

東海大學畜產與生物科技學系
Department of Animal Science and Biotechnology
Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：周繼發博士
Advisor：Chi-Fa Chow, Ph. D.

胃腸蛋白酶作用對乳脂肪球體外消化效率
之影響

**Effect of Gastrointestinal Protease on
the *in vitro* Digestion of Milk Fat Globules**

研究生：鄒明學 撰
Graduate Student：Ming-Hsueh Zou

中華民國一百零一年十月

October, 2012

胃腸蛋白酶作用對乳脂肪球體外消化效率
之影響

Effect of Gastrointestinal Protease on
the *in vitro* Digestion of Milk Fat Globules

碩 士 論 文

Master Thesis

鄒明學

Ming-Hsueh Zou

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

中華民國一百零一年十月

October, 2012

誌謝

本論文的完成，首先由衷感謝指導教授 周繼發 博士的悉心教導，令學生更深一層地豐富了專業領域的知識與技術，周老師細心且不厭其煩的指導下，讓學生學習到如何尋找問題的根本，而老師對於學術與教學的嚴謹與專注，一直是學生的目標，在此至上最深的敬意與感謝。文稿初成，復蒙口試委員 曾再富 博士、王家宇 博士以及 何若瑄 博士撥冗審閱，並於口試期間提供精闢之見解與寶貴之建議，使論文更加充實且完備，特此謹致謝忱。

在學期間感謝系上所有師長在各學業領域上之教導。感謝研究室依凝學姐、宜婷學姐、姿穎、笙合與凱婷於課業與實驗上的幫助；感謝同學欣佩、子恩、成志、婕妤及尹珈在課業研究上的互相砥礪，與生活上的諸多幫助，因為有你們的陪伴，使我的研究生生活快樂充實且充滿歡笑。

特別感謝我敬愛的父母、家人以及女友子芳，你們的支持、關懷與付出，讓我得以順利完成碩士學位，明學永遠銘記於心。

鄒明學 謹誌

東海大學畜產與生物科技學系

中華民國一零一年十月

目次

頁次

I、中文摘要.....	1
II、前言.....	2
III、文獻檢討.....	3
IV、材料與方法.....	28
V、結果與討論.....	35
VI、結論.....	54
VII、參考文獻.....	55
VIII、英文摘要.....	59
IX、作者小傳.....	60

表次

頁次

表 1. 牛乳脂質之組成.....	5
表 2. 乳脂肪球膜之組成份.....	9
表 3. 乳脂肪球膜蛋白質之組成.....	10

圖次

頁次

圖 1. 乳汁成分之自然形態.....	4
圖 2. 乳脂肪球膜之結構.....	7
圖 3. 脂肪球膜蛋白 BTN、ADPH 及 XOR 免疫染色圖.....	11
圖 4. 乳脂肪球自細胞內產生、發育及分泌之過程.....	13
圖 5. 親脂蛋白做為接合器之乳脂肪分泌模式.....	14
圖 6. 乳腺分泌乳脂肪球過程之顯微鏡照片.....	15
圖 7. 牛乳經不同處理後之乳脂肪球粒徑與表面積分布圖.....	17
圖 8. 乳脂肪球膜於均質前、後結構之比較.....	19
圖 9. 均質乳脂肪球之掃描式電子顯微鏡照圖.....	20
圖 10. 模擬胃液中乳脂肪球之共軛焦距電子顯微鏡圖.....	24
圖 11. 生乳與重組乳之脂肪球經胰解脂酶水解其游離脂肪酸釋出量 之變化.....	26
圖 12. 模擬體外腸道消化試驗流程圖.....	30
圖 13. 模擬體外胃腸道消化試驗流程圖.....	32
圖 14. 模擬體外胃部消化試驗流程圖.....	34
圖 15. 解脂酶於無胰蛋白酶模擬腸道消化對乳樣品脂肪酸釋出量之 影響.....	36

圖 16. 解脂酶於含胰蛋白酶模擬腸道消化對乳樣品脂肪酸釋出量之影響.	37
圖 17. 解脂酶於無胰蛋白酶模擬胃腸道消化對乳樣品脂肪酸釋出量之影響.	40
圖 18. 解脂酶於含胰蛋白酶模擬胃腸道消化對乳樣品脂肪酸釋出量之影響.	41
圖 19. 模擬胃部消化期間之游離脂肪酸釋出濃度.	43
圖 20. 不含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之生乳乳脂肪水解率.	45
圖 21. 不含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之 HTST 鮮乳乳脂肪水解率.	46
圖 22. 不含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之均質 HTST 鮮乳乳脂肪水解率.	47
圖 23. 含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之生乳乳脂肪水解率.	49
圖 24. 含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之 HTST 鮮乳乳脂肪水解率.	50
圖 25. 含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之均質 HTST 鮮乳乳脂肪水解率.	51

I、中文摘要

牛乳中之乳脂肪球係外圍生物膜包覆中心之三酸甘油酯所構成，而此生物膜則稱為乳脂肪球膜 (milk fat globule membrane; MFGM)，蛋白質約佔膜總組成份之 70%，其中某些蛋白質對於乳脂肪球之分泌與穩定極為重要。然而，牛乳加工過程中之均質處理會明顯改變乳脂肪球膜之構成，而酪蛋白 (casein) 與乳清蛋白 (whey protein) 會成為新的乳脂肪球膜主要成分。本研究之目的在於探討生乳、HTST 鮮乳以及均質 HTST 鮮乳進行體外模擬腸道或胃腸道消化，於胰蛋白酶存在與否之條件下檢測胰解脂酶對乳脂肪之水解情形。體外模擬腸道消化試驗結果指出，不論胰蛋白酶存在與否，均質 HTST 鮮乳所釋出之游離脂肪酸濃度均高於生乳及 HTST 鮮乳，但模擬胃腸道消化結果則無顯著差異。體外胃腸道消化試驗中，經胃蛋白酶消化後之生乳、HTST 鮮乳以及均質 HTST 鮮乳於解脂作用前期之乳脂水解率均會提高，再添加胰蛋白酶則無法更進一步提高乳脂消化前期脂水解率。於含有胰蛋白酶之體外腸道消化試驗中，HTST 之鮮乳和均質 HTST 鮮乳於解脂作用前期之乳脂水解率高於無蛋白酶處理之組別。綜上所述，胃腸之蛋白酶於體外乳脂肪消化過程中扮演一輔助角色，可提高牛乳脂肪於消化初期之水解率。

II、前言

牛乳及其乳製品作為人類日常食品以行之有年，係一均衡且富含各種營養素之食品，廣為各年齡層所食用，甚至為嬰兒之主要供食來源，而牛乳中所富含之脂肪亦為重要之營養及能量來源。所有食材中所含之脂質，唯乳脂肪具有起泡特性與復水能力，此源於牛乳脂肪之構造迥異於其他任何食品。乳脂肪係由外層生物膜 (biological membrane) 包覆中心脂質而形成之球體，並散布於乳汁中，一般稱為乳脂肪球。乳脂肪球膜含有豐富蛋白質，可維持球膜結構之完整性。生乳經各種加工程序成為鮮乳後，可提高乳中營養份之消化率，惟加工過程亦會改變牛乳之物化性質，其中包括脂肪球膜結構的改變，而使乳脂肪球表面蛋白質覆蓋程度更加提升。前人之研究結果證實，乳脂肪消化程度取決於其表面乳化物質之型態，而且乳脂肪之結構亦確實影響乳脂肪於消化道中之解脂作用與吸收作用。此等異於一般油脂消化之現象啟發吾人進行探究的動機，茲就相關文獻報告，逐一檢討鮮乳加工過程對於乳脂肪球膜產生之變化，以及對消化可能之影響，然後藉由體外模擬消化試驗，探討腸胃蛋白酶作用對於不同加工方式乳脂肪消化效率之影響作一系列評估。

III、文獻回顧

牛乳係一富含營養之日常食品，外觀雖為質地均勻的白色液體，實際上乃包含了各種顆粒成分所組成（圖 1），主要包括酪蛋白微球 (casein micelles)、乳脂肪球 (milk fat globules)，以及巨噬細胞 (macrophage)、嗜中性球 (neutrophils)、淋巴球 (lymphocytes) 和剝落之乳線上皮細胞等體細胞 (somatic cells)。此外，亦含有稱為乳清球膜顆粒 (whey membrane particles; WMP) 之泡狀顆粒 (vesicle)，其主要由磷脂質所組成，其粒徑約為 30~200 nm，相關之研究甚少，詳細分泌過程與生理功用目前仍然不明 (Silanikove and Shapiro, 2007)。牛乳成分也含有豐富的乳糖 (lactose) 及乳清蛋白。由於牛乳成分富含營養與加工機能性，故被廣泛應用於食品原料中。

一、乳脂肪

許多哺乳動物乳汁中的脂質，除可作為新生兒生長需熱量之重要來源 (Chong *et al.*, 2011)，亦提供新生兒細胞膜合成所需必須脂肪酸，以及具有生物活性之脂質訊息分子的來源 (Koletzko and Rodriguez-Palmero, 1999)。

牛乳依乳牛品種不同含有 3~5% 的脂肪，主要成份為三酸甘油脂，少數二酸甘油脂以及一些脂溶性化合物，其組成如表 1 所示。

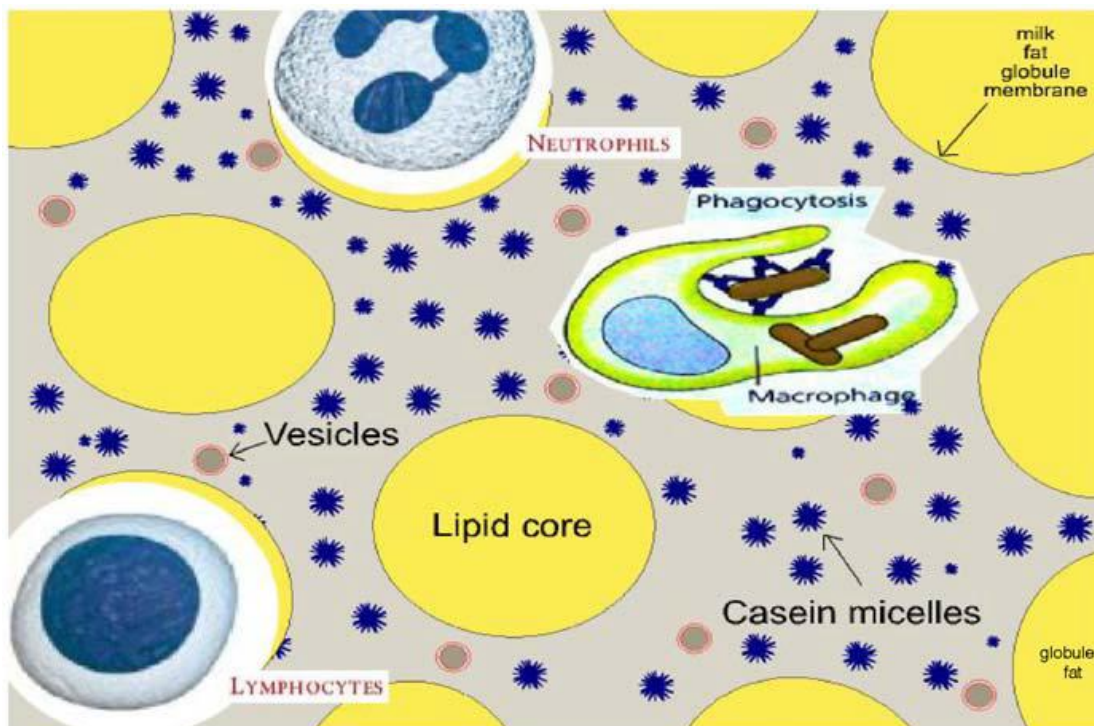


圖 1. 乳汁成分之自然形態。

Fig. 1. Schematic representation of physical phases of milk. The area between the milk particles represents the milk serum (whey), the phase in which all other phases are homogenously dispersed.

(Silanikove *et al.*, 2006)

表 1. 牛乳脂質之組成

Table 1. Gross composition of milk lipids

	Content in total fat (% , w/w)	Fraction in globule core (%)	Fraction in MFGM ^a (%)	Fraction in skim phase (%)
Neutral glycerides				
Triacylglycerol	95.8-98.3	100		
Diacylglycerol	0.03-0.38	~90	~10	?
Mono-acylglycerol	0.10-0.44	Trace	Trace	Trace
Free fatty acids	0.10	60	~10	30
Phospholipids (incl. sphingomyelin)	0.20-0.11	-	65	35
Cerebrosides	0.1	-	70	30
Gangliosides	0.01	-	~70	~30
Sterols		80	10	10
Cholesterol	0.03-0.46			
Cholesteryl ester	≤0.02			
Carotenoids+Vitamin A	0.002	~95	~5	trace
Vitamin D	~0.0000015	-	-	-
Vitamin E	0.0024	-	-	-
Vitamin K	0.0001	-	-	-

^a Native milk fat globule membrane.

(張, 1983; Michalski and Januel, 2006)

乳汁中之脂肪不同於一般食材，係以乳脂肪球 (milk fat globules) 的形式存在，外層由乳脂肪球膜 (MFGM) 包覆脂肪油滴形成，散布於牛乳之中，其粒徑範圍在 0.1~20 μm ，雖平均粒徑有種間差異，但絕大部分集中在 2~4 μm (張，1983; Michalski and Januel, 2006; Dewettinck *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2010)。又，乳產量及乳脂率對乳脂肪球平均粒徑均為正相關 (Wiking *et al.*, 2004)。

二、乳脂肪球

(一) 乳脂肪球膜之結構與組成分

乳脂肪球膜結構如圖 2 所示，由二層磷脂膜所構成的乳脂肪球膜包覆中心的三酸甘油脂而成。內層為面向脂質的脂單層 (monolayer)，源自於內質網 (endoplasmic reticulum; ER)；外層之脂雙層 (bilayer) 則源自乳線分泌上皮細胞頂膜 (Chong *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2010; Mather *et al.*, 1982; Mather and Keenan, 1998)，除此之外，或許有些球膜成分來自於細胞內其他部分。此類似微脂體 (liposome) 的結構使得乳脂能以乳化的形態懸浮在乳汁中 (Mather and Keenan, 1998)，並對抗牛乳內源性解脂酶 (lipase)，以保護其中的脂肪不被水解 (張，1983)。另外，生乳脂肪球表面會有酪蛋白微球吸附之情形 (Mather and Keenan, 1998)。

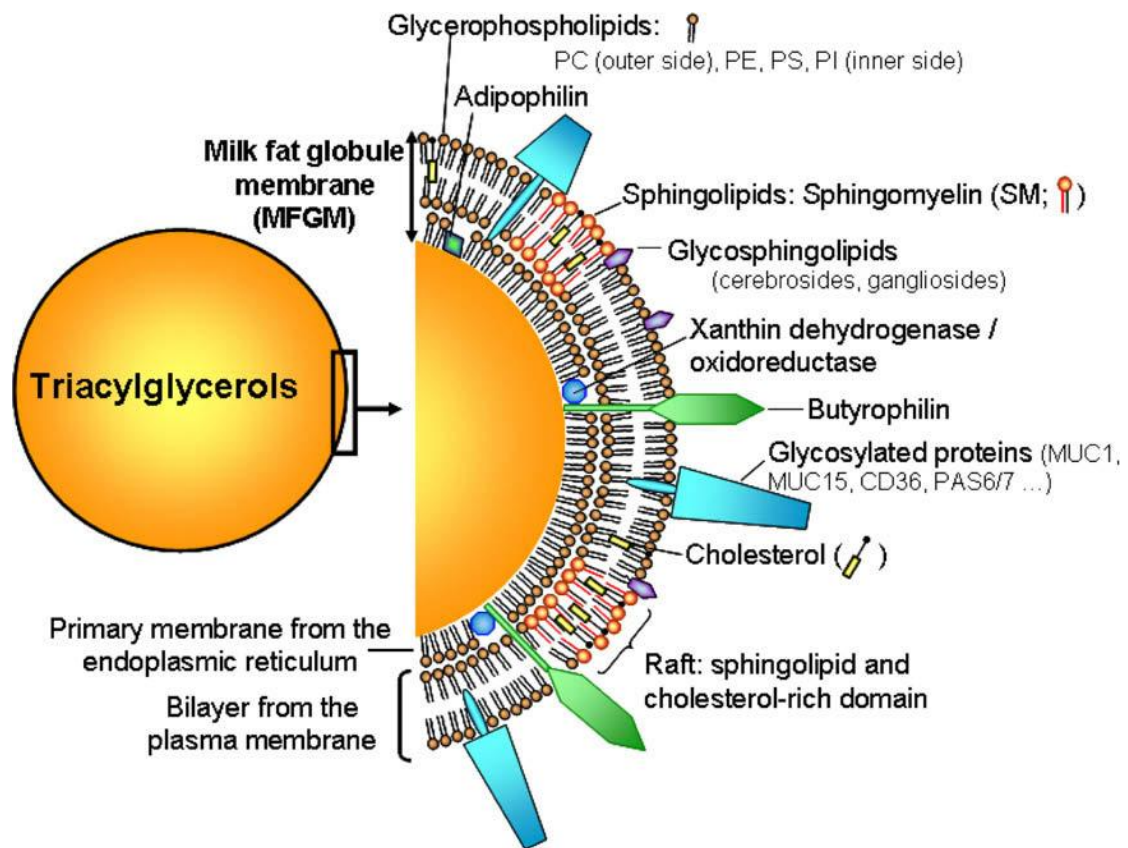


圖 2. 乳脂肪球膜之結構。

Fig. 2. Schematic representation of the structure of the milk fat globule membrane.
Not to scale.

