

前言

乳過氧化酵素系統主要包含三種成分，即乳過氧化酵素、硫氰酸根離子 (thiocyanate ion, SCN^-) 或碘離子 (iodide ion, I^-) 及過氧化氫 (hydrogen peroxide)，此系統自然存在於牛奶 (Reiter, 1985)，或人類及動物之唾液中 (Tenovuo, 1985)，能有效抑制革蘭氏陰性菌 (Gram-negative) 的生長 (Reiter *et al.*, 1976)。在澳大利亞國協刊載之食品標準法規 (2003) 中，指出乳過氧化酵素系統可降低或抑制肉品表面之菌群。另有報告指出，單獨使用乳過氧化酵素系統或與其他抑菌劑一起使用，皆能增加牛奶與乳製品 (Earnshaw, 1989; Gaya *et al.*, 1991; Nakada *et al.*, 1996; Zapico *et al.*, 1998)，魚類 (Huss *et al.*, 1995)，蛋類或雞肉原料 (Wolfson *et al.*, 1994; Kuo *et al.*, 1997) 之保存期限。在食物中使用乳過氧化酵素系統是安全的，因為 (1) 這三種成分皆在人類及動物體中出現；(2) 硫氰酸根離子在人類唾液及胃液中含量多；(3) 在人類唾液中存有乳過氧化酵素系統之中間產物 (OSCN^-) 及 (4) 此中間產物只短暫存在。

乳鐵蛋白可結合二個鐵離子，具有運送與吸收鐵離子、抑菌、抗氧化、調節發炎免疫反應、抗癌及抗腫瘤等多項功能 (Naidu, 2002)。從牛乳中所獲得的乳鐵蛋白被美國食品藥物管理局 (Food and Drug Administration; FDA) 視為安全物質 (generally recognized as safe, GRAS)。乳鐵蛋白在台灣則被視為一種特殊營養成分，規定在每日食用量中，總量不得高於 100 mg (台灣行政院衛生署, 2002)。

有報告指出每公斤肉中添加 2--10 mg 乳過氧化酵素即可有抑菌效果 (Elliot *et al.*, 2004)。邱 (2004) 研究乳鐵蛋白 (0、40 及 80 ppm)

對非真空包裝絞碎豬肉微生物及脂質氧化之影響，發現乳鐵蛋白在 40 ppm 時即能有抑制微生物的生長。當結合乳過氧化酵素系統及乳鐵蛋白，推測其抑菌效果可能更佳。

因此本試驗探討乳過氧化酵素系統 (含 2 或 10 ppm 乳過氧化酵素)、乳鐵蛋白 (40 ppm) 及乳過氧化酵素系統 (含 2 ppm 乳過氧化酵素) 加上乳鐵蛋白 (40 ppm) 對冷藏 (4°C) 絞碎豬肉之總菌數、假單胞菌數、硫巴比妥酸值、非血基質鐵、硫氰酸根離子殘留量及 pH 值之影響。

文獻回顧

1. 乳過氧化酵素系統 (Lactoperoxidase system)

乳過氧化酵素 - 硫氰酸根離子 - 過氧化氫之抗菌系統 (Lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide antimicrobial system, LP system) 為天然發生的系統，首次發現於生乳中。乳過氧化酵素系統亦可在淚液、唾液和其他生物體液中發現 (Reiter and Härnuly, 1984)。乳過氧化酵素系統是由三種成分組成，分別為乳過氧化酵素 (lactoperoxidase)、硫氰酸根離子 (thiocyanate, SCN^-) 和過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2)。此系統是由乳過氧化酵素催化硫氰酸根離子之氧化作用會產生多種短暫性氧化產物，在這些產物中以次硫氰酸根離子 (hypothiocyanite, OSCN^-) 為主要的抑制產物 (Siragusa and Johnson, 1989)。次硫氰酸根離子會氧化必需蛋白質之硫氫基 (essential protein sulfhydryls)，導致細胞系統功能的改變，因而造成微生物的生長受到抑制或死亡 (Pruitt and Tenovuo, 1982)。

1.1 乳過氧化酵素

1.1.1 簡介

乳過氧化酵素是過氧化酵素家族成員之一，為天然酵素，廣泛分佈於植物、人類及動物中。已純化而且乾燥的乳過氧化酵素是呈綠褐色。他們主要的功能是在過氧化氫 (Hydrogen peroxide) 的消耗下，去催化某些分子的氧化作用，而產生具有抗菌活性的反應產物。以硫氰酸根離子和鹵素 (halogen) 當二級受質 (second substrate, electron donor) 之下，能發揮抗菌效果 (Reiter and Härnuly, 1984;

Reiter and Perraudin, 1991)。存在於乳腺、唾腺和淚腺中的過氧化酵素具有相似的化學和免疫作用。而從乳汁分離出的過氧化酵素稱作乳過氧化酵素，由於以上有提到是相似的，所以在動物及人類的過氧化酵素常統稱為乳過氧化酵素 (Reiter and Härnolv, 1984)。乳過氧化酵素的生物意義是牽涉到天然宿主防禦系統對抗侵入性的微生物。此種酵素在牛乳中為生而具有的抗微生物劑之一種。最近也有報告指出，乳過氧化酵素系統也具抗病毒活性、降解各種致癌物質及保護動物細胞抵抗過氧化效應 (peroxidative effects)。藉由乳過氧化酵素催化作用所產生的反應物質，即所謂的乳過氧化酵素系統，該反應物質對哺乳動物細胞無害 (Reiter and Härnolv, 1984; Reiter and Perraudin, 1991; Wolfson and Sumner, 1993; de Wit and van Hooydonk, 1996)。

1.1.2 乳過氧化酵素之物化特性 (Physico-chemical properties of lactoperoxidase)

牛的乳過氧化酵素之物化特性列於表一。牛的乳過氧化酵素是由單一多肽鏈組成，含 612 個胺基酸殘基，分子量約 78 kDa。乳過氧化酵素為一鹼性蛋白質，有一高等電點約 9.6。該分子含有 10% 碳水化合物且具有 5 個 potential N-glycosylation sites。在乳過氧化酵素的催化中心之血基質 (haem group) 為 protoporphyrin IX，透過雙硫鍵共價結合到多肽鏈上 (Thanabal and La Mar, 1989)。這也指出該酵素分子沒有自由態硫醇 (free thiol, -SH) 存在 (Ekstrand, 1994)。乳過氧化酵素的鐵含量為 0.07%，每一乳過氧化酵素分子對應一鐵原子，形成血基質的一部分 (圖一)。

表一、牛乳過氧化酵素的物化特性

Table 1. Physico-chemical characteristics of bovine lactoperoxidase

Characteristic	Data
Molecular weight	78431 Da
Amino acid residues	612
Half cystine residues	15
Carbohydrate content	10%
Iron content	0.07%
Prosthetic group	hame: protoporphyrin IX
Iso-electric point	9.6
Secondary structure	23% α , 65% β , 12% unordered
Absorptivity $\epsilon_{412 \text{ nm}}$	112.3 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Absorptivity 280 nm	14.9--15.0, 1%, 1 cm
Redox potential E_m	-191 mV

(Kussendrager and van Hooijdonk, 2000)

鈣離子強而有力的結合到乳過氧化酵素，穩定酵素分子構形 (conformation)，鈣離子對乳過氧化酵素結構完整性而言，似乎非常重要的 (Booth *et al.*, 1989)。多肽鏈的摺疊結構為 23% α 、65% β 及 12% 無次序的結構。

