to get each fraction of digested powder samples as DWSP, DSSP and DISP, respectively.

All dried powder were analyzed the general composition, the recovery ratio and the relative solubility in different pH-value. In result, FL had the highest moisture content ($P < 0.05$). Dry fresh liver (DFL) had the highest ash and crude fat content ($P < 0.05$). WSP and DWSP were the highest in crude protein ($P < 0.05$). From 100 g of FL, 28.24 g, 4.62 g, 7.96 g and 15.08 g of DFL, WSP, SSP and ISP could be extracted, respectively. The recovery ratio of DWSP and DSSP were increased and DISP was decreased significantly ($P < 0.05$). When compared the relative solubility of each sample based on the solubility of WSP at pH 3.0, all samples had lowest solubility on pH 4.0-5.0. Each fraction of porcine liver powder treated with enzyme could raise the relative solubility about 40-50% than that without enzyme digested. Ferric chloride was added to egg albumin, egg yolk, fresh milk, chicken pectoral, pork (loin), ostrich pectoral, beef (loin) and liver peptide powder (DWSP+DSSP) in same protein content to undergo *in vitro* digestion. Iron bioavailability was compared by estimating dialyzable ferrous iron (TDFe⁺²) and dialyzable total iron (TDFe^{+2,+3}), respectively. The results showed that liver peptide powder had the best iron bioavailability in the same protein sample. When liver

protein powder (WSP+SSP), liverpeptide (DWSP+DSSP) were added in whole (3.5% fat content; RWM), low-fat (1.5% fat content; RLM) and skim (0.3% fat content; RSM) reconstituted milk fortified with ferrous sulfate (FeSO_4), ferric chloride (FeCl_3) and of 1/2 of each (Mix), respectively. Through the *in vitro* digestibility test, the results of split-plot statistic design showed the bioavailability of ferrous sulfate (FeSO_4) was the highest among different irons, and then the mix iron (Mix); the ferric chloride (FeCl_3) had the lowest bioavailability. For different fat levels, the results denoted that the fat levels would not enhance the iron bioavailability unless the amount of fat reached 3.5% level.

Key words : Bioactive Peptide · Iron Bioavailability · Porcine Live