(Lopez *et al.*, 2010)

脂肪球膜厚度約為 8~10 nm (Ye *et al.*, 2010)，磷脂質與蛋白質佔總組成物質的 90% 以上 (表 2)，其中蛋白質約佔 70% (El-Loly, 2011; Singh, 2006)，而腦苷酯 (cerebrosides) 與膽固醇 (cholesterol) 則約佔總組成的 5%。乳脂肪球膜中所含之多種蛋白質 (表 3) 一般統稱為乳脂肪球膜蛋白 (MFGM proteins)，其中黃嘌呤氧化還原酶 (xanthine oxidoreductase; XOR)、嗜乳脂蛋白 (butyrophilin; BTN) 和親脂蛋白 (Adipophilin; ADPH) 三者被認為是乳脂肪球分泌以及維持球膜穩定所必須之蛋白質 (Chong *et al.*, 2011; Ogg *et al.*, 2004; Robenek *et al.*, 2006)。黃嘌呤氧化酶主要位於內膜上，少數位於外膜表面 (Heid and Keenan, 2005; Michalski and Januel, 2006; Silanikove, and Shapiro, 2007)。嗜乳脂蛋白為特定表現於乳腺分泌上皮細胞頂膜之跨膜蛋白 (transmembrane protein)，佔總脂肪球膜蛋白的 20% 以上 (Mather and Keenan, 1998)，內外膜均有分布，但外膜分布較高 (Robenek *et al.*, 2006)；親脂蛋白則分布於內外膜之間的區域 (Chong *et al.*, 2011; Vanderghem *et al.*, 2011)。McManaman *et al.* (2002) 於小鼠乳汁試驗中指出此三種蛋白質於膜上的分布極為豐富 (圖 3)，且重疊的比率極高。三種蛋白之間會以雙硫鍵彼此鍵結，或三者一同鍵結形成複合物 (Harrison, 2006; Ye *et al.*, 2002)，此鍵結之形成為乳脂肪球分泌以及結構維持所必須。

表 2. 乳脂肪球膜之組成份

Table 2. Estimated average composition of the milk fat globule membrane

Component	mg/100 g fat globules	g/100 g MFGM dry matter
Protein	1800	70
Phospholipids	650	25
Cerebrosides	80	3
Cholesterol	40	2
Monoglycerides	+ ^a	-
Water	+ ^a	-
Carotenoids +Vit. A	0.04	0.0
Fe	0.3	0.0
Cu	0.01	0.0
Total	>2570	100

+^a: present, but quantity unknown.

(El-Loly, 2011)

表 3. 乳脂肪球膜蛋白質之組成

Table 3. Protein components of the milk fat globule membrane

Proteins	Molecular weight (kDa)
Mucin I (MUC 1)	160-200
Xanthine oxidase (XO)	150
PAS III ^a	95-100
CD36 or PAS IV	76-78
Butyrophilin (BTN)	67
Adipophilin (ADPH)	52
PAS 6/7 or lactadherin	48-54
Fatty acid binding protein (FABP)	13
Breast cancer type 1 (BRCA1)	210

^aMFGM proteins were classified according to their relative mobilities during SDS-PAGE. Bands of protein in the gels were identified by staining with Coomassie blue or the periodic acid/Schiff (PAS) reagent and assigned arabic or roman numerals.

(Mather, 2000; Singh, 2006)

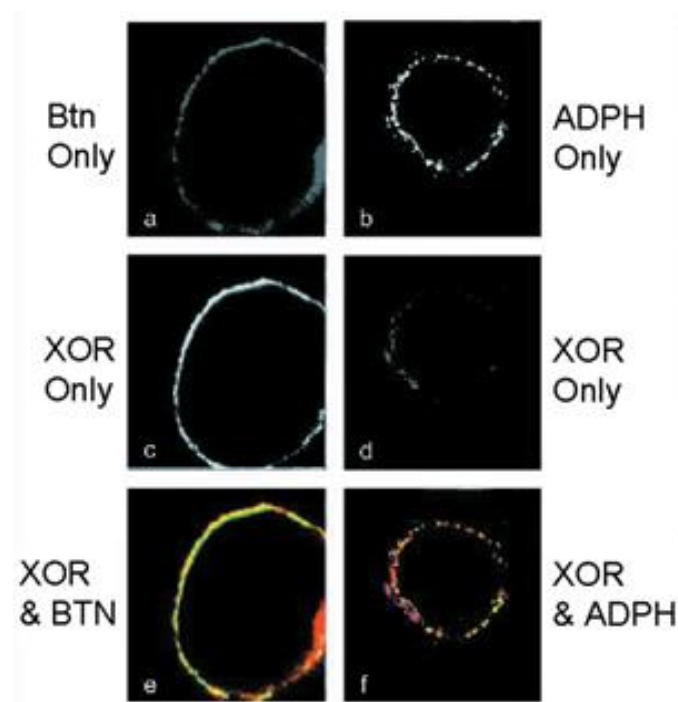


圖 3. 乳脂肪球膜蛋白 BTN、ADPH 及 XOR 免疫染色圖。

Fig. 3. Xanthine oxidoreductase (XOR) was separately immunolocalized with butyrophilin (BTN) or adipophilin (ADPH) in paraformaldehyde-fixed mouse milk. XOR was detected with FITC-labelled antibodies (green) and BTN and ADPH were detected with cy3-labelled antibodies (red) as described. a, BTN only staining; b, XOR only staining; c, merged image of XOR and BTN staining; d, ADPH only staining; e, XOR only staining; f, merged image of XOR and ADPH staining. Note that XOR is largely localized internal to BTN and that all ADPH staining appears to overlap with XOR, as shown by the yellow areas.

(McManaman *et al.*, 2002)

(二) 乳脂肪球之分泌

乳脂肪球內之油滴產生自乳腺分泌上皮細胞之內質網 (Heid and Keenan, 2005; Wu *et al.*, 2000)，油滴進入細胞質後稱為細胞質微油滴 (cytoplasmic microlipid droplets)，即乳脂肪球之前身，其表面由源自於內質網膜的蛋白質與極性脂質所包覆。親脂蛋白即於此時大量分布於膜表面，是乳脂分泌相關之主要蛋白質 (McManaman *et al.*, 2003; Russell *et al.*, 2008)。隨後細胞質微油滴會藉由未知的機轉逐漸運送至細胞頂膜 (圖 4)，過程中會相互聚集成較大的細胞質油滴 (cytoplasmic lipid droplets) (Heid and Keenan, 2005; Mather and Keenan, 1998)。

細胞質油滴接觸到分泌細胞頂膜分泌區域後，油滴膜上之親脂蛋白藉由碳端四個親水螺旋結構與細胞頂膜結合，改變頂膜結構與流動性，造成頂膜彎曲向外突出，此過程使位於頂膜之嗜乳脂蛋白得以分布進內膜中，並與親脂蛋白和黃嘌呤氧化還原酶結合，形成三蛋白複合體 (Chong *et al.*, 2011) (圖 5)。隨後細胞質油滴即纏繞其細胞頂膜，形成具有雙層磷脂膜之乳脂肪球並分泌至乳汁中 (Hamosh *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000) (圖 6)。

由於生乳之乳脂肪球比重較輕，靜置後會上浮至生乳頂層。而球膜之外膜會於擠乳後逐漸剝離 (Evers, 2004)，其原因可能是由於牛

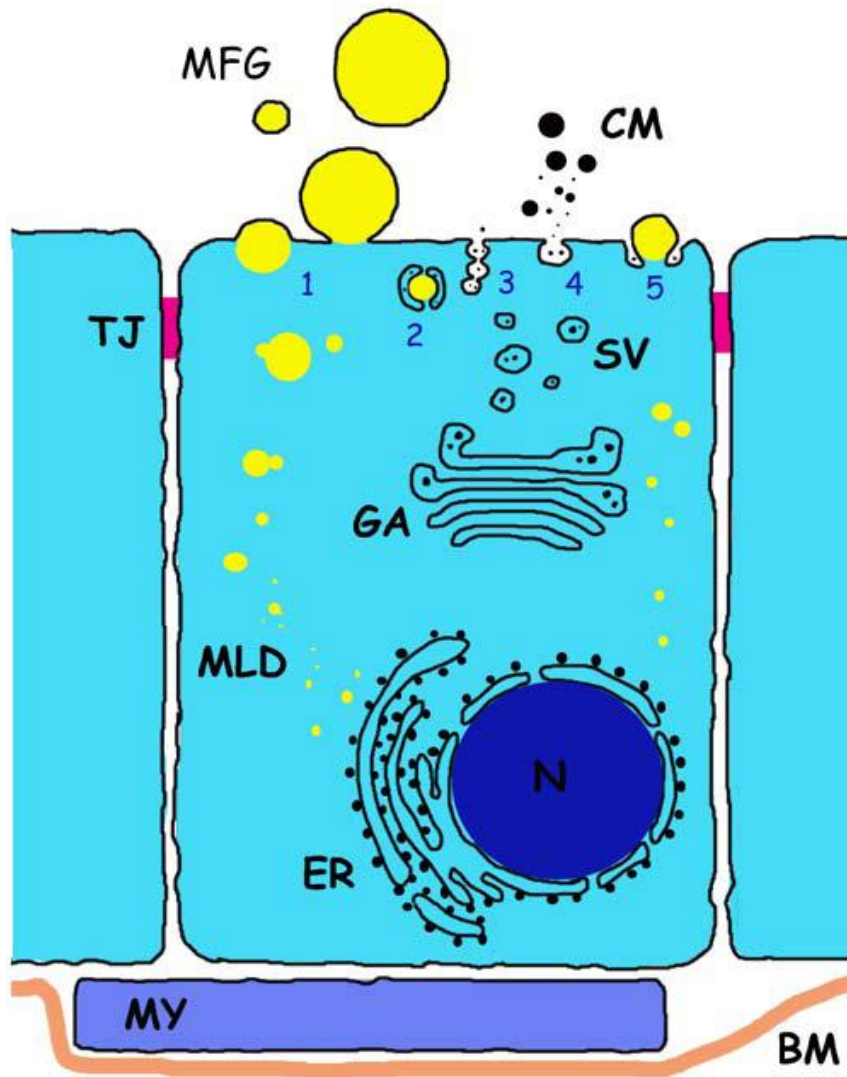


圖 4. 乳脂肪球自細胞內產生、發育及分泌之過程。

Fig. 4. Diagram summarizing what is known about the intracellular origin, growth and secretion of milk fat globules. (1) Secretion of a milk fat globule by envelopment in apical plasma membrane. (2) As originally proposed by [Wooding \(1971\)](#), under certain conditions secretory vesicles may surround fat droplets and fuse together to form a vacuole containing the fat droplet. Presumably these vacuoles are transported to the apical surface where the vacuolar contents are released by exocytosis. (3) Secretion of the serum (non-fat) phase of milk by compound exocytosis. (4) Secretion of the serum phase of milk by simple exocytosis. (5) A possible but as yet undocumented combination of apical plasma membrane and secretory vesicle membrane mechanisms for secretion of fat globules. Abbreviations: CM, casein micelle; ER, endoplasmic reticulum; GA, Golgi apparatus; MLD, microlipid droplet; MFG, milk fat globule; N, nucleus; SV, secretory vesicle; TJ, tight junction; MY, myoepithelial cell; BM, basement membrane.

(Heid and Keenan, 2005)

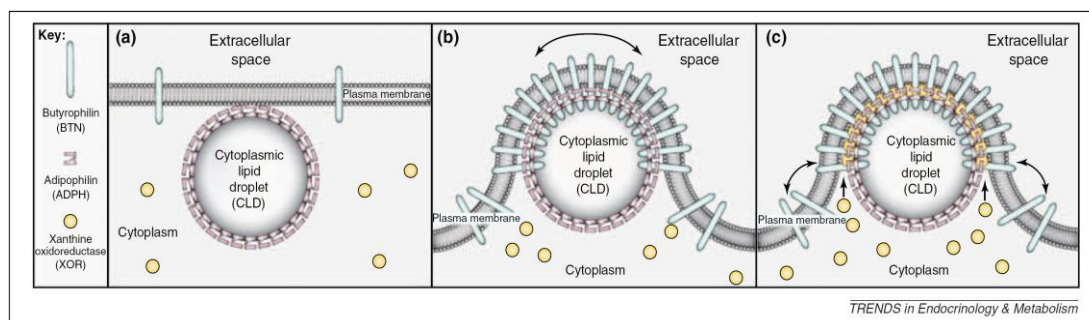


圖 5. 親脂蛋白作為接合器之乳脂肪球分泌模式。

Fig. 5. Adipophilin adaptor model of milk lipid secretion. Current evidence suggests the following mechanism for milk lipid secretion. (a) Adipophilin (ADPH) functions as an adaptor to couple cytoplasmic lipid droplets (CLD) to the cytoplasmic leaflet of the apical plasma membrane through independently functioning N- and C-terminal domains that mediate its binding to the CLD surface and the plasma membrane respectively. (b) Membrane-deforming effects of the C-terminal four-helix bundle domain of adipophilin induce membrane curvature and reorganization of membrane proteins, leading to the recruitment of butyrophilin (BTN) and possibly other essential factors, to sites of CLD secretion. (c) Formation of a complex between xanthine oxidoreductase (XOR) to BTN is hypothesized to complete the process that leads to CLD membrane envelopment and milk lipid secretion.

(Chong *et al.*, 2011)

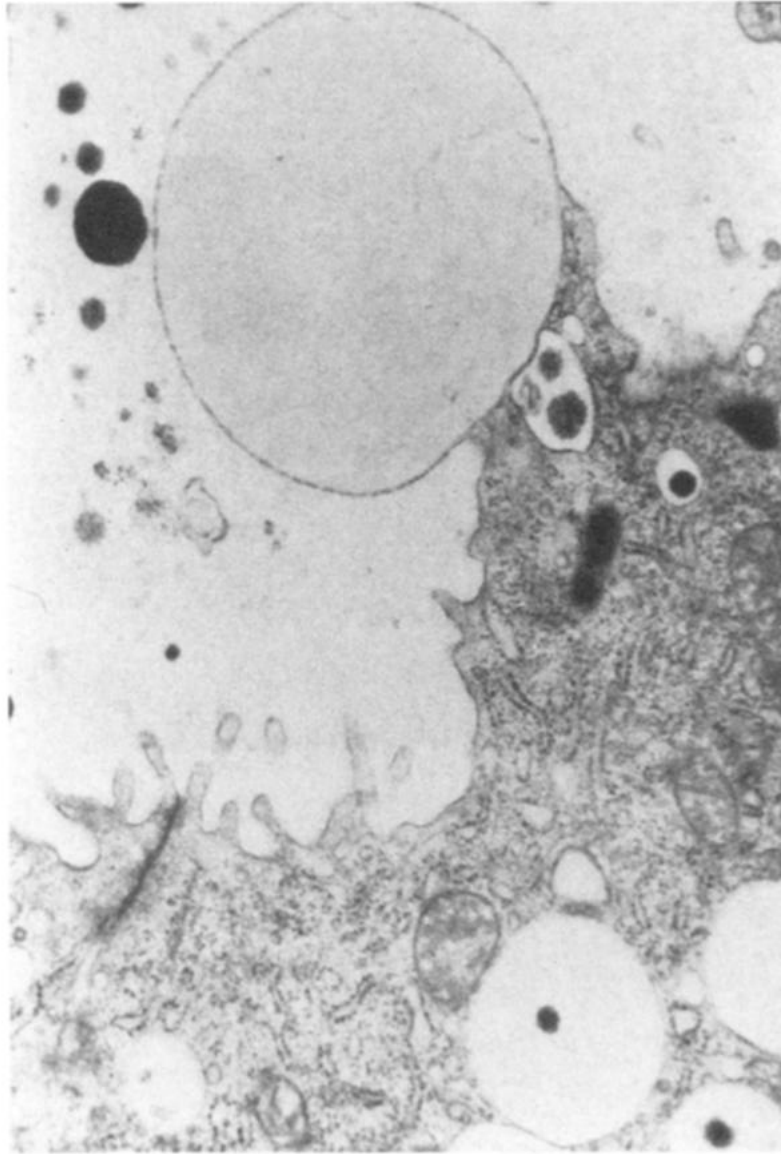


圖 6. 乳腺分泌乳脂肪球過程之顯微鏡圖。

Fig. 6. Electron micrograph of rat milk fat globule during the process of secretion from the mammary gland.