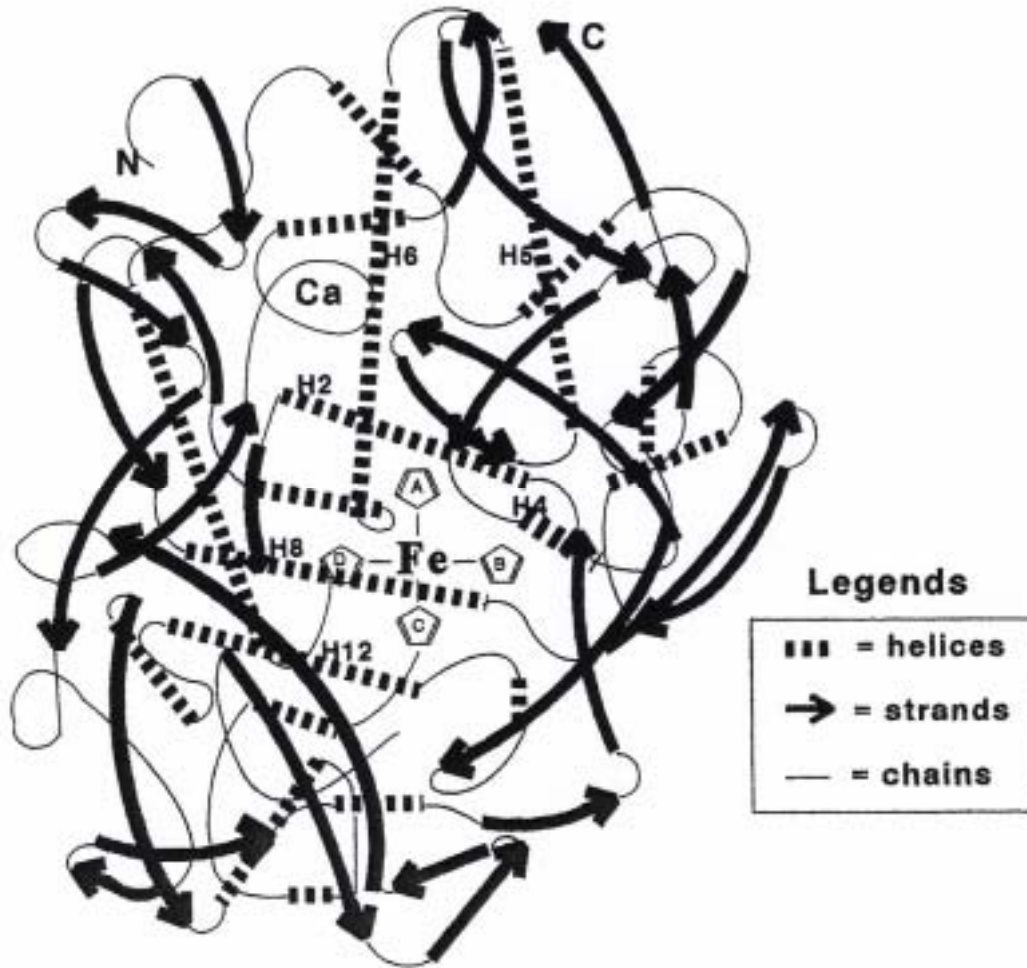
乳過氧化酵素的 3-D 結構相似於髓過氧化酵素 (Myeloperoxidase, MPO；發現於白血球，例如：乳腺炎的乳汁中) (Zeng and Fenna, 1992)。乳過氧化酵素和髓過氧化酵素之不同在於乳過氧化酵素對血基質袋 (haem pocket) 更加限制，主要是對鹵素特異性的不同 (MPO 催化 SCN^- 、 I^- 、 Br^- 和 Cl^- 的氧化作用) (Hu *et al.*, 1993)。核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 顯示 SCN^- 和 I^- 會結合到乳過氧化酵素之位置是相同的且 I^- 結合力量更強 (Modi *et al.*, 1989)。

乳過氧化酵素 Fe (III) 的光譜顯示在 412 nm 的 Soret band 有 $112.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 的吸收值。在 280 nm (1%, 1 cm) 的吸收值是 14.9--15.0。因此推論純的乳過氧化酵素溶液的 A_{412}/A_{280} 比值大約為 0.95 (Paul and Ohlsson, 1985)。

1.1.3 乳過氧化酵素之穩定性

1.1.3.1 對熱之穩定性

牛奶於巴斯德滅菌 (70°C, 15 秒) 處理下，牛奶中的乳過氧化酵素活性約喪失 75%，但已純化的乳過氧化酵素於此溫度下，至少可穩定 15 分鐘。若將乳過氧化酵素置於 78°C 下，其活性馬上完全喪失 (Paul and Ohlsson, 1985)。



圖一、乳過氧化酵素分子之概要圖。

Fig. 1. Schematic drawing of a peroxidase molecule, adapted from myeloperoxidase by introducing the protoporphyrin-IX haem group of lactoperoxidase. The helices have been numbered according to their position in the polypeptide chain.

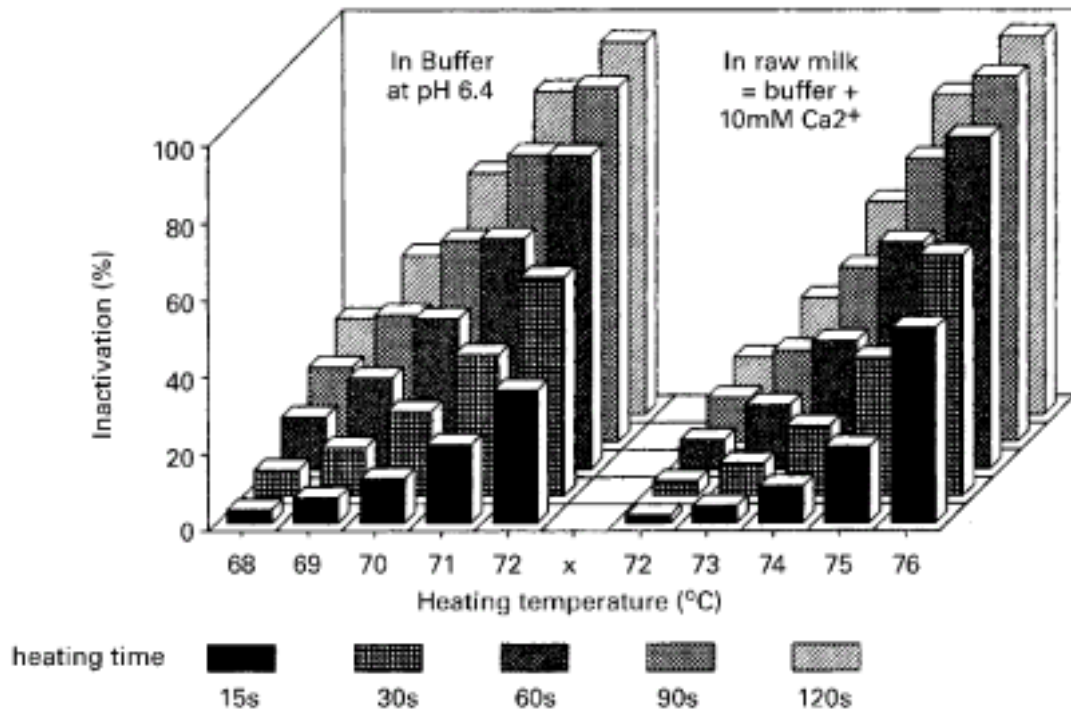
(de Wit and van Hooydonk, 1996)

在乳汁、乳清、permeate (為製成濃縮乳清蛋白過程中的殘留物) 和緩衝液中乳過氧化酵素的受熱變性溫度約從 70°C 開始。在 permeate 和緩衝液中乳過氧化酵素的熱穩定性略低於乳汁和乳清，而鈣離子濃度似乎對乳過氧化酵素的熱敏感度有很大的影響。酵素熱不活化的發生是導因於溫度，在熱不活化情況下酵素的天然結構會展開且遵循 first-order 運動 (Hernández *et al.*, 1990)。

乳過氧化酵素在酸性 (pH 5.3) 環境下對熱穩定性較差，可能歸因於鈣離子從乳過氧化酵素中釋放出來。圖二顯示乳過氧化酵素使用於緩衝液和生乳中因受熱而失去活性的紀錄 (de Wit and van Hooydonk, 1996)。於緩衝液中添加 10 mM CaCl₂，發現緩衝液中的乳過氧化酵素與生乳中的乳過氧化酵素具相同的熱敏感性 (de Wit and van Hooydonk, 1996)。於緩衝液中之乳過氧化酵素在 15 sec/72°C 有 34% 失活，2 min/72°C 達 100% 失活。於生乳中之乳過氧化酵素在 15 sec/72°C 有 2% 失活，2 min/72°C 有 15% 失活，2 min/76°C 達 98% 失活。這證實鈣離子對乳過氧化酵素結構的完整性是必要的 (Hernández *et al.*, 1990)。

1.1.3.2 pH 值

在 pH 4.4-- 6.7 範圍中，在低乳過氧化酵素濃度 (0.5 ppm) 下，其活性於 pH 5.4 有最大減少量，每 15 分鐘減少 15%；但乳過氧化酵素濃度為 25 ppm 時，其活性約 3 小時不減。這是因為在低濃度時酵素在玻璃表面具有吸附作用所致，這也表示在分析乳過氧化酵素溶液時必須迅速。在 pH 3 時乳過氧化酵素會被去活性 (deactivated)，在 pH < 4 時會部分變性。pH 值約 10 時，乳過氧



圖二、在醋酸緩衝溶液 (pH 6.4)、含鈣的醋酸緩衝溶液及生乳中之乳過氧化酵素 (50 p.p.m.) 的熱去活化。

Fig. 2. Thermal inactivation of LP (50 ppm) in acetate buffer (pH 6.4), acetate buffer plus calcium and in raw milk.

(Herández et al., 1990)

化酵素於室溫中似乎不會損失活性 (Paul and Ohlsson, 1985; Herández *et al.*, 1990; de Wit and van Hooydonk, 1996) 。乳過氧化酵素催化反應的最適 pH 約 5--6 之間，其受質為 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)，主要取決於 ABTS 和 H₂O₂ 的濃度。此報告指出乳過氧化酵素在 pH 4.5--6.5 間皆可使用 (Bardsley, 1985) 。

1.1.3.3 蛋白水解酵素 (Proteolytic enzymes)

乳過氧化酵素對蛋白水解酵素頗有抵抗力。Trypsin 和 Thermolysin 不會使天然乳過氧化酵素失活，而 Chymotrypsin 的作用非常緩慢。乳過氧化酵素在嬰兒的胃酸 (pH 5) 中不會失活，但在 pH 2.5 時，pepsin 會使乳過氧化酵素失活。天然乳過氧化酵素會被商業級的鏈黴蛋白酶 (pronase) 消化成片段，血基質 (haem) 可能被萃取出來 (Sievers, 1979; Paul and Ohlsson, 1985) 。

1.1.3.4 光化學的失活 (Photochemical inactivation)

在維生素 B (riboflavin) 存在下，乳過氧化酵素對光線極敏感。如在牛奶、乳清和 permeate 中加入乳過氧化酵素，於 10°C 在 6000 lux 下暴露達 4 小時，乳過氧化酵素失去活性百分比依序為 55%、70% 和 97%。於含 50 ppm 乳過氧化酵素的緩衝溶液 (pH 6.7) 中，未加入維生素 B 之乳過氧化酵素不發生光化學的失活。光化學的失活是不可逆的，但加入 cysteine 幾乎可以完全預防 (Herández *et al.*, 1990) 。

1.1.3.5 聚集和吸附 (Aggregation and adsorption)

乳過氧化酵素溶液易變混濁且乳過氧化酵素分子有高度的傾向會黏附於表面，這會造成在玻璃器皿中乳過氧化酵素溶液的活性降低。黏附到表面可能會導致聚集和混濁，但這要視該表面的疏水性而定，疏水性愈大愈易混濁。乳過氧化酵素也會被牙齒 瑯質吸附著，這可在唾液的乳過氧化酵素中發現。在唾液的乳過氧化酵素中，受束縛的乳過氧化酵素依舊有酵素活性，能夠使糖解酵素 (glycolytic enzyme，例如：hexokinase) 失活。

對於發生聚集和吸附現象的原因並不清楚，但有研究指出乳過氧化酵素分子具備離子和疏水兩種交互作用 (Paul and Ohlsson, 1985)。

1.1.4 在初乳與乳汁中的濃度

在牛乳中乳過氧化酵素含量僅次於 xanthine oxidase (含量最多)。其濃度約 30 mg/L，大約構成乳清蛋白的 0.5% (de Wit and van Hooydonk, 1996)。

在測試乳過氧化酵素活性時，使用 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 當作發色基團 (chromophore) (Pruitt and Kamau, 1993)。這是敏感且現今常用測量 (乳) 過氧化酵素 ((lacto) peroxidase) 活性的色原 (chromogen)。

與其他抗菌蛋白相比，在牛的初乳中乳過氧化酵素濃度低，但之後會快速增加，於產後 3--5 天達到最大量 (Korhonen, 1977)。之後，此最大量會慢慢減少，大約在 2 星期過後達到穩定水準，大約為最大量的 50%。酵素量的多寡取決於牛的繁殖週期、季節、飼養

制度和品種 (Kiermaier and Kayser, 1960; Reiter and Perraudin, 1991)。

1.2 硫氰酸根離子 (thiocyanate anion)

硫氰酸根離子 (thiocyanate anion, SCN^-) 在哺乳動物的分泌物和組織中無所不在。硫氰酸根離子存在於乳腺、唾腺和甲狀腺以及它們的分泌物中；在器官中如胃和腎，在體液中如關節滑液、子宮頸分泌物、脊髓液、淋巴液和血漿。硫氰酸根離子濃度依賴動物的飼養飲食制度以及人類的飲食及抽煙習慣而定。在牛乳汁中硫氰酸根離子濃度反映出血中濃度且隨育種、品種、乳腺健康和飼養型式而變化。表二中有人的體液、牛血清和乳汁中硫氰酸根離子濃度 (Reiter and Härnultv, 1984; Reiter and Perraudin, 1991)。初乳中含有更多的硫氰酸根離子濃度，但這不令人意外，因為此時的血蛋白、鈉等都比乳汁更高。

硫氰酸根離子之來源為本身、它的酯類及前驅物，例如 類 (nitriles)、異硫氰酸鹽 (isothiocyanate) 及氰化物 (cyanide)。這可藉由含硫胺基酸 (sulfur amino acids) 的代謝物，如硫代硫酸鹽 (thiosulfate) 與 氰化物 經 硫 氰 酸 酶 (rhodanese, thiosulfate sulfurtransferase) 催化的解毒作用，使 氰化物 轉變為硫氰酸根離子，此反應主要是在肝臟及某些細菌中發生 (Reiter and Perraudin, 1985)。從抽菸來的 氰化物 亦是經由相同的代謝途徑。

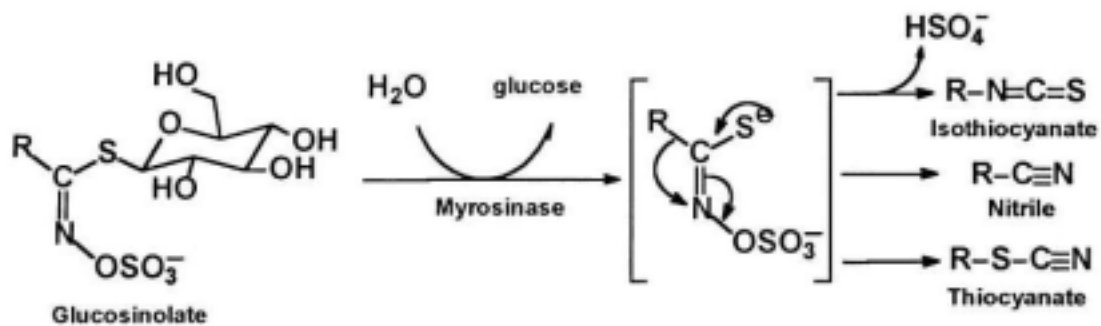
植物中主要有兩種含硫氰酸根離子的前驅物：硫配糖體 (glucosinolates) 和 氰酸苷 (cyanogenic glucosides)。富含硫配糖體的植物主要是屬於 芸薹屬 (genus Brassica)，十字花科 (species of

表二、 硫氰酸根離子在人及牛的體液中之濃度

Table 2. Concentrations of SCN^- in some human and bovine body fluids

Fluid	SCN^- concentration (p.p.m.)
Human serum, adults	1.9--8.4
saliva, adults	37--198
saliva, infants	15--22
gastric juice, adults	22--64
gastric juice, infants	6.4
tear fluid	ca 10
urine	14--39
colostrums	5.0
milk	2.9
Bovine serum	1.2--16.2
milk	1.2--15.1

(Reiter and Härnultv, 1984; Reiter and Perraudin, 1991)



圖三、 硫配糖體經由 myrosinase 之水解作用。

Fig. 3. Hydrolysis of glucosinolates by myrosinase.

(Fahey *et al.*, 2001)

Cruciferae) 的蔬菜，像是甘藍菜、甘藍、花椰菜等，硫配糖體經由 Thioglucosidase (myrosinase) 催化產生硫氰酸根離子或異硫氰酸鹽或類 (圖三)。有文獻指出硫氰酸根離子含量可高達 600 mg/kg (Reiter and Perraudin, 1991)。富含氰酸苷的植物主要為馬鈴薯、玉米、小米、甘蔗及豌豆等。氰酸苷水解後，配糖體會釋出氰化物，再經由硫氰酸酶產生硫氰酸根離子 (Wolfson and Sumner, 1993)。

硫氰酸根離子於大鼠之口服 LD₅₀ 為 746 mg/kg (IDF, 1988)。Wood (1975) 指出在血液中硫氰酸根離子濃度達 100 ppm 是不正常的。過度攝取硫氰酸根離子會間接阻礙碘離子代謝，可能會導致甲狀腺腫大 (goiter) (Ermans *et al.*, 1972)。在腎臟功能正常下，硫氰酸根離子會經由尿液排泄掉 (Moister and Freis, 1949)，排除之半衰期 (half-life) 約 2 至 5 天 (Bödiger *et al.*, 1979; Schulz *et al.*, 1978)。

1.3 過氧化氫 (Hydrogen peroxide, H₂O₂)

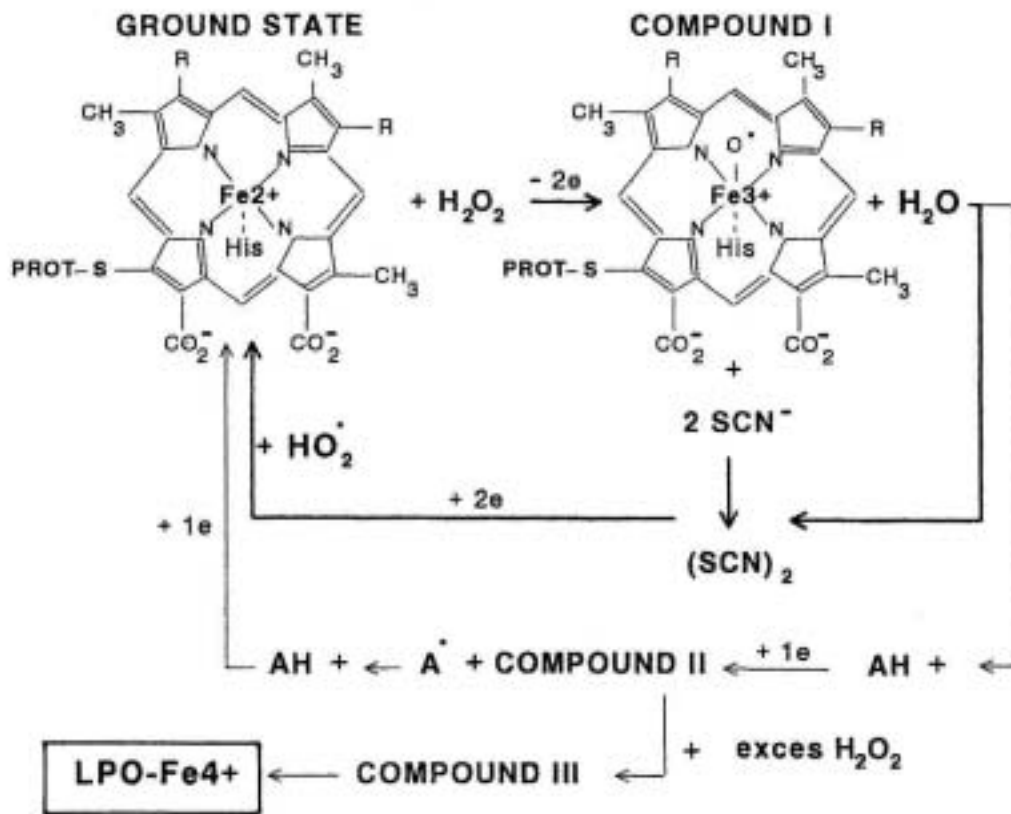
在乳汁中過氧化氫一般是假設不存在的，因為乳汁不只含有過氧化氫和 catalase 亦含有超氧歧化酶 (superoxide dismutase)。因此可在乳汁中保護酵素抵抗 H₂O₂ 的毒害，只要產生過氧化氫不是被乳過氧化酵素結合就是會被 catalase 還原掉。過氧化氫可為內生性的 (endogenously)，例如在細胞吞噬作用 (phagocytosis) 過程中經由多型淋巴球 (polymorphonuclear leucocytes, PMN) 產生 (Korhonen and Reiter, 1983)。在好氧情況下乳酸桿菌、乳酸球菌和鏈球菌可能產生足夠的 H₂O₂ 以活化乳過氧化酵素系統。H₂O₂ 亦可為外生性的 (exogenously)，可藉由 H₂O₂ 直接添加到系統中或是以鍵結形式