(Hamosh *et al.*, 1999)

乳內源性蛋白酶 (plasmin) 將維持結構相關之乳脂肪球膜蛋白降解造成。

二、鮮乳加工過程對乳脂肪球之影響

生牛乳須經過淨化、均質、熱殺菌、冷卻、裝瓶等處理，以瓶裝或紙盒裝之液體形式販售，稱為市乳 (market milk)。牛乳加工過程中，均質化與熱殺菌處理對牛乳品質之影響最為關鍵。

(一) 均質化

牛乳均質化處理目的在於細微化乳脂肪球，以防止裝瓶後因乳脂肪上浮而造成之乳油分離現象，並可增加牛乳營養之消化率 (林，1993；張，1983)。均質化處理一般使用二段式均質機 (two stage homogenizer)，在第一段 2,000~3,000 lb/in² 高壓下，以 300~800 ft/s 高速迫使乳汁通過極細孔道後噴出，使大部分脂肪球粒徑降至 1 μm 以下，再藉由第二段 600~700 lb/in² 壓力將脂肪球粒徑均勻化，並均勻分布於乳汁中 (張，1983; Paquin, 1999)。另外，若均質壓力愈大，則均質後脂肪球粒徑亦愈小 (Lee *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2008)。經均質處理後之脂肪球平均粒徑界於 0~4 μm 間，而以 1 μm 者為最多 (圖 7)。

乳脂肪球均質後，酪蛋白與乳清蛋白會成為脂肪球膜的構成物，

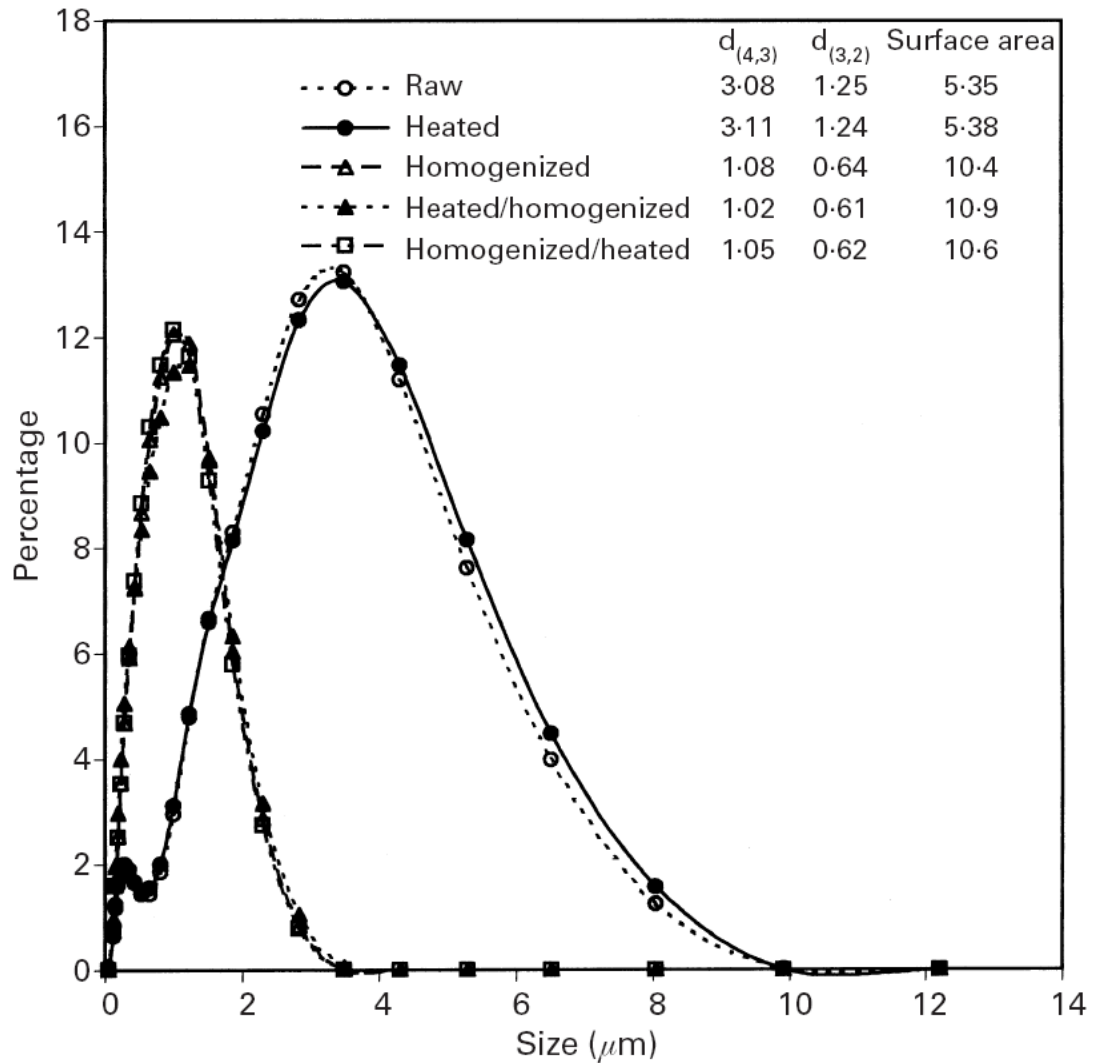


圖 7. 牛乳經不同處理後之乳脂肪球粒徑與表面積分布圖。

Fig. 7. The size (μm) and surface area (m^2/g) of fat globules and their size distribution in differently treated milk samples. Heat treatment was at 80°C for 3 min. $d_{(4,3)}$, volume mean diameter; $d_{(3,2)}$, volume to surface related average diameter.

(Lee *et al.*, 2002)

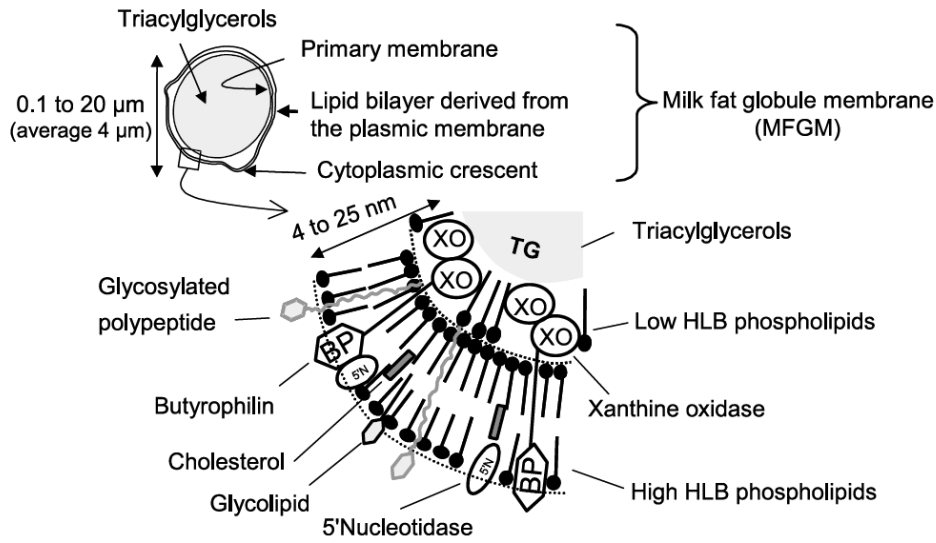
產生各種不同型態的脂肪球 (圖 8)，主要以乳蛋白質與脂肪球膜共同包覆之脂肪球為主 (圖 9)，以及原本就存在於乳中之完整脂肪球膜包覆之微小的脂肪球，與單單由乳蛋白質包覆的油滴。此外，研究指出，若提高均質壓力或預熱溫度，均質後脂肪球表面之乳蛋白質覆蓋程度亦愈高 (Michalski and Januel, 2006; Michalski *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2008)。

而均質處理的條件可能會影響這些不同類型的脂肪球於乳中的分布，但詳細情形目前仍不甚明瞭。但若假設生乳脂肪球粒徑平均 2~4 μm ，均質乳為 0.5 μm ，帶入球面積與球體積公式，在脂肪球總體積不變的條件下，則可得出脂肪球總表面積於均質後增加 4~8 倍，生乳脂肪球膜覆蓋率則自均質前的 100% 下降到 12.5~25.0%，其餘 75.0~87.5% 之表面則由酪蛋白與乳清蛋白覆蓋。張 (1983) 指出均質後脂肪球總表面積增加六倍，與此推論相符。

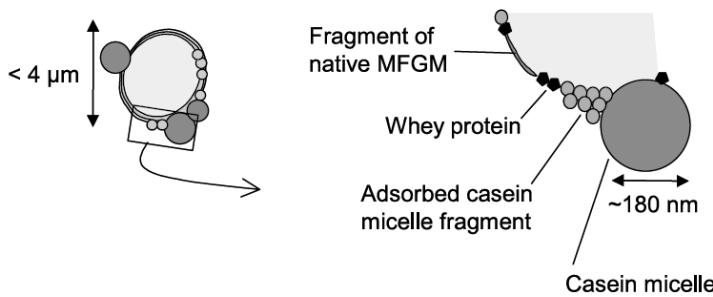
此外，均質處理亦會改變牛乳之理化性質，如色相增加 (變白)、表面張力增加、減低凝乳 (curd) 張力、黏度 (viscosity) 增加、增加照射臭 (irradiated flavor)、減少氧化臭 (oxidized flavor)、增加水解酸敗 (hydrolytic rancidity)、增加起泡性與降低蛋白質安定性等 (張，1983)。

(二) 熱處理

→ Organization of the native milk fat globules



→ Organization of an homogenized lipid droplet



→ General organization of homogenized milk

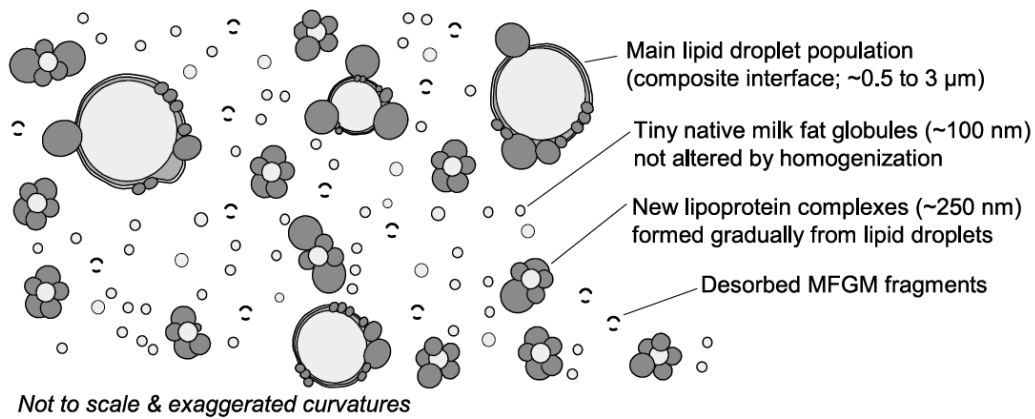


圖 8. 乳脂肪球膜於均質前、後結構之比較。

Fig. 8. Organization of the native milk fat globule membrane (MFGM) compared with the interfacial organization of an homogenized fat droplet and proposed general organization of lipid particles in homogenized milk.

(Michalski and Januel, 2006)

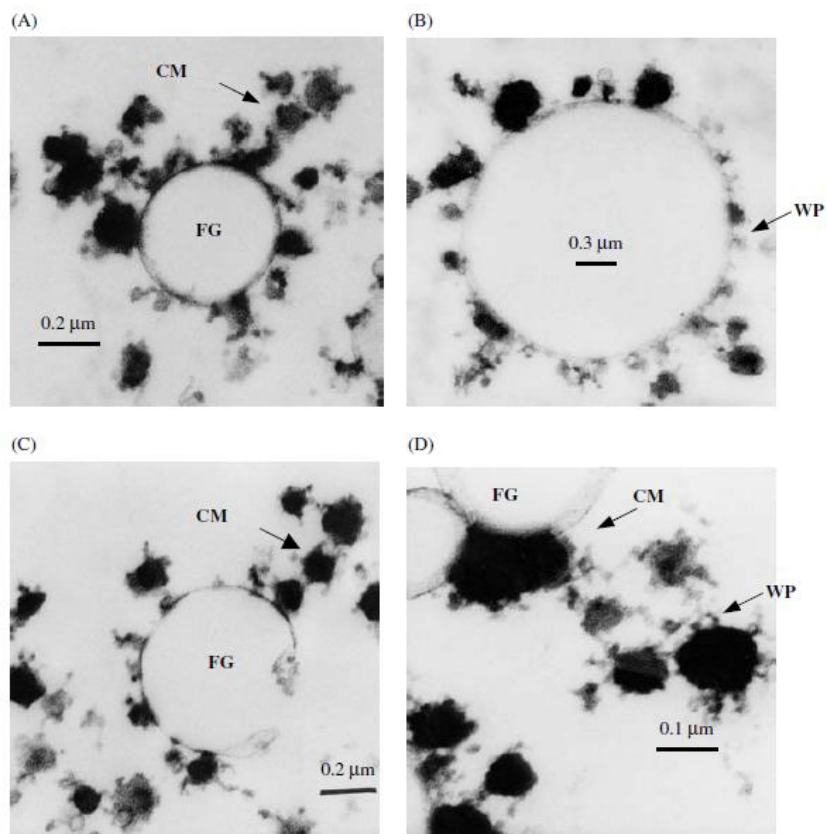


圖 9. 均質乳脂肪球之掃描式電子顯微鏡照圖。

Fig. 9. Transmission electron micrographs of low-preheated (70°C) (A, B) and high-preheated (95°C, 20 s) (C, D) concentrates homogenized at 7 MPa and 79°C (A, C) and concentrates homogenized at 7 MPa and 50°C and then heated to 79°C (B, D). FG: fat globules, CM: casein micelles, WP: whey protein. Magnification: $\times 48,600$.

(Ye *et al.*, 2008)

牛乳熱處理目的在於完全殺滅病原菌，並抑制其他微生物之生長，以增加乳製品之安全性及保存性。加熱殺菌方式大致分為以下三種，其一為低溫長時間 (LTLT) 殺菌，62~65°C，30 min 以上，其二為高溫短時間 (HTST) 殺菌，72~85°C，15 秒以上，以及超高溫 (UHT) 殺菌，先於 80~83°C，2~6 min 預熱後，再加熱至 130~150°C，2 秒以上 (林，1993；張，1983)。

而熱處理過程亦會對乳脂肪球之結構造成影響。據研究結果指出，生乳經 65°C 以上加熱，即會有酪蛋白與乳清蛋白吸附在脂肪球膜表面，其乳清蛋白吸附量與加熱時間成正相關 (Ye *et al.*, 2004a, b)。Ye *et al.* (2008) 將均質之濃縮乳加熱至 79°C，亦發現均質脂肪球表面附著之乳清蛋白量有顯著提升。

此外，Houlihan *et al.* (1992) 之研究結果指出，生乳於 80°C 加熱 20 min，除脂肪球膜表面有乳清蛋白吸附外，其乳脂肪球內部之脂肪量也明顯下降，顯示於牛乳於加熱過程中，部分乳脂會自脂肪球內部釋出到水溶液中，而這類乳脂則很可能由酪蛋白與乳清蛋白所乳化，再次散布於牛乳中。另一方面，Ye *et al.* (2002) 亦指出生乳經 50°C 加熱 10 min，會造成生乳總脂肪球膜蛋白約 50% 的損失。顯示加熱或多或少會影響乳脂肪球膜之安定性。

三、乳脂肪之消化

消化過程中，食物中的脂質必須先經過乳化，形成油水介面 (oil-water interface)，才能夠使解脂酶有效地附著於油滴表面，以進行之後的解脂作用。而介面物質之組成與結構深刻影響解脂酶對油滴之吸附情形，因此對脂質消化率扮演一重要角色。此外，油滴之大小與三酸甘油脂結構亦會影響油脂消化率 (Golding and Wooster, 2010; Mun *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009)。然而，牛乳脂肪球本身即為乳化之油滴，除外表包裹結構複雜之磷脂蛋白質脂球膜外，經均質處理後更是具有多種型態，因此其消化情形或許與其它食物所含之脂肪大相徑庭。

(一) 胃部消化

食物經由食道運送至胃部，胃具儲存及消化食物之功能。胃液主要由水分 (97~99%)、鹽酸 (0.2~0.5%)、消化酶、黏液等及其他內在因子組成。其消化酶主要包括胃蛋白酶 (pepsin) 與副胃蛋白酶 (parapepsin)；在幼年動物則有凝乳酶 (rennin) 與少許解脂酶 (gastric lipase)。凝乳酶與乳中的鈣共同促進乳蛋白質於胃中形成凝塊，避免母乳太快通過胃部，因此對幼年動物消化具重要性。而成年動物胃液中則無凝乳酶與解脂酶 (姜，2009)。

Ye *et al.* (2011) 之研究結果指出，於含有胃蛋白酶之模擬胃液中的生乳脂肪球會產生凝絮化 (flocculation) 現象，且黃嘌呤氧化酶、

嗜乳脂蛋白、MUC 1、PAS 6/7 等脂肪球膜蛋白均可被胃蛋白酶有效地降解，造成脂肪球膜表面結構的改變，但乳脂肪球仍維持完整的球形（圖 10）。顯示胃蛋白酶消化可能造成球膜的不穩定，但不至於造成脂肪球瓦解。

（二）腸道消化

胰解脂酶（pancreatic lipase）由胰臟分泌，能夠水解食物中脂肪，在腸道脂肪消化過程中為最重要的角色。而同樣由胰臟分泌之輔解脂酶（colipase）則為提高解脂酶水解脂肪能力的重要角色。此外，膽汁中含有之膽酸（bile acids）為雙嗜性（amphipathic）分子，故具有乳化能力，可促進小腸中脂肪形成微脂粒（micelle），並可將食物中脂肪油滴變小，增加解脂酶作用機會，是脂肪在消化吸收上不可或缺之重要角色（姜，2009）。

生乳脂肪球膜具有抗拒解脂酶之脂肪分解作用，但均質後脂肪球膜則不再有抗拒作用（張，1983）。Berton *et al.* (2009) 探討胰解脂酶對均質與未均質人乳脂肪球之作用情形，結果顯示胰解脂酶對於均質後人乳脂肪之分解效率較高。