(bound form) 的方式加入, 例如重碳酸鈉 (sodium percarbonate)、過氧化氫鎂 (magnesium peroxide)。而產生過氧化氫的系統亦被使用, 像是葡萄糖氧化酶/葡萄糖 (glucose oxidase / glucose) 和黃 呤氧化酶/次黃 呤 (xanthine oxidase / hypoxanthine) 可能比直接添加 H_2O_2 提供更有效的抗微生物的乳過氧化酵素系統 (Reiter and Perraudin, 1991)。

1.4 作用模式 (Mode of action)

乳過氧化酵素催化硫氰酸根離子 (SCN^-) 和某些鹵化物 (I^- 和 Br^- , 但不包含 Cl^-) 去產生產物, 此產物能殺死或抑制微生物的生長。如 I^- 和 Br^- 亦可當作乳過氧化酵素的電子提供者被使用。乳過氧化酵素不會氧化 Cl^- , 因為 Cl^- 是細胞外黏膜分泌物的重要組成。此反應機制非常複雜。

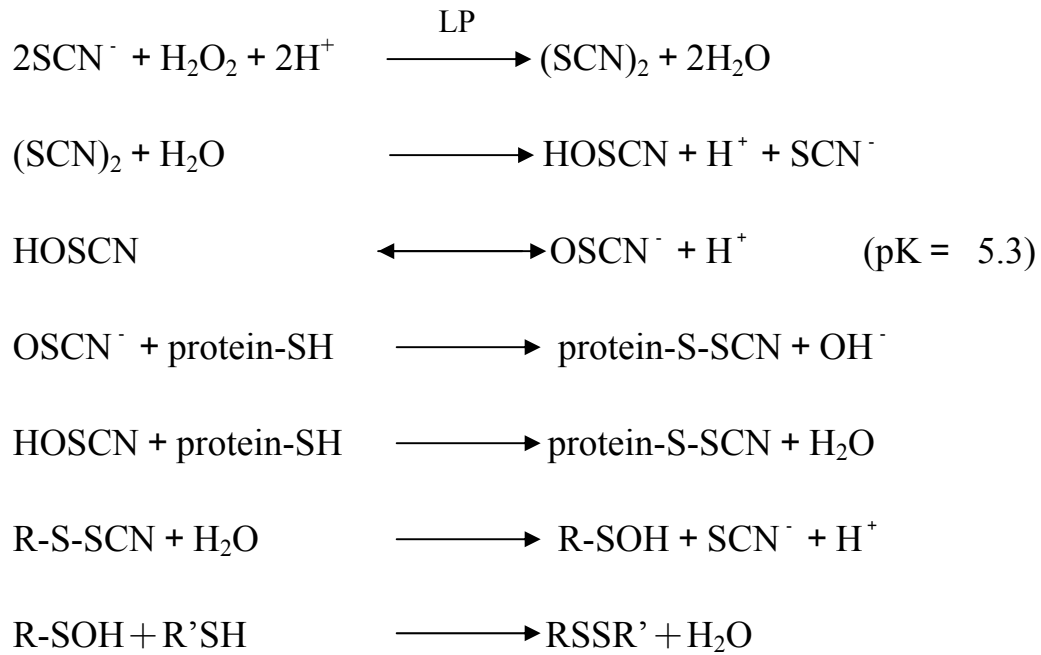
酵素跟過氧化氫及硫氰酸根離子機制的概括途徑由 de Wit 和 van Hooydonk (1996) 呈現 (圖四)。酵素機制的第一步驟是添加 H_2O_2 使靜止期乳過氧化酵素 (resting lactoperoxidase, Fe^{3+}) 形成乳過氧化酵素的基態 (ground state) 進行開始反應 (initiation reaction), 首先 $Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + HO_2\cdot$, 接著就是 propagation 反應。此超氧陰離子 (superoxide radical, $HO_2\cdot$) 在催化反應終止時對靜止期乳過氧化酵素扮演一個重要的角色。在靜止期的乳過氧化酵素之血基質 (Fe^{3+}) 含有 5 個可調節的 high-spin 配位基 (ligand), 而 histidine 為第六個配位基。propagation 反應如圖四, 此反應造成 O 轉移 (由 H_2O_2 誘發) 並釋出 H_2O 並使基態變成化合物 (compound), 且電子轉移是來自 porphyrin ring。



圖四、 催化乳過氧化酵素反應機制之途徑

Fig. 4. Pathways in the lactoperoxidase-catalysed reaction mechanism.

(de Wit and van Hooydonk, 1996)



圖五、乳過氧化酵素系統催化蛋白質 (酵素) 之氧化作用。

Fig. 5. Oxidation of protein (enzyme) sulphydryls by lactoperoxidase catalysed reactions, mediated by oxidation products of SCN^- .

(Kussendrager and van Hooijdonk, 2000; Aune and Thomas, 1978)

化合物 I 可藉由單一 2 個電子 (例如 SCN^-) 轉移恢復至基態，且此反應會開始乳過氧化酵素的抗微生物活性。該氧化作用是經由化合物 I 轉換 SCN^- 形成 $(\text{SCN})_2$ 並釋出 2 個電子，使活化的乳過氧化酵素變回基態。

在 SCN^- 或鹵素濃度低時，乳過氧化酵素跟 H_2O_2 反應，然後跟任何帶有 1 個電子的提供者 (例如蛋白質、肽等) 形成化合物 II (compound II)。雖然化合物 II 會連續還原成基態，但此步驟較催化循環中的其他步驟慢太多。這亦是說，在 SCN^- 濃度低於 $3\mu\text{M}$ 時，此酵素大部分會處於化合物 II 的狀態且不具抗微生物效果。

在 H_2O_2 ($> 0.5 \text{ mM}$) 過量時，化合物 II 可能形成化合物 III (compound III)，導致形成 ferrylperoxidase 加合物 ($\text{LP}[\text{Fe}^{IV}=\text{O}]$)，並造成乳過氧化酵素不可逆的去活化。

1.5 乳過氧化酵素系統之抗微生物活性 (Antimicrobial activity of LP-s)

催化乳過氧化酵素之硫氰酸根離子的氧化反應，會產生短暫 (short-lived) 氧化產物，此具有抗微生物活性，大概的反應網要在圖五 (de Wit and van Hooydonk, 1996)。

當次硫氰酸根離子 (hypothiocyanite, OSCN^-) 與次硫氰酸 (hypothiocyanous acid, HOSCN) 達平衡時，在此 pH 值 (5.3) 有最大的乳過氧化酵素系統活性且兩者量相等。此兩種形式皆有抗菌活性，但有證據指出無電荷的 HOSCN 更具殺菌力 (Thomas *et al.*, 1983)。次硫氰酸根離子 (hypothiocyanite, OSCN^-) 的穩定力受很多因子影響。例如：在 pH 7.5 比在 pH 5.0 之下更穩定；光線、甘油

(glycerol)、硫酸銨鹽 (ammonium sulphate)、移除乳過氧化酵素及加入金屬離子 (Fe, Ni, Cu, Mn 等) 會使穩定度下降，然而 OSCN^- 對熱是穩定的 (Thomas, 1985)。

乳過氧化酵素系統對微生物的酵素和蛋白質之硫氫基團 (sulphydryl groups, SH) 進行氧化作用產生雙硫化合物，此被認為是其抗微生物作用的關鍵。有幾種抑制作用的機制如下：(1) 延長遲滯期 (lag period) 或不生長；(2) 減少氧氣攝入；(3) 減少發酵性微生物產生的酸產物；(4) 抑制關鍵性代謝酵素，如 hexokinase、glyceraldehydes-3-phosphate 和 D-lactate dehydrogenase；(5) 抑制葡萄糖的攝取；(6) 傷害細胞膜導致離子及吸收 UV 物質的流失；(7) 抑制核酸和蛋白質的合成 (Reiter and Härnuly, 1984)。

藉由氧化微生物細胞質膜上的硫氫基而造成的結構性傷害會導致鉀離子、胺基酸和 肽流失，接著細胞中葡萄糖、胺基酸、 呤 (purines) 和嘧啶 (pyrimidines) 之攝取以及蛋白質、DNA 和 RNA 的合成也會受到抑制 (Reiter and Härnuly, 1984; Reiter and Perraudin, 1991)。

乳過氧化酵素系統可藉由含硫氫基的還原劑來抑制，例如 cysteine、glutathione、mercaptoethanol、dithiothreitol 和 sodium hydrosulphite，它們的作用可能是直接結合到血基質基 (haem group) 或者清除 OSCN^- 。 HOSCN 和 OSCN^- 不會氧化乳汁中的蛋白質硫氫基，例如乳球蛋白 (β -lactoglobulin) (de Wit and van Hooydonk, 1996)。

Pruit 和 Reiter (1985) 提出休眠細胞 (resting cells) 和處於靜止

期 (stationary phase) 的細胞比具代謝活性 (metabolically active) (包含呼吸作用和糖解作用) (Thomas and Aune, 1978) 或生長中的細胞對乳過氧化酵素系統更敏感，但也有學者提出相反的結果 (Purdy *et al.*, 1983; Reiter *et al.*, 1976)。在厭氧 (anaerobically) 環境的細菌比在好氧 (aerobically) 環境中的細菌對乳過氧化酵素系統更敏感 (Carlsson *et al.*, 1983)。

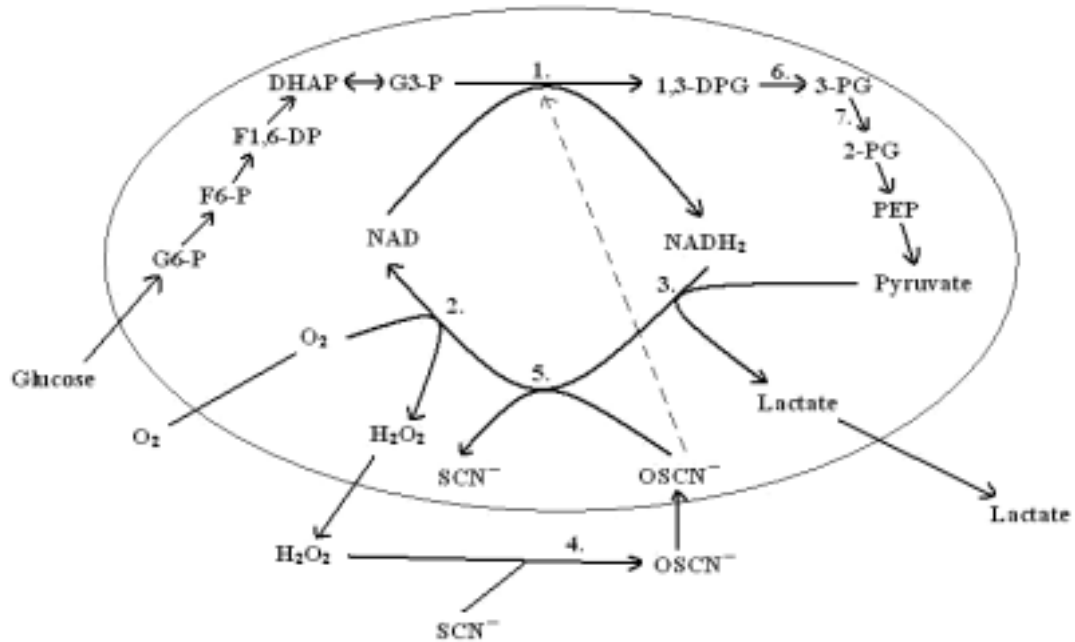
不同種類的細菌對乳過氧化酵素系統的抗性程度不同。革蘭氏陰性 (Gram-negative)、觸酶呈陽性 (catalase positive) 之微生物，例如 *pseudomonads*、*coliforms*、*salmonellae* 和 *shigellae*，乳過氧化酵素系統可達到抑制作用，若控制培養基之條件，如 pH 值、溫度、培養時間、菌體密度等，並提供外源性過氧化氫時甚至可使上述微生物致死。革蘭氏陽性 (Gram-positive)、觸酶呈陰性 (catalase negative) 之微生物，例如 *streptococci* 和 *lactobacilli* 通常會被抑制但不會致死。在乳汁中已存在乳過氧化酵素和硫氰酸根離子，這些微生物只要在好氧環境下產生足夠的 H_2O_2 即可達到自我抑制 (self-inhibitory) 的效果。乳過氧化酵素系統對細菌有不同的敏感度，可歸因於革蘭氏陽性菌的細胞壁結構較革蘭氏陰性菌的有更佳有效的障礙 (barrier) 性質之緣故 (Reiter and Härnolv, 1984; Reiter and Perraudin, 1991; de Wit and van Hooydonk, 1996)。

此外乳過氧化酵素系統可保護乳腺避免 *Streptococcus spp.* 的感染 (Todhunter *et al.*, 1985; Marshall *et al.*, 1986)。乳過氧化酵素系統對一些革蘭氏陽性菌及革蘭氏陰性菌有毒性，像是 *Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella typhimurium* (Reiter *et al.*, 1976)、*Listeria monocytogenes* (Siragusa and Johnson, 1989; Kamau *et al.*, 1990;

Gaya *et al.*, 1991)、*Streptococcus mutans* (Thomas *et al.*, 1983)、*Staphylococcus aureus* (Kamau *et al.*, 1990) 和乳汁中的嗜冷菌 (Björck, 1978)。此外，乳過氧化酵素系統於試管中 (*in vitro*) 可使小兒麻痺病毒 (polio virus)、牛痘 (vaccinia) (Belding *et al.*, 1970) 和人類免疫不全病毒型 1 (human immunodeficiency virus type 1) (Yamaguchi *et al.*, 1993b) 不活化。

牛的初乳和乳汁中分別含有 11--45 mg/L 和 13--30 mg/L (Korhonen, 1977)。在乳腺的上皮細胞中有乳過氧化酵素基因碼表現，指出這些細胞會分泌乳過氧化酵素進入乳汁中 (Cals *et al.*, 1994)。

藉由口腔中鏈球菌 (*streptococci*) 產生 H_2O_2 與乳過氧化酵素作用反應之 $OSCN^-$ 可抑制糖解作用 (glycolysis)、氧氣攝取 (oxygen uptake)。在糖解途徑上作用之主要位置為 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Carlsson *et al.*, 1983)。圖六是使用乳過氧化酵素和硫氰酸根離子於好氧環境下對於 *Streptococcus sanguis* 糖解作用 (glycolysis) 上的調控。*S. sanguis* 在葡萄糖存在下，從氧產生大量的 H_2O_2 (圖六，步驟 1 和 2)。當乳過氧化酵素和硫氰酸根離子加入，硫氰酸根離子 (SCN^-) 會被氧化成次硫氰酸根離子 ($OSCN^-$) (圖六，步驟 4)。次硫氰酸根離子進入細胞內，藉由抑制 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 封鎖住糖解作用 (圖六，步驟 1)。這也抑制 H_2O_2 的分泌，接著次硫氰酸根離子的供給亦受到限制。在細胞內的次硫氰酸根離子則可藉由 NAD(P)H-OSCN oxidoreductases 轉換成硫氰酸根離子。然後糖解作用的抑制可免除， H_2O_2 可繼續分泌，次硫氰酸根離子可在胞外形成。之後，次硫氰酸



圖六、 *Streptococcus sanguis* 的糖解作用之調控。

Fig. 6. Suggested scheme for regulation of glycolysis in *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 in the presence of thiocyanate and lactoperoxidase. 1, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; 2, NADH oxidase; 3, lactate dehydrogenase; 4, lacoperoxidase; 5, NADH-OSCN oxidoreductase; 6, phosphoglycerate kinase; 7, phosphoglyceromutase.