Ye *et al.* (2010) 以生乳脂肪球以及均質重組乳之乳蛋白包覆油滴做為試樣，於膽鹽萃取物存在與否情況下，探討胰酶（pancreatin）

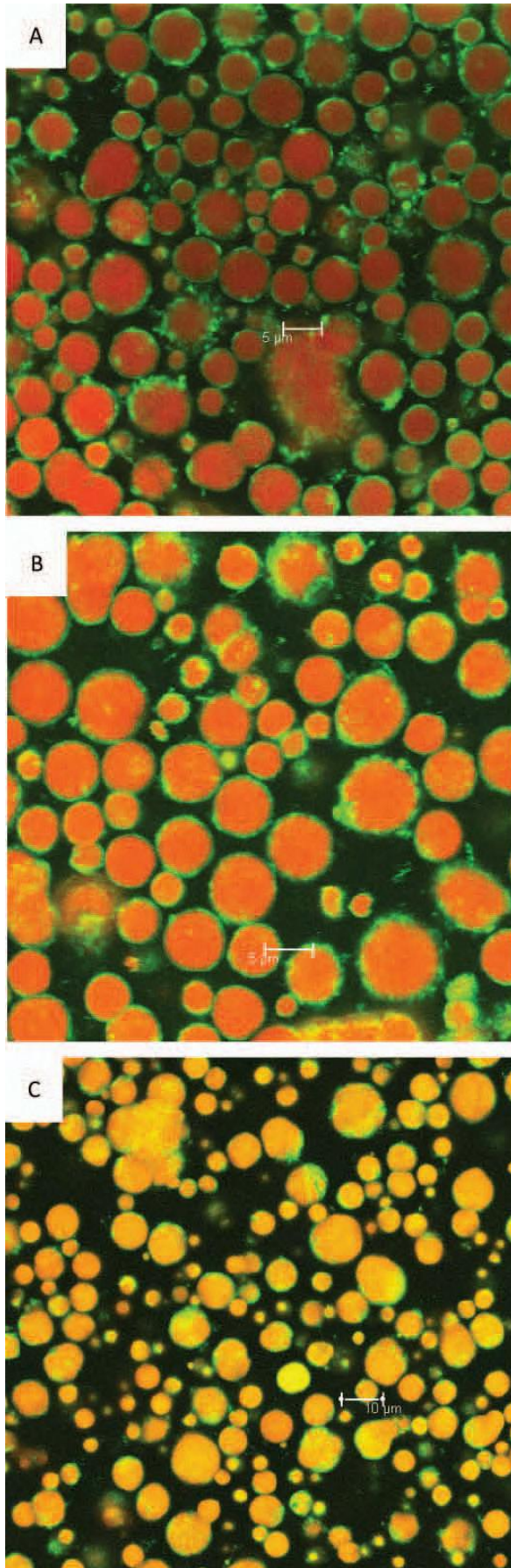


圖 10. 模擬胃液中乳脂肪球之共軛焦距電子顯微鏡圖。

Fig. 10. Confocal micrographs of the fat globules in cream samples: dispersed in water (A), in simulated gastric fluid (SGF) at pH 1.6 (B) and after incubation in SGF containing pepsin at 1.6 mg/mL for 10 min (C). Red or orange (gray) color represents fat; green (black) color represents protein (white pieces on the surface of fat globules are membrane proteins).

(Ye *et al.*, 2011)

對乳脂肪之水解情形。結果顯示，生乳脂肪球膜結構確實較不利於中心乳脂之水解。另外，並進一步指出，均質後乳脂水解程度的提高乃是由於乳脂肪球膜覆蓋率下降，並非粒徑減少與總表面積增加所造成(圖 11)。

然而，Berton *et al.* (2012) 之研究結果卻與 Ye *et al.* (2010) 正好相反。Berton *et al.* (2012) 以胰解脂酶結合輔解脂酶與膽鹽，對不同粒徑之生乳脂肪球 (1.8、3.9、6.7 μm) 和均質乳脂肪球 (1.4 至 0.15 μm) 進行模擬體外消化試驗，其結果顯示胰解脂酶對於 1.8 μm 之生乳脂肪球解脂效率明顯高於 3.9 及 6.7 μm 之生乳脂肪球，顯示解脂效率與乳脂肪球之總表面積有關。而均質乳脂肪球雖有較高的解脂效率，但胰解脂酶對生乳脂肪球膜 (native MFGM) 之親和力高於均質乳脂肪球膜 (milk proteins)。換句話說，若脂肪球粒徑相同，則生乳脂肪球之解脂效率應高於均質乳脂肪球。

然而，上述二研究均沒有對蛋白酶之作用進行更進一步的討論。根據 Vanderghem *et al.* (2011) 之研究結果指出，黃嘌呤氧化酶、親脂蛋白及嗜乳脂蛋白均可被胰蛋白酶 (trypsin) 有效地降解，顯示胰蛋白酶或許可於消化過程中降低生乳脂肪球膜之安定性。而均質乳脂肪球表面含豐富酪蛋白與乳清蛋白，亦能夠被腸胃道蛋白酶所降解。因此，上述二研究之差異或許來自於胰蛋白酶作用結果。

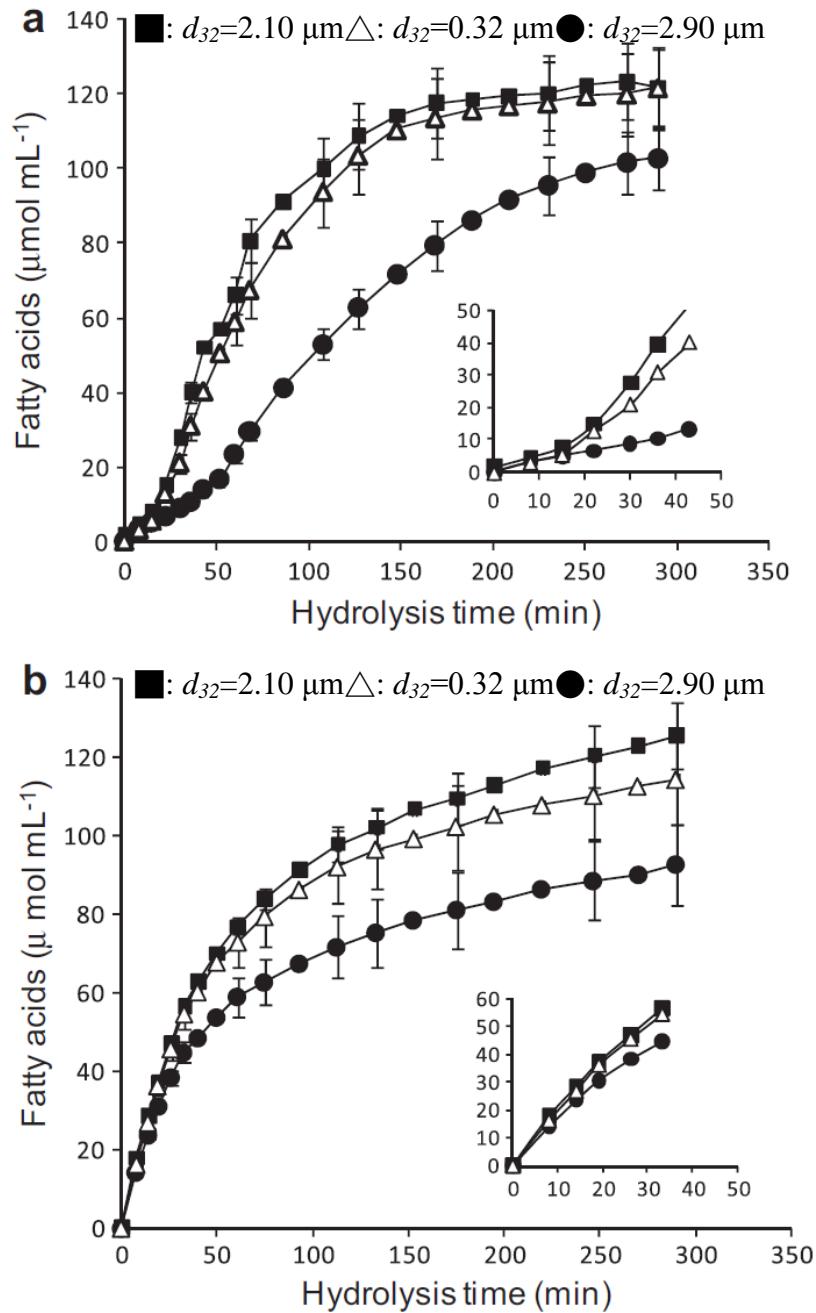


圖 11. 生乳與重組乳之脂肪球經胰解脂酶水解其游離脂肪酸釋出量之變化。
 Fig. 11. Level of fatty acids released from fat globules in raw milk (●), recombined milk A (■) and recombined milk B (△) after digestion with pancreatic lipase in (a) the absence and (b) the presence of bile extract as a function of time. Fat of raw milk was covered by MFGM and recombined milk A and B were covered by milk protein. Inset plots represent the amount of fatty acids released from samples at early stage. Each data point is the average \pm SE of two determinations on three separate emulsions.

(Ye *et al.*, 2010)

綜上所述，生乳脂肪球膜之結構含有豐富蛋白質，均質後則更甚，因此能夠推斷，於乳脂消化過程中，蛋白酶 (protease) 或許扮演一重要之輔助角色，而胃部消化對於均質乳脂肪球消化率，可能也有一定程度的影響。此外，生乳脂肪球膜受蛋白酶作用後，造成脂肪球膜蛋白降解，甚至可能造成外膜剝離，其結構更趨向於典型之微脂體。又，更甚者，如同林 (1993) 及 Argov *et al.* (2008) 所述之概念，乳脂肪球或許能不經過解脂酶作用而直接進入腸壁細胞。

IV、材料與方法

一、試驗材料

(一) 試藥

1. 胃蛋白酶 (pepsin)：自 Sigma 公司購得 (P-7000)。
2. 胰解脂酶 (lipase)：自 Sigma 公司購得 (L-3126)。
3. 胰蛋白酶 (trypsin)：自 Sigma 公司購得 (T-7409)。
4. 膽鹽 (bile salt)：自 Sigma 公司購得 (B-8756)。
5. 磷酸氫二鉀 (*di*-potassium hydrogen phosphate anhydrous; K_2HPO_4 , FW=174.18)：自 Panreac Quimica 公司購得 (141512.1210)，歐盟。

(二) 試樣

1. 生乳 (raw milk)：採集自東海大學乳品加工廠。
2. 高溫短時間殺菌鮮乳 (HTST fresh milk)：生乳經 72°C 加熱殺菌 15 sec，冷卻後於 4°C 冷藏。
3. 高溫短時間殺菌均質鮮乳 (Homo-HTST fresh milk)：生乳預熱至 55°C 經 150 kg/cm² 壓力均質後，以 72°C 加熱殺菌 15 sec，冷卻後於 4°C 冷藏。

二、儀器設備

1. 恆溫振盪水浴槽：DKW-40，購自 Deng Yeng，台灣。
2. 高壓均質機：YUH SHING 均質機，YS-3000，購自鈺興機械工業有限公司，台灣。
3. 酸鹼值測定計：Seven Easy (S20)，購自 Ettlter-Toledo 公司，瑞士。

三、試驗方法

(一) 試藥配製

1. 胃蛋白酶溶液 (pepsin solution): 5.0 g 胃蛋白酶先溶於少量 0.1 N HCl (hydrogen chloride), 再以 0.1 N HCl 定量至 20 mL (Narasinga Rao and Prabhavathi, 1978)。
2. 模擬腸液 (simulated intestine fluid, SIF): 取 6.80 g 磷酸氫二鉀以及 8.77 g 之氯化鈉加入 0.2 N 之 190 mL NaOH (sodium hydroxide), 之後以去離子水定量至 1 L, 續以 6 N HCl 調整至 pH 7.5 備用 (Ye *et al.*, 2010)。
3. 胰解脂酶/膽鹽混合溶液 (lipase solution): 2.0 g 胰解脂酶和 10.0 g 膽鹽溶於模擬腸液中, 並以模擬腸液定量至 100 mL (Ye *et al.*, 2010)。
4. 胰蛋白酶/胰解脂酶/膽鹽混合溶液 (trypsin-lipase solution): 1.0 g 胰蛋白酶、2.0 g 胰解脂酶和 10.0 g 膽鹽溶於模擬腸液中, 並以模擬腸液定量至 100 mL (Vanderghem *et al.*, 2011)。
5. 胰蛋白酶溶液 (trypsin solution): 1.0 g 胰蛋白酶溶於模擬腸液中, 並以模擬腸液定量至 100 mL (Vanderghem *et al.*, 2011)。

(二) 試驗流程

以生乳、HTST 鮮乳及均質 HTST 鮮乳為樣品, 於胰蛋白酶有無之條件下, 進行模擬腸道或胃腸道消化, 並以滴定方式計算游離脂肪酸 (free fatty acids; FFA) 濃度, 判斷解脂酶對乳脂肪消化情形。參考自 Narasinga Rao and Prabhavathi (1978) 及 Ye *et al.* (2010) 之方法, 修飾如後:

1. 模擬腸道消化試驗 (*in vitro* intestinal digestion): 依圖 12, 乳樣

Intestinal digestion test

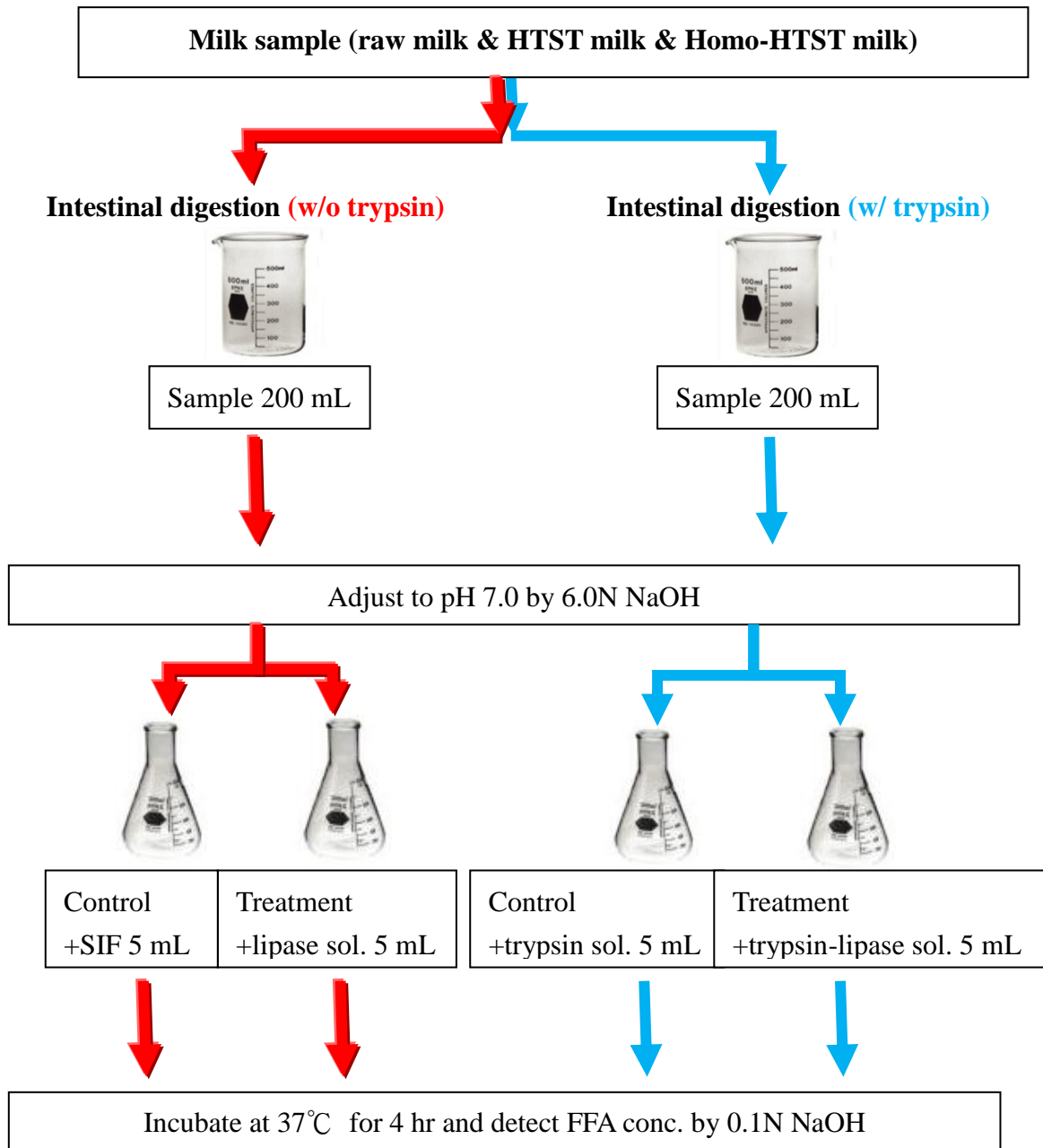


圖 12. 模擬體外腸道消化試驗流程圖。

Fig. 12. Schematic representation of the procedure of milk *in vitro* intestinal digestion test.