(Carlsson *et al.*, 1983)

根離子又進入細胞，細胞內次硫氰酸根離子再度增加直到糖解作用再度被抑制。對 *S. sanguis* 而言，糖解作用從開始到結束至少重複六次，糖解作用會完全終止，導致菌體死亡。

在乳過氧化酵素系統中，只需要低濃度的過氧化氫 (大約 10--15 ppm) 就可氧化 SCN^- 。如果單獨使用過氧化氫，則須 300--800 ppm 才有抗菌效果。乳過氧化酵素系統和乳鐵蛋白在對 *Streptococcus mutans* 的抗菌作用顯示為加成效果 (Soukka *et al.*, 1991)。

SCN^- 的氧化產物不影響哺乳類細胞，因此乳過氧化酵素系統不僅對人體細胞無害而且可能會保護這些細胞抵抗過氧化氫的毒害 (Reiter and Härnuly, 1984)。

1.6 應用

自可從牛乳及乳清中取得乳過氧化酵素後，使用乳過氧化酵素及乳過氧化酵素系統於食品、特殊飼料 (feed specialties)、化妝品和相關產品以當作天然生物保存劑之可能性大增。de Wit 和 van Hooydonk (1996) 摘錄一些乳過氧化酵素系統可能的和實際的應用於表三。

在保持生乳品質上，生乳儲存於 4°C 下達三至四天後滅菌比生乳在第一天或第七天 (4°C 貯藏) 滅菌的品質要來得好 (Ravanis and Lewis, 1995)。此結果顯示天然的乳過氧化酵素抗菌系統存在於生乳中最有效時期高達 3 至 4 天。

活化乳過氧化酵素系統是藉由加入兩者濃度皆為 0.25 mM 的 H_2O_2 和 SCN^- 於生乳中，在 10°C 下可延長儲存期至少 3 天 (Zajac *et*

表三、 乳過氧化酵素系統的一些應用和功能

Table 3. Some LP-s applications and their functionality

Observed			
product	LP-s added	Function	Results
Raw milk	Natural	Preservation	4 days/4
Raw milk	SCN/H ₂ O ₂	Shelf life	3 days/10
Pasteurised milk	SCN/H ₂ O ₂	Shelf life	21 days/10
Cheese milk	SCN/H ₂ O ₂	Shelf life	8 days/4--7
Yoghurt	LP	Suppress acidity	14 days/20
Emulsions	LP/KI/GO	Preservation	14 days/20
Cosmetics	LP/KI/SCN/GO	Preservation	2--4 months
Dentifrice	LP/SCN/LYS/GO	Healing	daily
Ophthalmics	LP/KI/SCN/GO	Protection	1 week
Anti-tumor	LP/GO/antibody	Healing	Periodical

LP, lactoperoxidase; LP-s, lactoperoxidase system; GO, glucose oxidase; LYS, lysozyme.

(de Wit and van Hooydonk, 1996)

al., 1983)。此結果顯示活化的乳過氧化酵素系統與適度的冷卻 (moderate cooling) (例如使用井水) 合併使用，這對於在牧場中保持生乳的品質是一個有用的選擇。

乳過氧化酵素系統的活化，是藉由加入 SCN^- (2.4 mM)、 H_2O_2 (0.6 mM) 到生乳中然後進行 30 min/63 °C 巴斯德滅菌 (Pasteurization)，則可在 10 °C 下延長牛乳的 shelf-life 超過 20 天 (Kamau *et al.*, 1991)。這比未經處理的已滅菌牛乳多出 11 天。從乳過氧化酵素對熱不活化的動力學結果出發，我們知道加熱 63 °C 不破壞乳過氧化酵素。

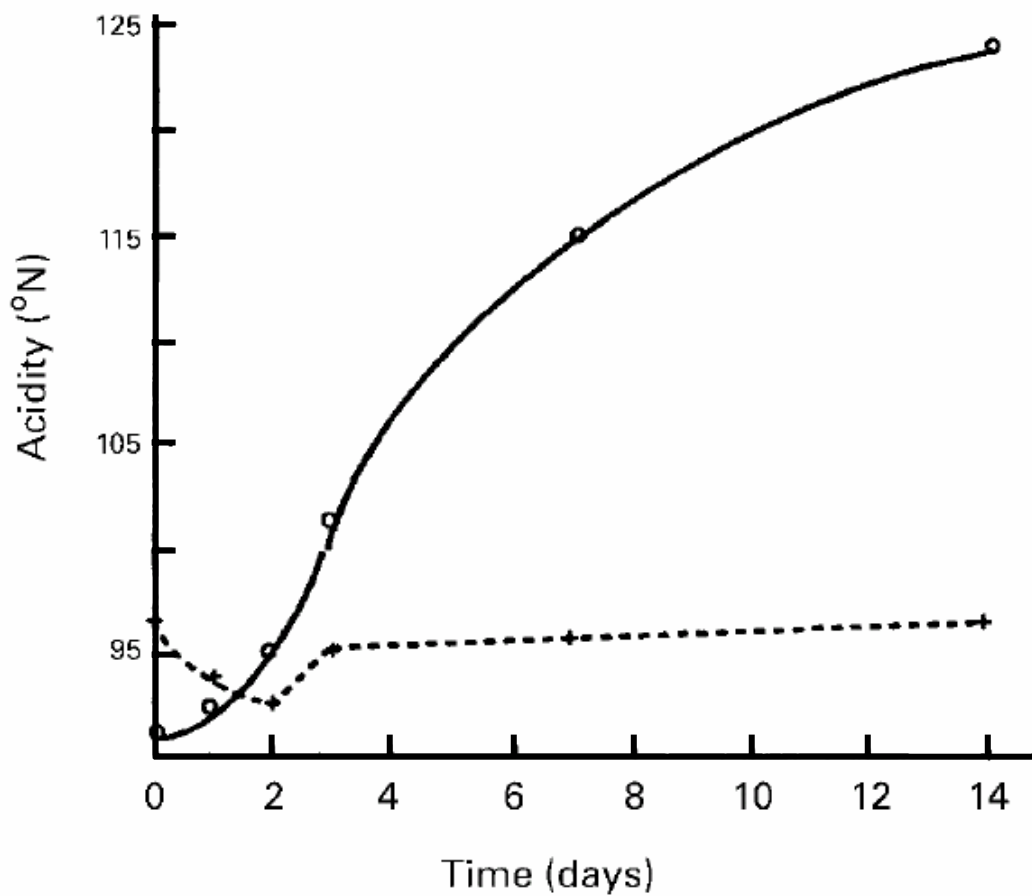
在 cheese milk 中加入 SCN^- (0.25 mM)、 H_2O_2 (0.25 mM) 貯藏於 4--7 °C，可使生菌數保持小於 10^4 CFU/mL 至 8 天。之後以巴斯德滅菌 (10 sec/74 °C)，可使 Cottage cheese 和 Cheddar cheese 具有良好的品質 (Zall *et al.*, 1983)。

在酸奶菌 (yogurt culture) 熟成前，加入乳過氧化酵素到已滅菌 (HTST, 2 min/ 90 °C) 牛乳中，於冷藏期間，可明顯觀察到後期酸化作用 (post acidification) 減緩 (Dosako, 1991)。在酸奶熟成期間，菌 (starter) 活性不受抑制，可能是乳汁中 SCN^- 不被活化。因為在 Compound II 形成情況下，會妨礙乳過氧化酵素系統的活性。後來乳過氧化酵素系統會被儲藏期間細菌所產生的 H_2O_2 活化，可觀察到後期酸化作用的遲緩。Nakad 等人 (1996) 添加乳過氧化酵素到菌 (starter) 並使用於酸奶 (yoghurt) 產品。在 10 °C 貯藏 14 天下，發現乳過氧化酵素系統可完全抑制酸奶之酸產物而不影響其菌落數。他們猜測在硫氰酸根離子低濃度及由乳酸菌產生低濃度 H_2O_2 ，導致在 10 °C 低溫時乳過氧化酵素系統有較低活性，這可能是

抑制到代謝性的酵素 (如 aldolase、hexokinase 和 glycerakdehydes-3-phosphate dehydrogenase) (Seifu *et al.*, 2003), 故僅僅抑制菌的酸產物而沒有發揮抑菌效果。他們推斷添加乳過氧化酵素可產生一新形式的酸奶, 並在貯藏期間保持可接受的品質至少 2 星期 (Dosako, 1991)。在市場上把乳過氧化酵素添加於酸奶中已達數年。de Wit 和 van Hooydonk (1996) 發現在高溫短時 (HTST 90°C/2 min) 滅菌牛乳中硫氰酸根離子濃度太低, 添加 SCN⁻和 H₂O₂ 可能會更有效且可確實抑制酸奶後期酸化作用 (post-acidification), 圖七有說明。

使用乳過氧化酵素、碘化物 (0.15 mM)、葡萄糖 (0.5%)、葡萄糖氧化酶 (0.1 U/mL) 系統於固定化酪蛋白鹽之水包油的乳化劑 (Caseinate stabilized O/W emulsions) 中, 顯示對混合性細菌 (*Micrococcus*、*Stapgylococcus*、*Listeria*、*Bacillus cereus*) 有殺菌效果且於室溫下至少貯存 14 天 (Maas, 1995)。這主要是藉由葡萄糖/葡萄糖氧化酶系統慢慢釋放出 H₂O₂ 和碘化物與含硫氫基化合物持續作用之結果。

乳過氧化酵素系統應用於化妝品方面, 是由 Godfrey 與其團隊 (1990) 提出, 主張使用乳過氧化酵素系統, 其包含葡萄糖/葡萄糖氧化酶、I⁻及 SCN⁻在一精密的重量比例 (weight ratio's) 之下, 具抗菌活性可抵抗較大範圍的菌, 例如: 酵母菌、真菌及病毒, 達 2 至 4 個月。Guthrie (1992) 研究乳過氧化酵素系統對保存化妝品的應用且推斷出乳過氧化酵素系統能提供廣大範圍的抗微生物活性去抵抗細菌、酵母菌和黴菌, 只要仔細選擇乳過氧化酵素、H₂O₂、SCN⁻和 I⁻的重量比例。最合適的結果是 H₂O₂ 藉由葡萄糖氧化酶/葡萄糖系統的酵素作用而得到的。



圖七、在酸奶中使用乳過氧化酵素系統對其後酸化作用之影響。

Fig. 7. Effect of Lactoperoxidase system on postacidification of stirred yoghurt at 10°C. ○ = control, + = after addition of lactoperoxidase (10 p.p.m.), SCN^- (0.2 mM) and H_2O_2 (0.6 mM) after fermentation.

(de Wit and van Hooydonk, 1996)

Poulsen (1986) 主張對牙齒及傷口處理於乳過氧化酵素系統的殺菌成分探討。此系統除乳過氧化酵素 (28 ABTS-U) 之外又包含 SCN^- (0.5 mM)、葡萄糖氧化酶 (45 U/mL) 當作過氧化氫誘導劑、Invertase (900 U/mL) 及/或 lactase (1400 U) 當作誘導葡萄糖的來源。Hoogendoorn (1985) 研究唾液過氧化酵素 (salivary peroxidase) 的抗微生物系統之作用，發現使用在牙膏和漱口水上可降低口腔微生物產生的酸產物，且臨床上亦顯示齒菌斑積聚、齒齦炎、早期蛀牙損害和口腔炎只要適當敷用即可減輕。使用乳過氧化酵素和葡萄糖氧化酶的乳過氧化酵素系統應用於牙膏已有描述 (Pellico and Montgomery, 1989) 且有完整的乳過氧化酵素系統使用於口腔照顧產品 (oral care products) 並於市場販售多年。

在最近的研究中乳過氧化酵素被當作眼炎治療劑 (Kussendrager, 1995)。此系統包含乳過氧化酵素 (300 ppm)、 SCN^- (1 mM)、 I^- (0.1 mM)、葡萄糖 (2%) 及葡萄糖氧化酶 (0.1 U/mL)，可更有效的去抵抗典型污染菌和真菌。

乳過氧化酵素、葡萄糖氧化酶和單株抗體一起處理於腫瘤治療已被報導 (Stanislawski *et al.*, 1989; Lefkowitz *et al.*, 1990)。乳過氧化酵素系統可使一些病毒失去活性。Courtois (1990) 使用此項處理可延遲或除去人類病毒 (human virus, HSV1)。

有學者 (Wolfson *et al.*, 1994) 利用乳過氧化酵素系統處理雞腿肉，發現此系統可減少 *Salmonella typhimurium* 之菌數。減少程度受乳過氧化酵素系統溶液溫度及浸泡時間之影響。當溶液溫度為 25 °C，浸泡時間為 30 分時，可減少 13.2% 之菌數；但溶液溫度為 60 °C，浸泡時間為 15 分時，可減少 80.6% 之菌數。乳過氧化酵素系統

也能抑制低溫菌的生長而延長雞肉之保存期限；不過雞皮之顏色 (L^* 、 a^* 及 b^* 值) 及雞腿之氧化酸敗值 (TBARS value) 則不受乳過氧化酵素系統之影響。由於乳過氧化酵素系統是自然存在牛奶中，可保存牛奶，因此乳過氧化酵素系統是屬天然的防禦系統，可去除雞肉之腐敗性及病源性微生物，確保雞肉品質。或許在雞屠宰場中使用乳過氧化酵素系統以降低微生物的污染。

Escherichia coli O157 : H7，*Listeria monocytogenes* 及 *Staphylococcus aureus* 對乳過氧化酵素系統非常敏感。一般建議添加量則為 100 mg/kg。絞碎牛肉之表面積與重量之比值較大，因此乳過氧化酵素之添加濃度較高，但其他非絞碎肉品之表面積與重量之比值應該較小，如此乳過氧化酵素之添加濃度可以降低 (Elliot *et al.*, 2004)。

另有學者 (Kennedy *et al.*, 2000) 探討乳過氧化酵素系統對絞碎牛肉之接種病原菌 (*Escherichia coli* O157 : H7，*Listeria monocytogenes* 及 *Staphylococcus aureus*) 的影響，發現 *Listeria monocytogenes* L45 對乳過氧化酵素系統最敏感，接著是 *Staphylococcus aureus* R37 及 *Escherichia coli* O157 : H7。乳過氧化酵素系統之抑菌效果受培養溫度 (0、6 及 12) 之影響，溫度愈高，其抑菌效果愈佳。由於乳過氧化酵素系統也能有效抑制總生菌生長，因此乳過氧化酵素系統可應用於許多食品，包括肉品。

乳過氧化酵素系統跟其他的抗微生物系統可能有協同的作用。Reiter 等人 (1991) 提出乳過氧化酵素系統與乳鐵蛋白 (lactoferrin) 一起使用可抑制病原菌的腸毒素 (enterotoxin) 合成但不能致死。Tenovuo (1985) 提出乳過氧化酵素與免疫球蛋白 -A

(immunoglobulin-A) 合併使用於 *S. mutans* 可顯著加強抗微生物效用。Roger 等人 (1994) 指出使用乳過氧化酵素與溶菌酶 (lysozyme) 可抑制突變型鏈球菌 (*Streptococcus mutans*) 的代謝和生長。

2. 乳鐵蛋白

2.1 簡介

乳鐵蛋白 (lactoferrin) 最早從牛乳中分離出來 (Søerensen and Søerensen, 1939)，亦能從其他動物或人類所分泌的乳汁中分離出的一種鮭紅色的蛋白質 (Johansson, 1960)。在乳汁中乳鐵蛋白是主要結合鐵的蛋白質，故得此名 (Grobve, 1960; Masson *et al.*, 1966; Blanc and Isliker, 1961b)。除了乳汁外，乳鐵蛋白亦存在於哺乳動物的體液中，如淚液、唾液、胰液、精液、陰道分泌物、消化管黏液及黏膜分泌物 (Levay and Viljoen, 1995)。嗜中性白血球 (neutrophils) 及多型淋巴球 (polymorphonuclear leukocyte, PML) 的顆粒中也有高濃度的乳鐵蛋白存在；其中以哺乳動物乳腺之分泌量為最高 (Masson *et al.*, 1969; Miehke *et al.*, 1996)，但不同哺乳類之間也有差異 (Steijns and Hooijdonk, 2000)；在人類的初乳中有最大含量，約 7 g/L。而因人類體液之不同而有不同之濃度變化，於眼淚中高達 2 mg/mL，在正常血液中約 1 μ g/mL，但發炎時會高達 200 μ g/mL (Masson and Heremans, 1971)。

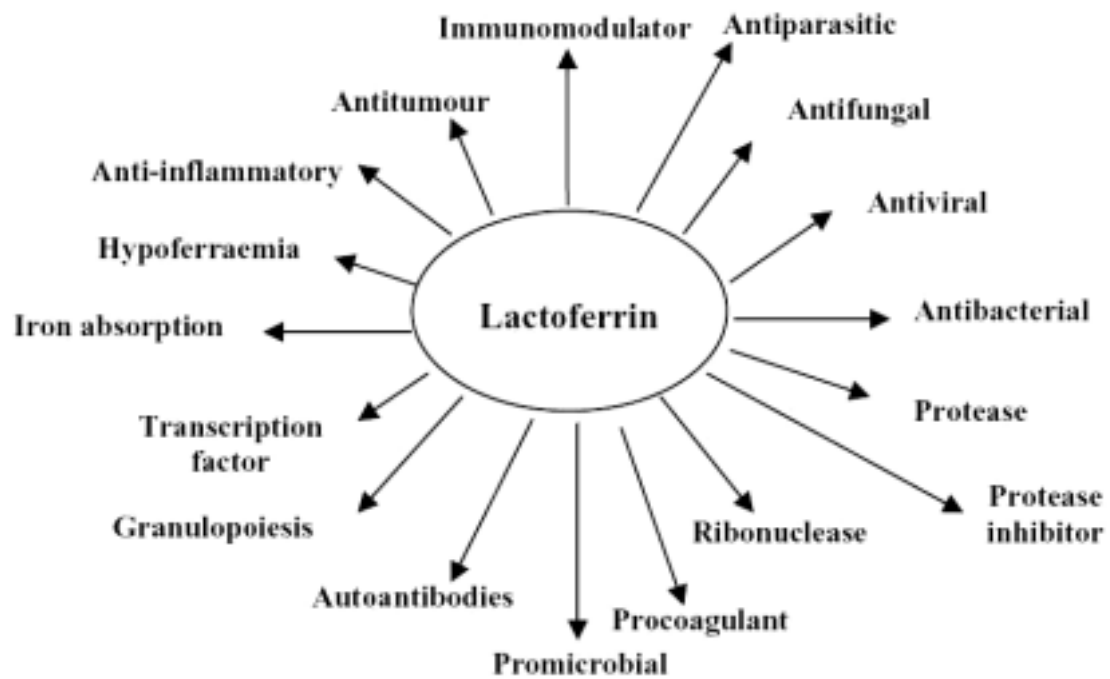
乳鐵蛋白是可與金屬離子結合的單鏈糖蛋白 (glycoprotein with single polypeptide chain)，約由 702 個胺基酸組成，分子量約為 75--80 kDa，等電點在 8.0--9.5 之間，它是哺乳類動物第一線上的防禦物質

(Naidu, 2000)。研究顯示乳鐵蛋白是一種多功能蛋白質 (Brock, 1995)，具有廣泛性之抗菌、抗病毒感染作用、調節體內鐵離子的平衡、調節骨髓細胞的生成、促進細胞生長、調節體內免疫功能、增強抗病能力、抑制人體腫瘤細胞生長、預防及治療腫瘤作用、與多種微生物及抗真菌製劑產生協同作用及能更有效的治療疾病等功能 (圖八) (Brock, 2002)。