品 200 mL 自 4°C 冰箱取出，置入 37°C 恆溫水浴槽平衡 10 min。將乳樣品以 6 N NaOH 調整至 pH 7.0，並分成控制組與處理組兩組，各 100 mL。續於控制組與處理組中分別加入模擬腸液 5.0 mL 及胰解脂酶/膽鹽溶液 5.0 mL (無胰蛋白酶試驗組)，或胰蛋白酶及胰蛋白酶/胰解脂酶/膽鹽溶液 (含胰蛋白酶試驗組)。並立刻置入 37°C 恆溫水浴槽內，以 95 rpm 震盪，持續 4 hr，於 10~90 min 每 10 min，90~150 min 每 20 min，150~240 min 每 30 min，以 0.1 N NaOH 滴定至 pH 7.0 方式，檢測游離脂肪酸之釋出情形。

$$\begin{aligned} \text{游離脂肪酸濃度 (mM)} &= \frac{\text{滴定量 (mL)} \times \frac{0.1}{1000} (\text{NaOH 之莫耳數})}{0.1 \text{ L (牛乳量)}} \times 1000 \\ &= \text{滴定量 (mL)} \end{aligned}$$

2. 模擬胃腸道消化試驗 (*in vitro* gastrointestinal digestion)：乳樣品 200 mL 自 4°C 冰箱取出，置入 37°C 恆溫水浴槽平衡 10 min。將乳樣品分成控制組與處理組兩組，各 100 mL。處理組以 6 N HCl 調整至 pH 2.0，並加入胃蛋白酶溶液 2.0 mL。控制組則直接加入 0.1 N HCl 2.0 mL。之後立刻置入 37°C 恆溫水浴槽內，以 95 rpm 震盪 2 hr。震盪完畢後以 6 N NaOH 將控制組與處理組調整至 pH 7.0。續於控制組與處理組中分別加入模擬腸液 5 mL 及胰解脂酶/膽鹽溶液 5.0 mL (無胰蛋白酶試驗組)，或胰蛋白酶溶液及胰蛋白酶/胰解脂酶/膽鹽溶液 (含胰蛋白酶試驗組)。再立刻置入 37°C 恆溫水浴槽內，以 95 rpm 震盪，持續 4 hr，並依照試驗流程 1 之方式檢測游離脂肪酸釋出情形 (圖 13)。

3. 模擬胃部消化試驗 (*in vitro* gastric digestion)：乳樣品 200 mL 自 4°C 冰箱取出，置入 37°C 恆溫水浴槽平衡 10 min。將乳

Gastrointestinal digestion test

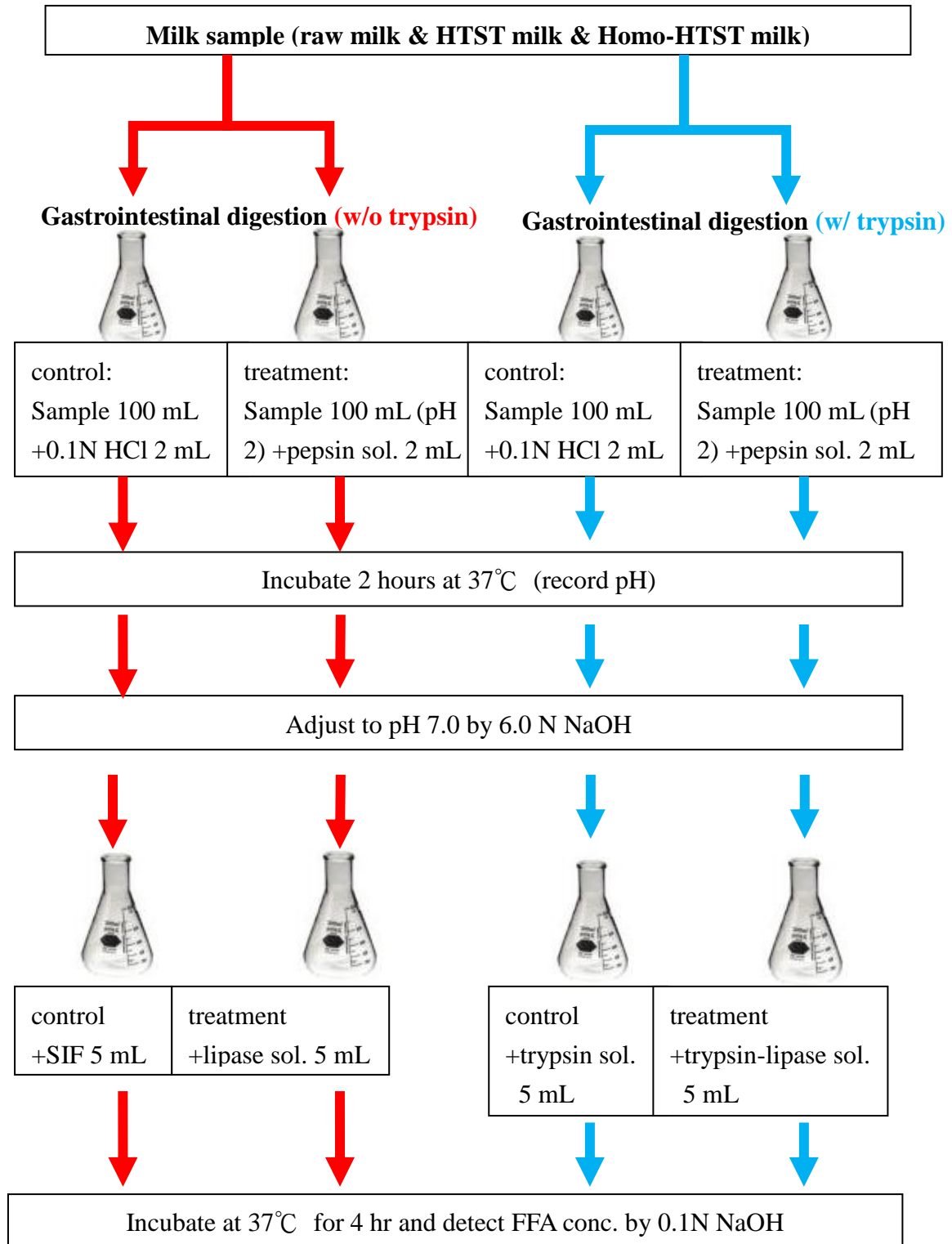


圖 13. 模擬體外胃腸道消化試驗流程圖。

Fig. 13. Schematic representation of the procedure of milk *in vitro* gastrointestinal digestion test.

樣以 6 N HCl 調整至 pH 2.0，並分成處理組與控制組二組，各 100 mL。控制組與處理組分別加入 0.1 N HCl 2.0 mL 及胃蛋白酶溶液 2.0 mL，之後立刻置入 37°C 恆溫水浴槽內，以 95 rpm 震盪 2 hr。震盪完畢後以 0.1 N NaOH 將控制組與處理組滴定至 pH 7.0，並紀錄滴定量 (圖 14)。

游離脂肪酸濃度 (mM)

$$\begin{aligned} &= \frac{[(\text{處理組滴定量} - \text{控制組滴定量 (mL)}) \times \frac{0.1}{1000} (\text{NaOH 之莫耳數})]}{0.1 \text{ L (牛乳量)}} \times 1000 \\ &= \text{處理組滴定量} - \text{控制組滴定量 (mL)} \end{aligned}$$

(三) 統計分析

本實驗採完全逢機試驗設計 (completely randomized design; CRD) 之裂區 (split-plot) 處理安排，並以 Statistical Analysis System (SAS, 1999) 統計軟體，以一般線性模式分析 (General Linear Model's Procedure; GLM) 比較各處理組平均值間之差異性。

Gastric digestion test

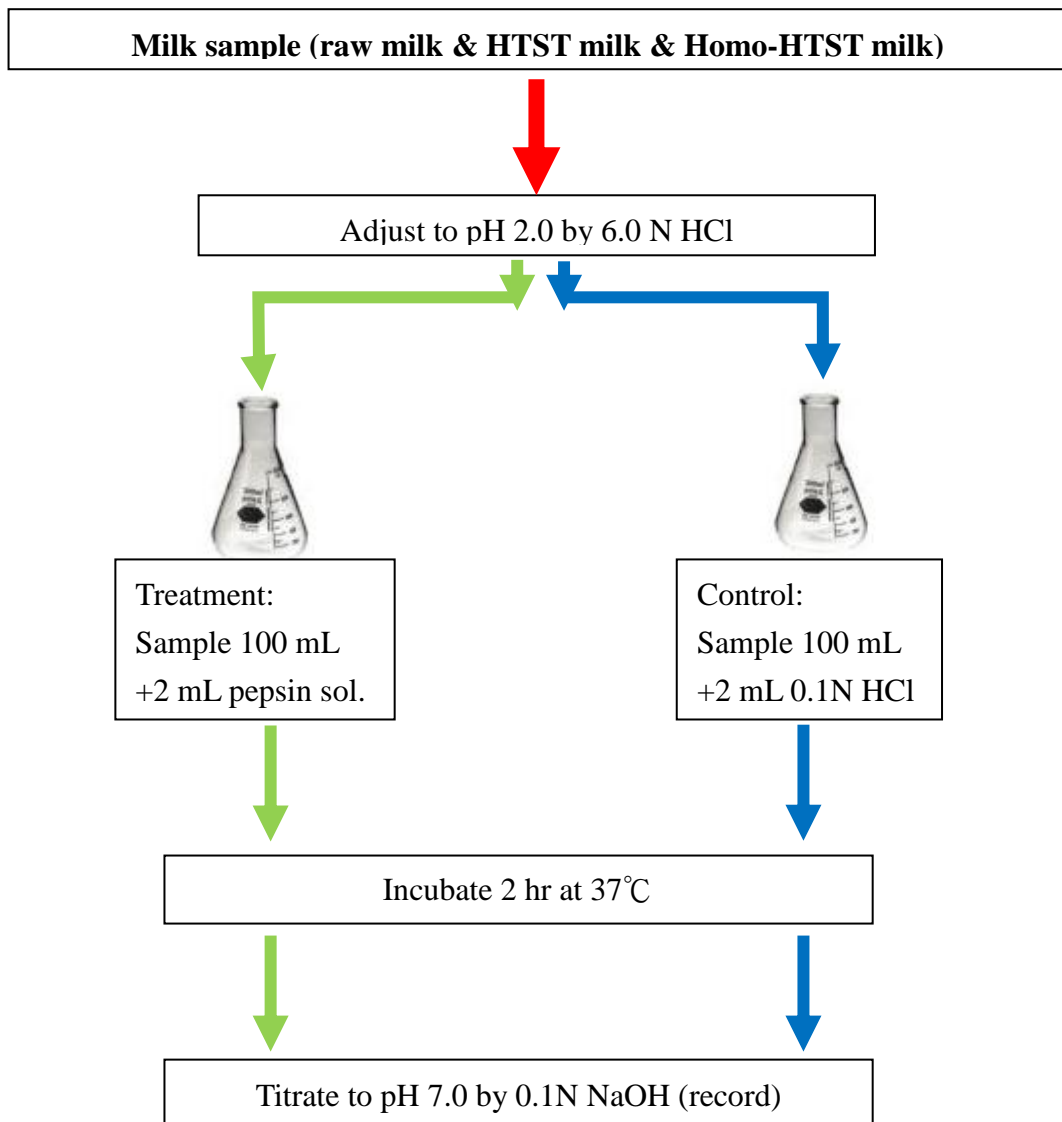


圖 14. 模擬體外胃部消化試驗流程圖。

Fig. 14. Schematic representation of the procedure of milk *in vitro* gastric digestion test.

V、結果與討論

一、模擬腸道消化試驗

單以胰解脂酶進行模擬腸道之消化之試驗。結果顯示 (圖 15)，生乳與 HTST 鮮乳經解脂酶作用後之游離脂肪酸 (FFA) 釋出量於 4 hr 內皆無顯著差異。然而均質 HTST 鮮乳之游離脂肪酸釋出量，於 30 min 開始與生乳及 HTST 鮮乳出現差異 ($p < 0.05$)，亦即均質 HTST 鮮乳於 30 min 時達 37.1 ± 1.2 mM，生乳及 HTST 鮮乳則分別為 32.2 ± 1.7 mM 及 33.4 ± 0.8 mM。且均質 HTST 鮮乳於 240 min 時釋出濃度達 82.4 ± 6.2 mM，亦顯著高於其於二者 ($p < 0.05$)。均質 HTST 鮮乳之乳脂水解程度大於生乳及 HTST 鮮乳，顯示均質脂肪球膜對於胰解脂酶有較高的親和力，而未均質之乳脂肪球膜確實較不利於乳脂肪之水解。此結果與 Berton *et al.* (2009) 以生乳脂肪球與均質乳脂肪球為材料，探討胰解脂酶相關蛋白 1、2 (lipase-related proteins 1 and 2) 對胰解脂酶解脂作用之影響，以及 Ye *et al.* (2010) 以生乳與均質重組乳為材料，探討胰酶以及膽鹽對其乳脂肪之解脂作用實驗之結果相似。

圖 16 係以胰解脂酶配合胰蛋白酶進行模擬腸道消化之游離脂肪酸釋出情形。圖中均質 HTST 鮮乳之游離脂肪酸釋出，於 20 min 即達 36.6 ± 5.1 mM，開始和生乳 (25.2 ± 1.9 mM) 及 HTST 鮮乳

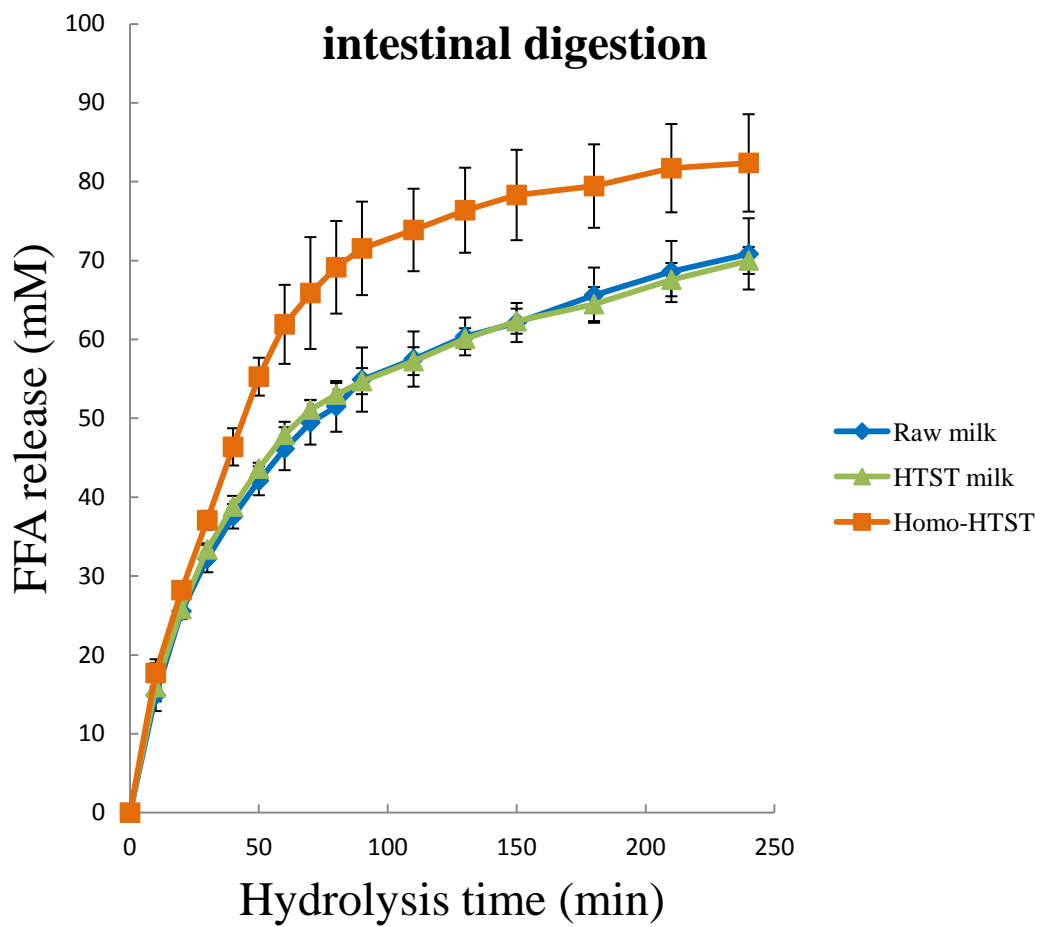


圖 15. 解脂酶於無胰蛋白酶模擬腸道消化對乳樣品脂肪酸釋出量之影響。
Fig. 15. Effect of lipase *in vitro* milk intestinal digestion without trypsin on release amount of free fatty acids.

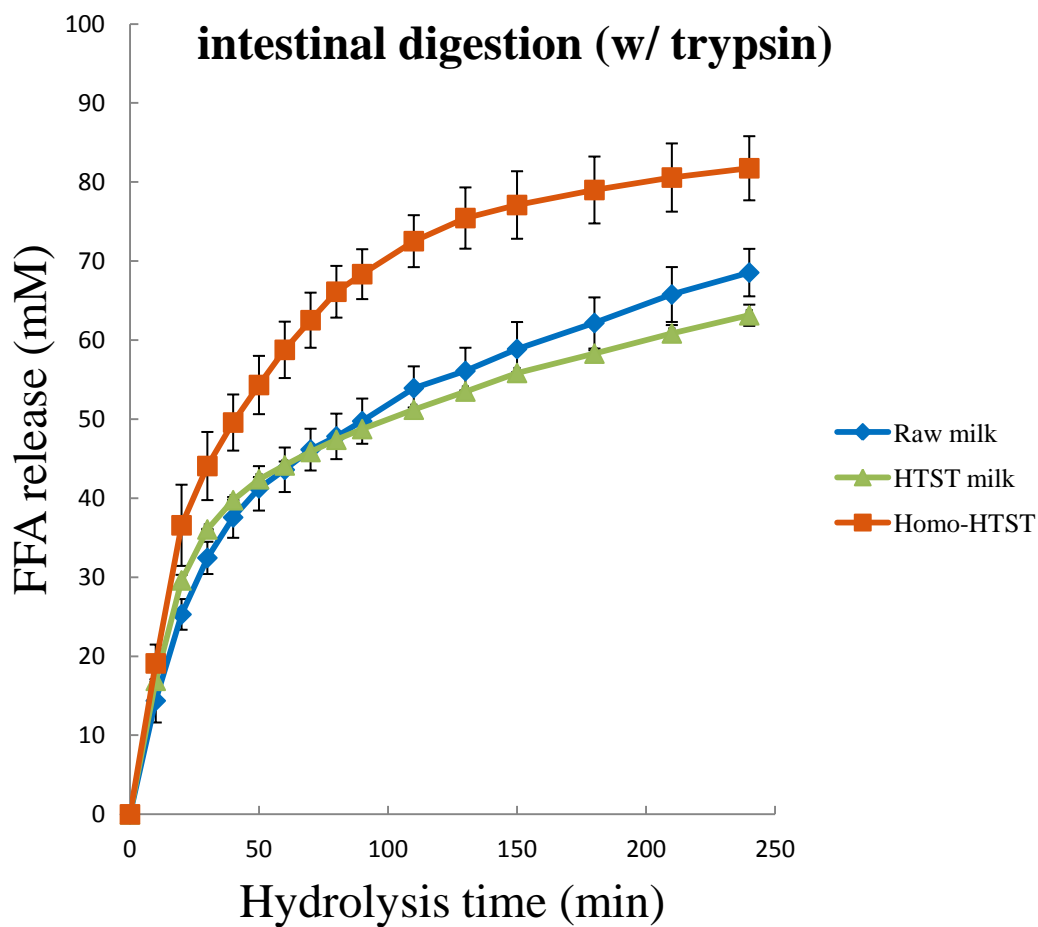


圖 16. 解脂酶於含胰蛋白酶模擬腸道消化對乳樣品脂肪酸釋出量之影響。
 Fig. 16. Effect of lipase *in vitro* milk intestinal digestion with trypsin on release amount of free fatty acids.

(29.6 ± 0.7 mM) 呈現差異 ($p < 0.05$)。此外，均質 HTST 鮮乳於 20 min、30 min 時游離脂肪酸之釋出量，分別為 36.6 ± 5.1 mM、30min 44.1 ± 4.3 mM，亦大於無添加胰蛋白酶組 (圖 15) 之均質 HTST 鮮乳於 20 min (28.2 ± 0.4 mM) 與 30 min (37.1 ± 1.2 mM) 時之釋出量 ($p < 0.05$)。圖 16 之 HTST 鮮乳於 20 和 30 min 之游離脂肪酸釋出濃度分別為 29.6 ± 0.7 mM、 36.1 ± 0.1 mM，亦大於相同時段下無胰蛋白酶處理 (圖 15) 之 HTST 鮮乳 (25.8 ± 1.3 mM、 33.4 ± 0.8 mM) ($p < 0.05$)。

然而，雖然胰蛋白酶處理可增加 HTST 鮮乳與均質 HTST 鮮乳於 20 及 30 min 之游離脂肪酸釋出量，但不影響 240 min 之游離脂肪酸濃度。此現象顯示胰蛋白酶於腸道消化試驗前期，能提升 HTST 鮮乳與均質 HTST 鮮乳之乳脂肪水解速率。而腸道之消化對胰蛋白酶處理的有或無，並不影響生乳乳脂肪的水解情形。造成此差異的原因，可能是由於熱處理能造成脂肪球膜些許的不安定，而均質後的乳脂肪球膜含有豐富的乳蛋白質外層 (casein & whey)，因此易受胰蛋白酶之影響。此同時也表示乳脂肪消化率之提升主要是來自均質處理之影響，而生乳只經 HTST 加熱處理並不能有效提升乳脂於模擬腸道消化 240 min 內之游離脂肪酸釋出量。

此外，均質 HTST 鮮乳與生乳於圖 15、圖 16 實驗結果與 Ye

et al. (2010) 針對未加熱重組乳之結果 (圖 11b) 類似, 但差異較為顯著, 可能是本試驗之均質 HTST 鮮乳經過加熱之故。

二、模擬胃腸道消化試驗

將乳樣品進行不含胰蛋白酶之模擬體外胃腸道消化試驗, 結果示於圖 17, 可發現均質 HTST 鮮乳之乳脂水解程度仍有大於生乳及 HTST 鮮乳的趨勢, 但並無顯著差異。此結果可能是由於胃蛋白酶能夠水解脂肪球膜蛋白, 造成組成結構改變, 使得乳乳脂肪球膜不穩定, 而有助於後續解脂酶之水解能力所造成。再者, 其生乳與均質 HTST 鮮乳於 20 min 前, 以及 HTST 鮮乳 30 min 前之游離脂肪酸釋出, 均顯著高於不經模擬胃部消化組別 (圖 15) ($p < 0.05$)。如 *Ye et al.* (2010) 所敘述, 生乳脂肪球膜結構中確實含有某些不利乳脂水解因子, 根據此實驗結果, 可以合理推斷乳脂肪球膜蛋白極可能為該不利因子。

含有胰蛋白酶之模擬胃腸道消化試驗結果 (圖 18), 與圖 17 相似。生乳、HTST 鮮乳與均質 HTST 鮮乳於水解初期之游離脂肪酸釋放量, 相較於圖 17 並無顯著的提升, 且 HTST 鮮乳與均質 HTST 鮮乳直至水解後期均與生乳無顯著差異, 此結果可能是由於兩者之乳脂肪球膜蛋白多數於二小時的胃部消化中降解, 導致胰蛋白酶失去作用目標之故。此外, 圖 18 之生乳與 HTST 鮮乳於 20 min 前,

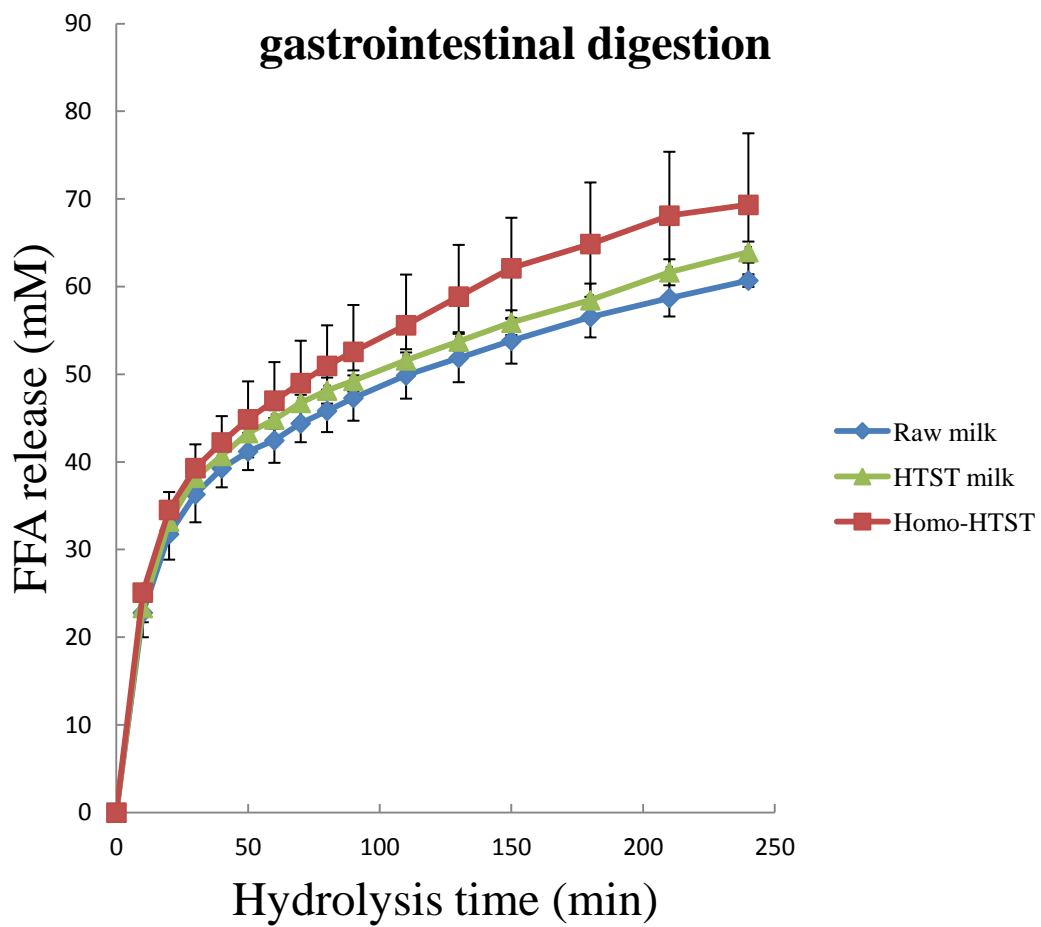


圖 17. 解脂酶於無胰蛋白酶模擬胃腸道消化對乳樣品脂肪酸釋出量之影響。
Fig. 17. Effect of lipase *in vitro* milk gastrointestinal digestion without trypsin on release amount of free fatty acids.

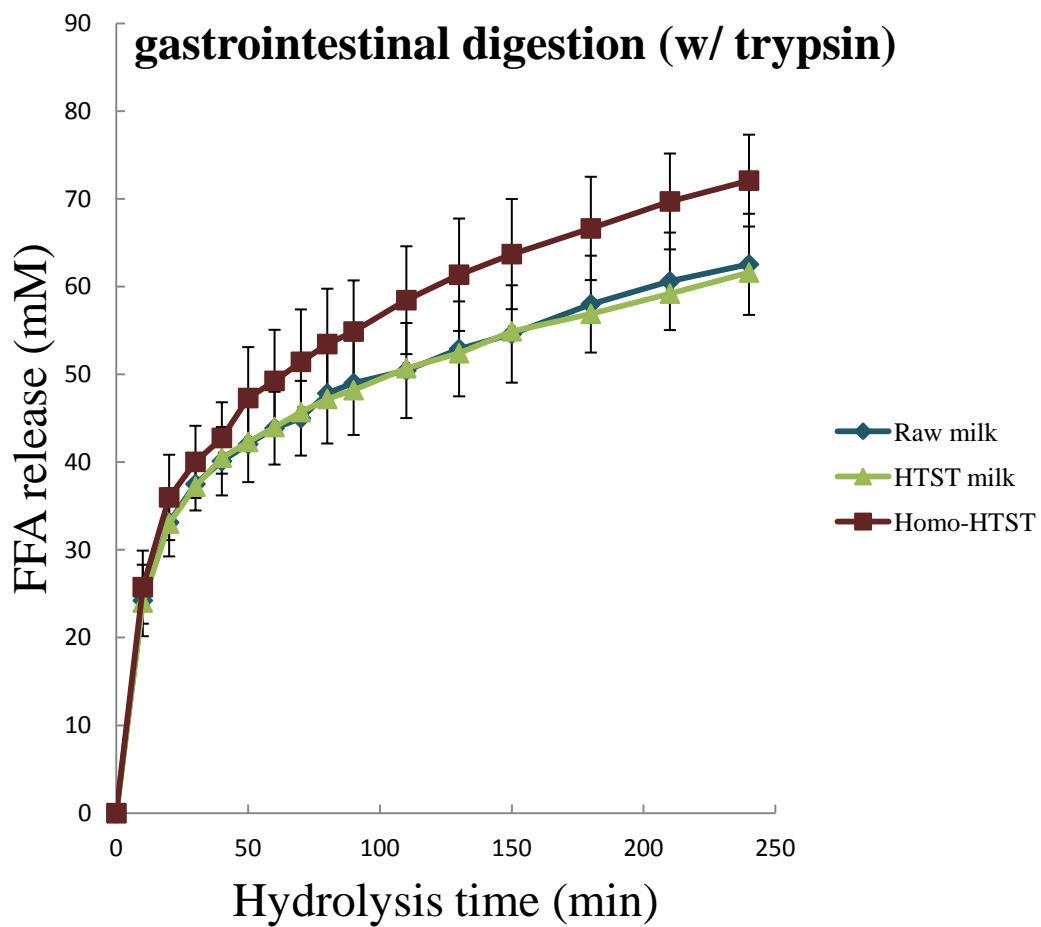


圖 18. 解脂酶於含胰蛋白酶模擬胃腸道消化對乳樣品脂肪酸釋出量之影響。

Fig. 18. Effect of lipase *in vitro* milk gastrointestinal digestion with trypsin on release amount of free fatty acids.

以及均質 HTST 鮮乳 10 min 前之游離脂肪酸釋出量，均顯著高於含有胰蛋白酶之模擬腸道消化組別 (圖 16) ($p < 0.05$)，同時，其生乳與 HTST 鮮乳於 30 min 前，及均質 HTST 鮮乳 20 min 前之游離脂肪酸釋出量，亦顯著高於無胰蛋白酶之模擬腸道消化組別 (圖 15) ($p < 0.05$)。

另一方面，以相同乳樣進行不同消化試驗，其模擬胃腸道消化試驗於 240 min 之游離脂肪酸最終濃度有小於腸道消化之趨勢，相差約 10~15 mM。推測是因為試驗所使用之胃蛋白酶含有解脂酶活性，導致部分乳脂於胃部消化期間分解所造成，故藉由模擬胃部消化試驗將其證明。

結果顯示 (圖 19)，生乳、HTST 鮮乳以及均質 HTST 鮮乳於模擬胃部消化試驗中分別釋出 12.4 ± 1.1 、 10.6 ± 0.6 以及 11.2 ± 0.7 mM 的游離脂肪酸。證明胃蛋白酶中含有胃解脂酶活性，造成模擬胃腸道消化試驗之游離脂肪酸最終濃度有低於腸道消化之趨勢。值得一提的是胃蛋白酶所含有的胃解脂酶於 pH 7.0 環境下幾乎沒有活性，因此不會影響乳脂肪於腸道的消化情形。

三、模擬胃腸道與腸道消化對於乳脂水解之影響

(一) 無胰蛋白酶之處理

此試驗設計之目的在於探討胃部消化以及胰蛋白酶對於乳脂肪

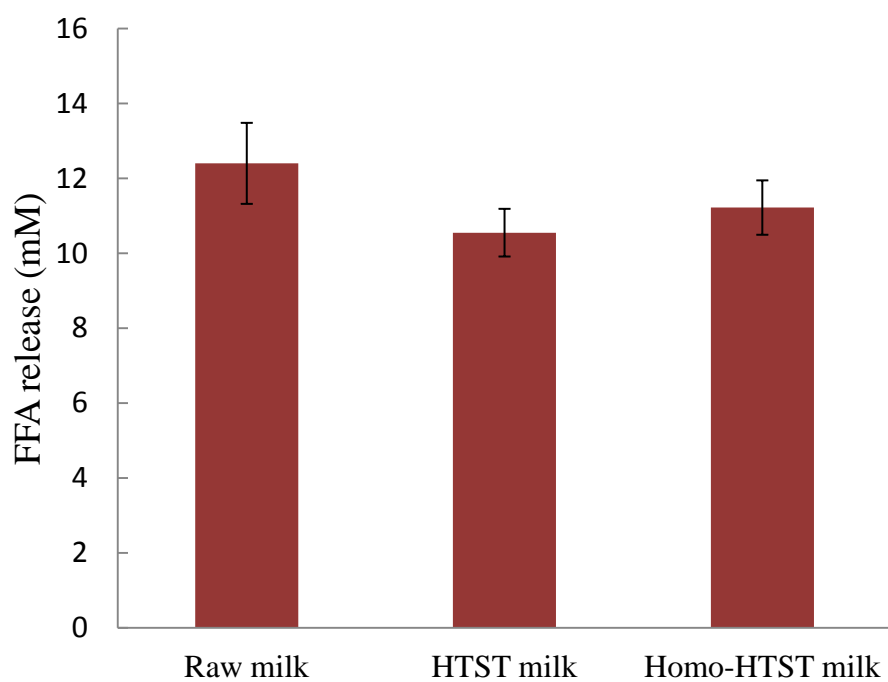


圖 19. 模擬胃部消化期間之牛乳游離脂肪酸釋出濃度。

Fig. 19. Level of free acid acids released during gastric digestion test.

球消化是否有影響。雖然相同乳樣品以模擬胃腸道消化與腸道消化試驗所釋出之游離脂肪酸最終濃度無顯著差異，但由於平均值之差異，而很難直接比較水解曲線之間的斜率情形，因此擬以各實驗組於 240 min 之游離脂肪酸濃度定為 100%，再行比較相同乳樣品於不同處理下之乳脂水解速率。

圖 20 結果指出，模擬胃腸道消化 (GI) 之生乳乳脂肪於 50 min 內之水解程度大於模擬腸道消化 (I) ($p < 0.05$)，於 60 min 後則無顯著差異。而 HTST 鮮乳之結果 (圖 21) 與生乳極為相似。

而均質 HTST 鮮乳之結果 (圖 22) 亦顯示，以胃腸道消化之均質 HTST 鮮乳於 30 min 內之乳脂肪水解率大於腸道消化處理 ($p < 0.05$)，40 及 50 min 時兩者無差異，60 至 150 min 時模擬腸道消化之乳脂水解程度則大於胃腸道消化 ($p < 0.05$)。亦即，接受胃部消化處理的乳脂肪球於腸部消化初期有較高的消化率，但中後期之消化程度則低於未受胃部消化處理之組別，此結果相當令人玩味。由於均質處理會造成生乳脂肪球膜結構改變，形成各式不同型態的均質乳脂肪球膜 (Michalski and Januel, 2006)，或許其中某些型態受胃蛋白酶處理後，會更不利其中乳脂水解。此類型脂肪球可能擁有較堅韌的脂肪球膜，或是較不利於解脂酶附著，可於消化過程中較能維持完整脂肪球結構，因此可能有較高的機率以完整脂肪球之形式被腸道細胞吸收。

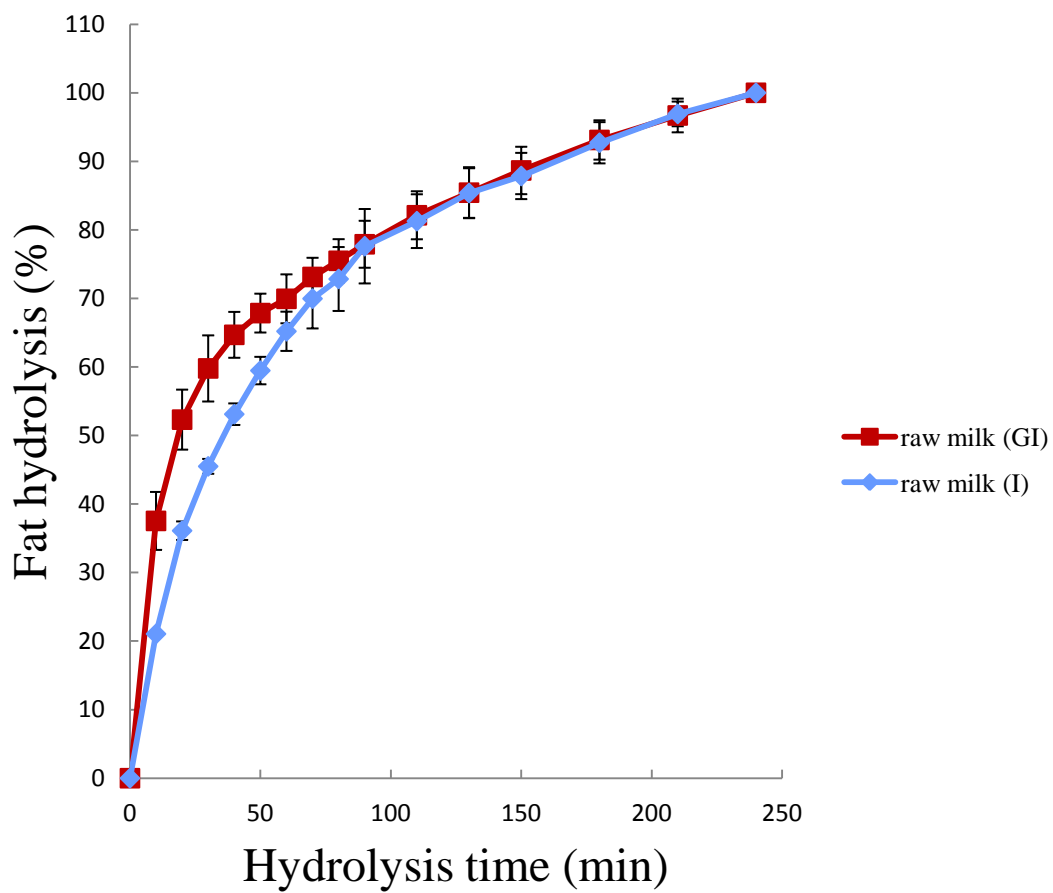


圖 20. 不含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之生乳乳脂肪水解率。
 Fig. 20. Raw milk fat hydrolysis rate on *in vitro* **trypsin absence** gastrointestinal digestion (GI) and intestinal digestion (I).

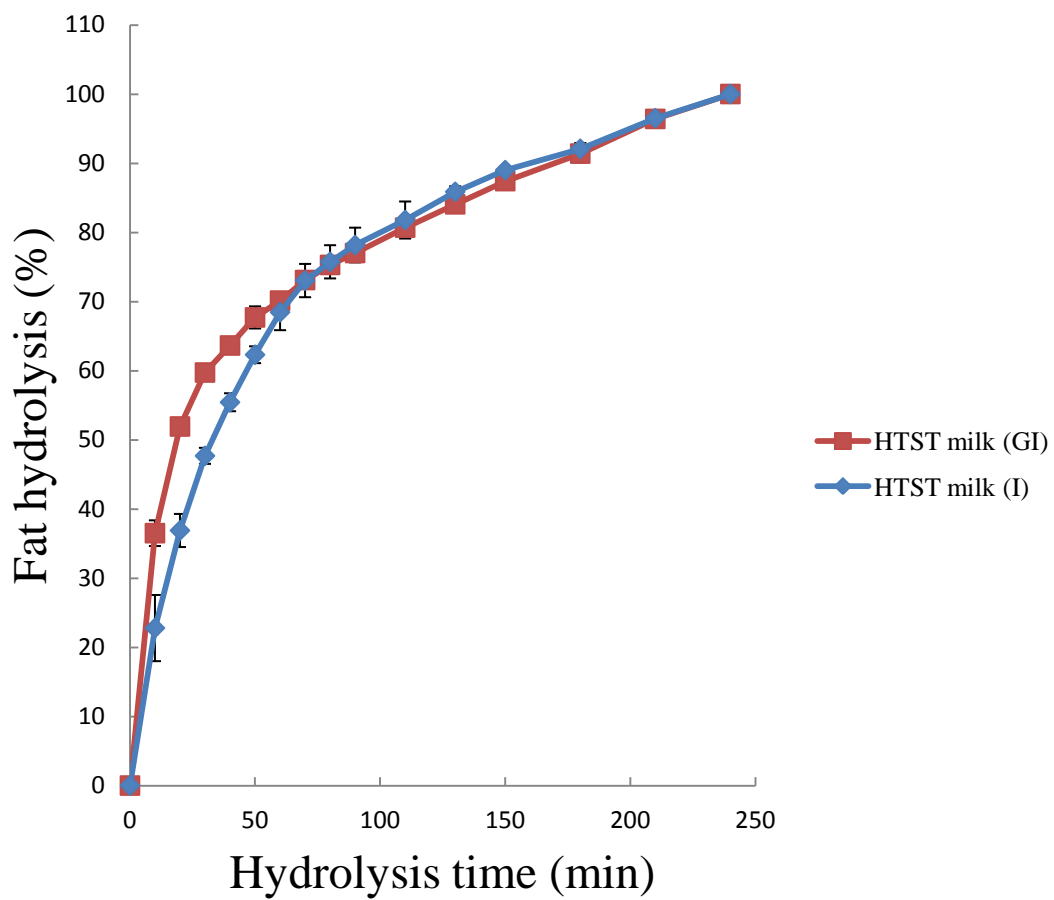


圖 21. 不含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之 HTST 鮮乳乳脂肪水解率。

Fig. 21. HTST fresh milk fat hydrolysis rate on *in vitro* **trypsin absence** gastrointestinal digestion (GI) and intestinal digestion (I).

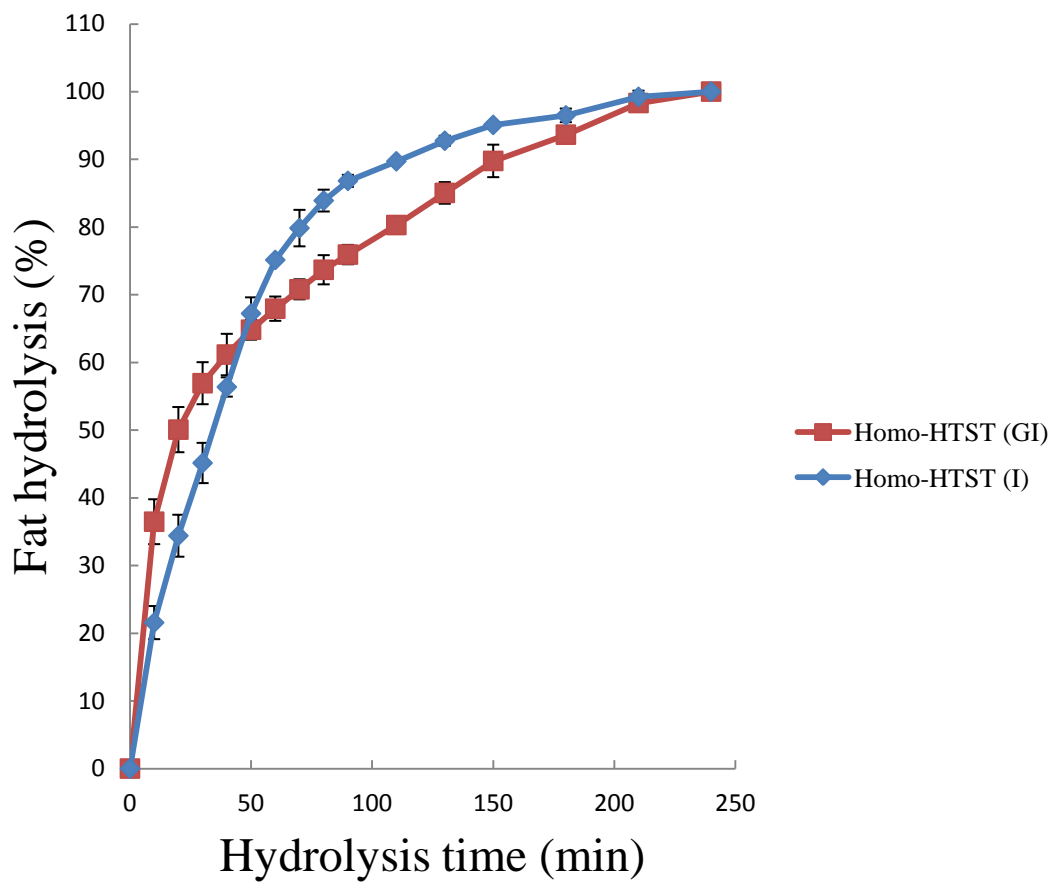


圖 22. 不含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之均質 HTST 鮮乳乳脂肪水解率。

Fig. 22. Homo-HTST fresh milk fat hydrolysis rate on *in vitro* **trypsin absence** gastrointestinal digestion (GI) and intestinal digestion (I).

惟不論如何，圖 20、圖 21 與圖 22 之結果均顯示，經胃部消化後的乳樣品，其乳脂肪於腸道消化初期均有較高之水解速率。

(二) 含胰蛋白酶之處理

以胰蛋白酶處理之結果顯示在圖 23、24 以及 25，分別對應未受胰蛋白酶處理的圖 20、21 以及 22。其中，含胰蛋白酶之生乳 (圖 23) 乳脂水解率曲線幾乎與圖 20 重疊，並無顯差異。

圖 24 為 HTST 鮮乳乳脂於含有胰蛋白酶之模擬胃腸道以及腸道消化之斜率情形，模擬胃腸道消化之乳脂肪水解程度只於 20 min 內大於模擬腸道消化 ($p < 0.05$)，於 30 min 後無顯著差異。於圖 24 中可知，HTST 鮮乳於模擬腸道消化 20 至 50 min 時，其乳脂水解程度較圖 21 有顯著的提升，顯示胰蛋白酶之存在可提升 HTST 鮮乳乳脂於腸道消化前期水解速率。

圖 25 之均質 HTST 鮮乳模擬胃腸道消化乳脂水解率曲線 (GI w/ trypsin) 也幾乎與圖 22 (GI) 重合。然而模擬腸道消化試驗之乳脂肪水解率曲線 (I w/ trypsin) 於 20 min 即開始與模擬胃腸道消化無顯著差異，70 min 後則大於模擬胃腸道消化 ($p < 0.05$)，且 20 和 30 min 之水解率亦大於圖 22 之未受胰蛋白酶處理組 (I) ($p < 0.05$)，因此不難發現模擬腸道消化試驗之乳脂水解率曲線 (I w/ trypsin) 有趨向於 G w/ trypsin 之趨勢，代表胰蛋白酶能取代部分胃部消化功能

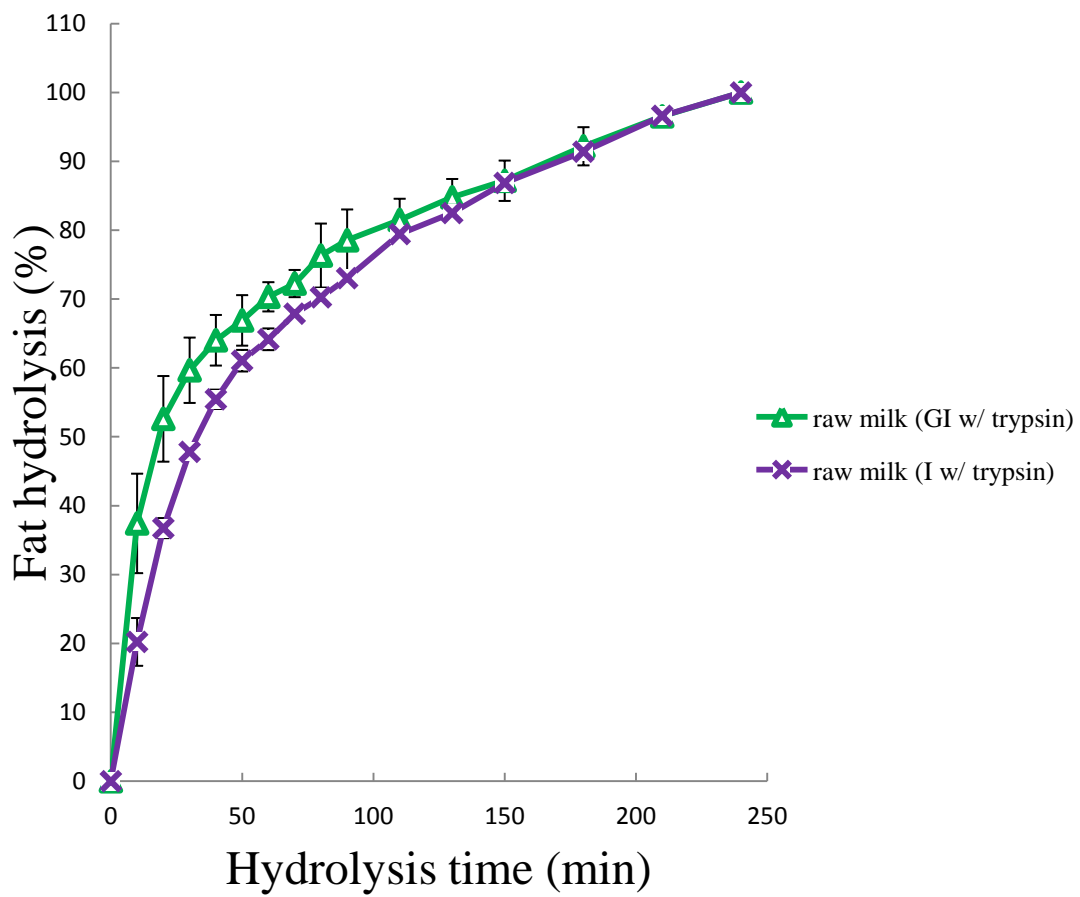


圖 23. 含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之生乳乳脂肪水解率。
 Fig. 23. Raw milk fat hydrolysis rate on *in vitro* **trypsin presence** gastrointestinal digestion (GI w/ trypsin) and intestinal digestion (I w/ trypsin).

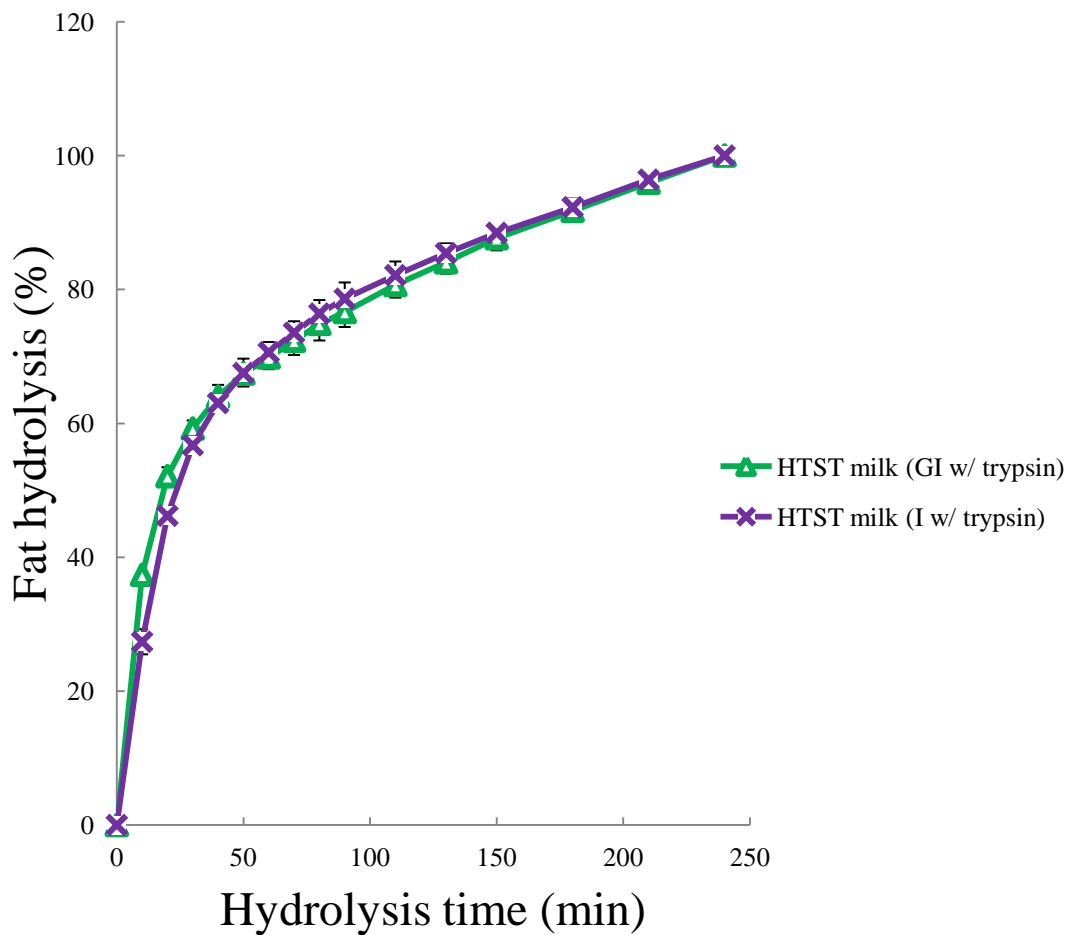


圖 24. 含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之 HTST 鮮乳乳脂肪水解率。

Fig. 24. HTST fresh milk fat hydrolysis rate on *in vitro* trypsin presence gastrointestinal digestion (GI w/ trypsin) and intestinal digestion (I w/ trypsin).

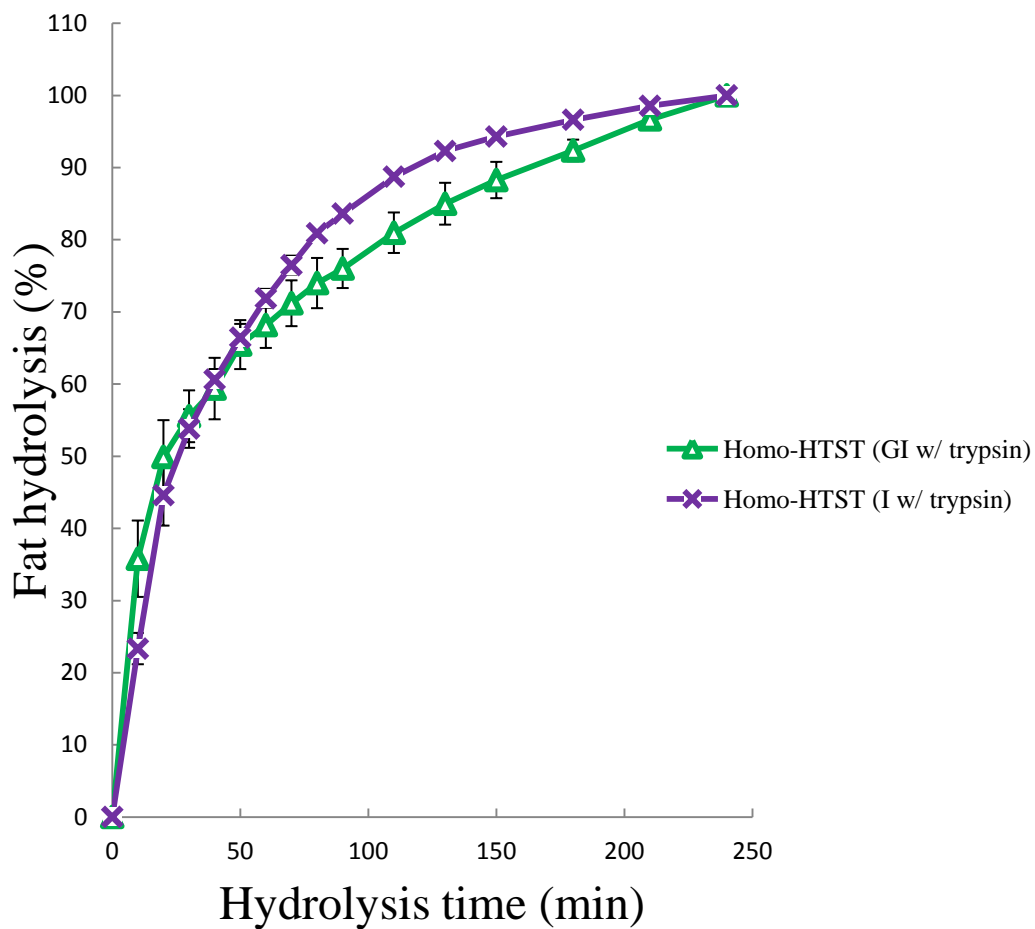


圖 25. 含胰蛋白酶之模擬體外腸道及胃腸道消化之均質 HTST 鮮乳乳脂肪水解率。

Fig. 25. Homo-HTST fresh milk fat hydrolysis rate on *in vitro* trypsin presence gastrointestinal digestion (GI w/ trypsin) and intestinal digestion (I w/ trypsin).

，可造成乳脂肪球膜之不穩定。此結果再次顯示，胰蛋白酶能提升 HTST 鮮乳與均質 HTST 鮮乳乳脂於模擬腸道消化試驗前期水解速率。

此外，由圖 20 至圖 25 結果可發現，於模擬胃腸道消化試驗中，胰蛋白酶存在之有無並不影響相同乳樣品之乳脂水解情形，顯示 2 hr 之胃部消化可消除球膜上影響乳脂水解因子。

綜合以上結果，牛乳經胃部消化後，確實有助於提高乳脂肪於腸道初期之消化率。而胰蛋白酶只對 HTST 鮮乳與均質 HTST 鮮乳乳脂消化有幫助，對生乳乳脂則無顯著影響。如 Vanderghem *et al.* (2011) 所述，影響生乳脂肪球膜穩定的乳脂肪球膜蛋白確實能被胰蛋白酶所分解，因此圖 23 與圖 20 之模擬腸道消化結果無差異很可能是因為胰蛋白酶濃度不足造成。而這也就表示生乳脂肪球膜比均質後的脂肪球膜更堅韌，更不容易被瓦解，與 Ye *et al.* (2011) 之研究結果相呼應，也再次證明生乳脂肪較不易被水解。此等結果似異於過去食材中脂肪於胃及腸道之消化模式而相當令人玩味。

此實驗結果也指出加熱條件對於乳脂消化的重要性。Ye *et al.* (2002) 研究指出，生乳加熱會造成部分脂肪球膜蛋白自膜表面散失而降低乳脂肪球膜的穩定性，Houlihan *et al.* (1992) 亦指出加熱會導致部分乳脂自脂肪球釋出，此或許為乳脂肪初期消化率提升之原因。

至於均質鮮乳或許也有相同情形。如 Singh and Waungana (2001) 所敘述，隨著加熱程度的增加，牛乳於胃部凝乳強度隨之降低，致使通過胃部的時間也愈快，如此一來即可能會影響乳脂肪球於腸道初期的消化率。因此，鮮乳乳脂肪於何種加熱殺菌條件下能有最佳的消化率，值得更進一步探討。

VI、結論

本研究以生乳、HTST 鮮乳以及均質 HTST 鮮乳，於胰蛋白酶有無之條件下，進行體外模擬胃腸道或腸道消化試驗。試驗結果顯示，均質 HTST 鮮乳於各消化處理組均有最大量之游離脂肪酸釋出，唯模擬胃腸道消化試驗結果未達顯著差異。乳樣品經胃蛋白酶消化後，可確實提高乳脂於腸道消化初期之水解率，而胰蛋白酶只對 HTST 鮮乳及均質 HTST 鮮乳消化初期之水解率提高有所影響，對生乳則無影響。綜上所述，於乳脂肪消化過程中，胃蛋白酶與胰蛋白酶之作用為扮演一輔助角色，可提升乳脂肪球於腸道消化初期之消化速率。然而，胃部消化是否不利於均質後之部分乳脂肪消化，而導致後期水解率的下降，則有待更進一步的研究證明。

VII、參考文獻

- 林慶文。1993。乳製品之機能與特性，第40-41頁、第127-127頁。華香園出版社，台北市。
- 姜樹興。2009。動物營養學原理，第49-51頁、第67-68頁、第153-154頁。華香園出版社，台北市。
- 張勝善。1983。牛乳與乳製品，第59-59頁，第72-73頁、224-225頁、256-262頁。長河出版社，台北市。
- Argova, N., D. G. Lemay, and J. B. German. 2008. Milk fat globule structure and function: nanoscience comes to milk production. *Trends Food Sci. Technol.* 19:617-623.
- Berton, A., C. Sebban-Kreuzer, S. Rouvellac, C. Lopez, and I. Crenon. 2009. Individual and combined action of pancreatic lipase and pancreatic lipase-related proteins 1 and 2 on native versus homogenized milk fat globules. *Mol. Nutr. Food Res.* 53:1592-1602.
- Berton, A., S. Rouvellac, B. Robert, F. Rousseau, C. Lopez, and I. Crenon. 2012. Effect of the size and interface composition of milk fat globules on their *in vitro* digestion by the human pancreatic lipase: Native versus homogenized milk fat globules. *Food Hydrocolloids.* 29:123-134.
- Chong, B. M., P. Reigan, K. D. Mayle-Combs, D. J. Orlicky, and J. L. McManaman. 2011. Determinants of adipophilin function in milk lipid formation and secretion. *Trends Endocrinol. Metab.* 22:211-217.
- Dewettinck, K., R. Rombaut, N. Thienpont, T. T. Le, K. Messens, and J. van Camp. 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* 18:436:457.
- El-Loly, M. M. 2011. Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 61:7-32.
- Evers, J. M. 2004. The milk fat globule membrane-composition and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. *Int. Dairy J.* 14:661-674.
- Golding, M., and T. J. Wooster. 2010. The influence of emulsion

- structure and stability on lipid digestion. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15:90-101.
- Hamosh, M., J. A. Peterson, T. R. Henderson, C. D. Scallan, R. Kiwan, R. L. Ceriani, M. Armand, N. R. Mehta, and P. Hamosh. 1999. Protective Function of Human Milk: The Milk Fat Globule. *Semin. Perinatol.* 23:242-249.
- Harrison, R. 2006. Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. *Int. Dairy J.* 16:546-554.
- Heid, H. W., and T. W. Keenan. 2005. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *Eur. J. Cell Biol.* 84:245-258.
- Houlihan, A. V., P. A. Goddard, S. M. Nottingham, B. J. Kitchen, and C. J. Masters. 1992. Interactions between the bovine milk fat globule membrane and skim milk components on heating whole milk. *J. Dairy Res.* 59:187-195.
- Koletzko, B., and M. Rodriguez-Palmero. 1999. Polyunsaturated fatty acids in human milk and their role in early infant development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 4:269-284.
- Lee, S. L., and J. W. Sherbon. 2002. Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. *J. Dairy Res.* 69:555-567.
- Lopez, C., M. N. Madec, and R. Jimenez-Flores. 2010. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chem.* 120:22-33.
- Mather, I. H. 2000. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 83:203-247.
- Mather, I. H., and T. W. Keenan. 1998. Origin and secretion of milk lipids. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 3:259-273.
- Mather, I. H., C. H. Sullivan, and P. J. Madara. 1982. Detection of xanthine oxidase and immunology related proteins in fractions from bovine mammary tissue and milk after electrophoresis in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate. *Biochem. J.* 202:217-323.
- McManaman, J. L., C. A. Palmer, R. M. Wright, and M. C. Neville. 2002. Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: Evidence of a role in lipid secretion. *J. Physiol.* 545:567-569.
- McManaman, J. L., W. Zabaronick, J. Schaack, and D. J. Orlicky. 2003.

- Lipid droplet targeting domains of adipophilin. *J. Lipid Res.* 44:668-673.
- Michalski, M. C., and C. Januel. 2006. Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends Food Sci. & Technol.* 17:423-437.
- Michalski, M. C., F. Michel, and C. Geneste. 2002. Appearance of submicronic particles in the milk fat globule size distribution upon mechanical treatments. *Dairy Sci. Technol.* 82:193-208.
- Mun, S., E. A. Decker, and D. J. McClements. 2007. Influence of emulsifier type on *in vitro* digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Res. Int.* 40:770-781.
- Narasinga Rao, B. S., and T. Prabhavathi. 1978. An *in vitro* method for predicting the bioavailability of iron from foods. *Am. J. Chin. Nutr.* 31:169-75.
- Ogg, S. L., A. K. Weldon, L. Dobbie, A. J. H. Smith, and I. H. Mather. 2004. Expression of butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:10084-10089.
- Paquin, P. 1999. Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins and polysaccharides. *Int. Dairy J.* 9:329-335.
- Robenek, H., O. Hofnagel, I. Buers, S. Lorkowski, M. Schnoor, M. J. Robenek, H. Heid, D. Troyer, and N. J. Severs. 2006. Butyrophilin controls milk fat globule secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:10385-10390.
- Russell, T. D., C. A. Palmer, D. J. Orlicky, E. S. Bales, B. H. Chang, L. Chan, and J. L. McManaman. 2008. Mammary glands of adipophilin-null mice produce an amino-terminally truncated form of adipophilin that mediates milk lipid droplet formation and secretion. *J. Lipid Res.* 49:206-216.
- Silanikove, N., and F. Shapiro. 2007. Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activity in bovine milk: Physiological and technological implications. *Int. Dairy J.* 17:1188-1194.
- Silanikove, N., U. Merinb, and G. Leitner. 2006. Physiological role of indigenous milk enzymes: An overview of an evolving picture. *Int. Dairy J.* 16:533-545.
- Singh, H. 2006. The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11:154-163.

- Singh, H., and A. Waungana. 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *Int. Dairy J.* 11:543-551.
- Singh, H., A. Ye, and D. Horne. 2009. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Prog. Lipid Res.* 48:92-100.
- Vanderghem, C., F. Francis, S. Danthine, C. Deroanne, M. Paquot, E. D. Pauw, and C. Blecker. 2011. Study on the susceptibility of the bovine milk fat globule membrane proteins to enzymatic hydrolysis and organization of some of the proteins. *Int. Dairy J.* 21:312-318.
- Wiking, L., J. Stagsteda, L. Björck, and J. H. Nielsen. 2004. Milk fat globule size is affected by fat production in dairy cows. *Int. Dairy J.* 14:909-913.
- Wu, C. C., K. E. Howell, M. C. Neville, J. R. Yates, and J. L. McManaman. 2000. Proteomics reveal a link between the endoplasmic reticulum and lipid secretory mechanisms in mammary epithelial cells. *Electrophoresis.* 21:3470-3482.
- Ye, A., H. Singh, D. J. Oldfield, and S. Anema. 2004a. Kinetics of heat-induced association of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with milk fat globule membrane in whole milk. *Int. Dairy J.* 14:389-398.
- Ye, A., H. Singh, M. W. Taylor, and S. Anema. 2004b. Interactions of fat globule surface proteins during concentration of whole milk in a pilot-scale multiple-effect evaporator. *J. Dairy Res.* 71:471-479.
- Ye, A., H. Singh, M. W. Taylor, and S. Anema. 2002. Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. *Int. Dairy J.* 12:393-402.
- Ye, A., J. Cui, and H. Singh. 2010. Effect of the fat globule membrane on *in vitro* digestion of milk at globules with pancreatic lipase. *Int. Dairy J.* 20:822-829.
- Ye, A., J. Cui, and H. Singh. 2011. Proteolysis of milk fat globule membrane proteins during *in vitro* gastric digestion of milk. *J. Dairy Sci.* 94:2762-2770.
- Ye, A., S. G. Anema, and H. Singh. 2008. Changes in the surface protein of the fat globules during homogenization and heat treatment of concentrated milk. *J. Dairy Res.* 75:347-353.

VIII、英文摘要

Milk fat globules are composed of a triglyceride core and a natural biological membrane, milk fat globule membrane (MFGM). Proteins account for 70% of MFGM. Certain of those proteins are important for the secretion and structural stability of milk fat globule. However, composition of MFGM is restructured after homogenization, and the newly formed membrane mainly consists of caseins and whey proteins. The aim of this study was to examine the lipolysis of milk fat in raw milk, HTST milk, and homogenized HTST milk by pancreatic lipase during *in vitro* intestinal and gastrointestinal digestion, with and without the presence of trypsin. The results of *in vitro* intestinal digestion indicated that whether presence trypsin or not, homogenized HTST milk showed higher level of free fatty acids release than raw milk and HTST milk. Releasable free fatty acids were not significantly different among raw milk, HTST milk, and homogenized HTST milk on gastrointestinal digestion. During *in vitro* gastrointestinal digestion, the hydrolysis rate of milk fat in raw milk, HTST milk, and homogenized HTST milk increased on early stage of lipolysis after pepsin digestion. However, trypsin treatment could not further increase milk fat hydrolysis rate on gastrointestinal digestion early stage of lipolysis. Homogenized HTST milk and HTST milk fat hydrolysis rate on early stage of trypsin presence *in vitro* intestinal digestion were higher than trypsin absence *in vitro* intestinal digestion. In conclusion, gastrointestinal proteases play a coordinative role to increase fresh milk fat hydrolysis on early stage of *in vitro* digestion.

IX、作者小傳

作者鄒明學，台灣省苗栗縣人，民國 77 年 4 月 27 日出生。先後畢業於苗栗縣造橋國小、造橋國中及竹南高中，於民國 95 年考試進入東海大學畜產學系，並在民國 99 年畢業同年考取母校畜產與生物科技學系研究所。追隨恩師周繼發博士，研習畜產品化學、乳品、蛋品加工及副產品應用等專業領域，學習如何利用基礎理論實際應用於畜產品加工上，以冀提升畜牧產值，增加經濟效應。此外，學生亦接受嚴謹且專業之儀器分析與邏輯思考訓練，使學生對畜產領域有了更深層的認知。承蒙恩師之悉心指導及栽培，順利於民國 101 年 10 月完成此碩士論文。