一般乳鐵蛋白飽和度在 15--20%，鐵飽和程度少於 5% 的稱 apo-lactoferrin，鐵已飽和的乳鐵蛋白稱 holo-lactoferrin。乳鐵蛋白並非抗體，但對免疫系統產生促進和協助的作用，其可從生牛乳或牛乳衍生物中分離而得，經微過濾和管柱層析的純化，去鹽處理，再經 ultra-and-micro-filtration 和噴霧乾燥取得 (Uleber *et al.*, 2001)。從牛乳中發現的乳鐵蛋白實質上為 apo-lactoferrin (Baker *et al.*, 1994)。

2.2 乳鐵蛋白的結構與特性

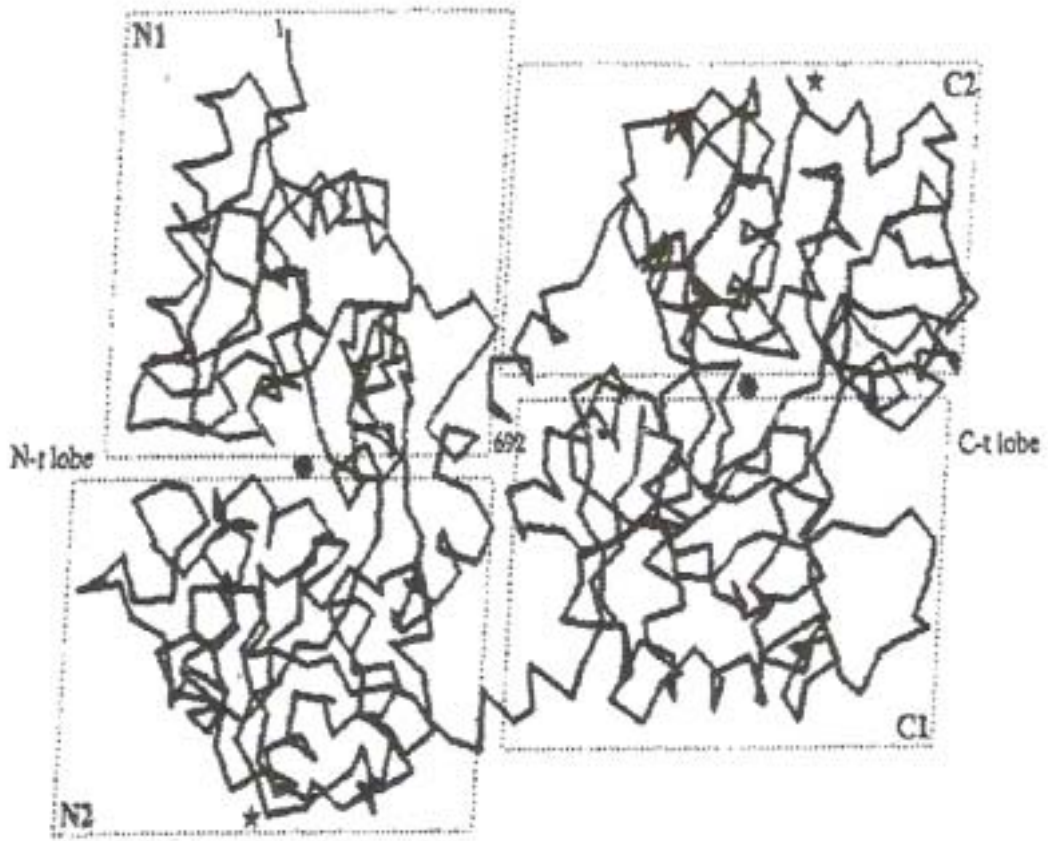
乳鐵蛋白之分子量大小會因物種的不同而有些許差異，範圍大約從 75 至 80 kDa 不等。圖九顯示乳鐵蛋白是由單一多肽鏈折疊 (folding) 成兩個小球葉 (lobe) 的結構，簡單區分為 N-球葉 (N-lobe) 與 C-球葉 (C-lobe)，於第 1 到第 333 個胺基酸間為 N-球葉，第 345 到第 692 個胺基酸間為 C-球葉，此兩球葉間由一 α 螺旋 (α -helix) 結構所連接。N-球葉與 C-球葉在結構型態上同質性高又分別可分成 N1-domain、N2-domain、C1-domain 及 C2-domain，且分別可與一分子的鐵離子及一分子的重碳酸根 (bicarbonate, CO_3^{2-}) 離子結合。重碳酸根離子在此有兩個作用：(i) 中和正電荷，因為這些正電荷會排斥陽離子；(ii) 藉由加入更多潛在配位基，對 apo-protein 上結



圖八、乳鐵蛋白所扮演的角色。

Fig. 8. Proposed roles of lactoferrin.

(Brock, 2002).



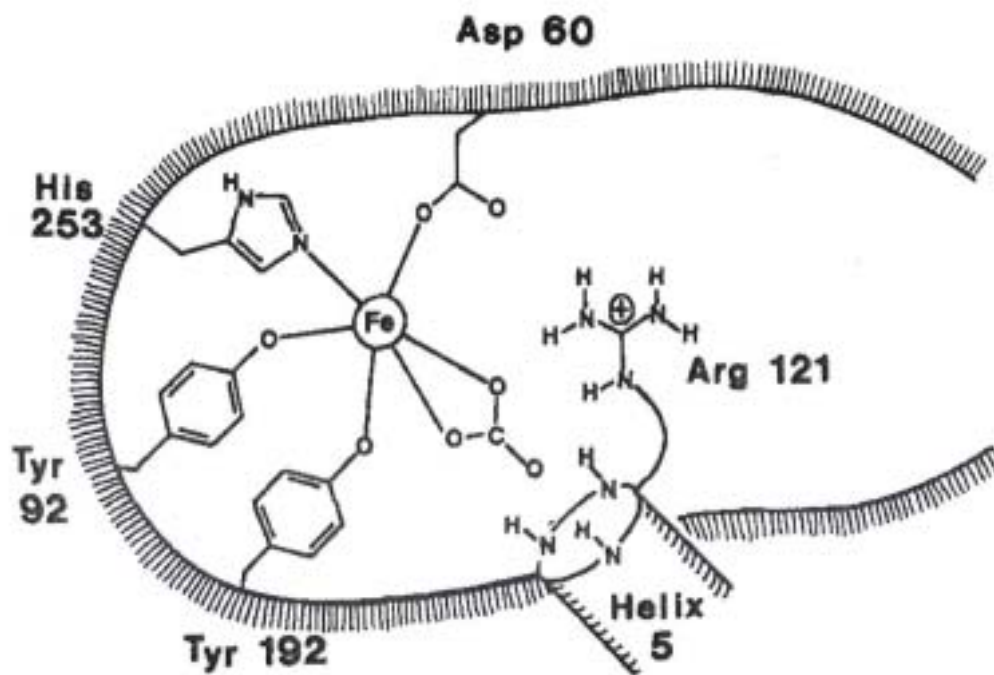
圖九、人乳鐵蛋白 N-球葉及 C-球葉之結構。

Fig. 9. The N-lobe and C-lobe structure of human lactoferrin.

(Baveye *et al.*, 1999)

合金屬離子的位置做準備。乳鐵蛋白與金屬結合的位置位於各球葉中兩個 domain 所形成的狹縫 (cleft) 中，當乳鐵蛋白沒有與鐵結合時，乳鐵蛋白分子比較柔軟易彎折，使形狀如狹縫的鐵離子區域容易打開或關閉；相反地，當鐵離子存在時，此狹縫就會緊閉。以人的乳鐵蛋白 N-球葉與鐵結合的位置上包含兩個酪胺酸 (Tyr92, Tyr192)、一個天門冬胺酸 (Asp60) 之三個陰離子配位基 (ligand) 以及一個中性配位基的組胺酸 (His253) 以提供三價負電荷與三價鐵離子結合，如圖十所示，而在 C 球葉內則為 Asp395-Tyr435-Tyr528-His597 (Metz-Boutique *et al.*, 1984; Anderson *et al.*, 1989)。在酸性環境下，N-球葉會先釋出鐵離子，當 pH 值再降低，C-球葉的鐵離子才會被釋放出來，直到 pH 值小於 3 時，乳鐵蛋白才會完全將鐵釋放出來。所以 N-球葉稱為酸不穩定性，而 C-球葉稱為酸穩定性 (Shan-Ming *et al.*, 2000)。雖然乳鐵蛋白可與金屬離子結合，但對鐵的親合力特別高 (K_a 約為 10^{20}) (Harris, 1986)。乳鐵蛋白除了可與鐵離子結合外，尚可與 Cr^{3+} 、 Mn^{3+} 、 Co^{3+} 、 Ga^{3+} ， Al^{3+} 、 Cu^{2+} 等多價金屬離子結合 (Ainscough *et al.*, 1979; Cochran *et al.*, 1984)。

人類與牛的乳鐵蛋白三級結構藉由結晶和點突變的方法可發現此蛋白質的結構類似兩個對稱的突出球葉 (globular lobes)，分別含有許多分子內雙硫鍵所組成 (Anderson *et al.*, 1987)。乳鐵蛋白的醣基化主要有兩個位置，但是人類與牛的乳鐵蛋白之醣基鍵結位置及構造並不相同 (Querijnjean *et al.*, 1971; Metz-Boutique *et al.*, 1984)，而當醣基由乳鐵蛋白移除後，並不影響乳鐵蛋白的功能 (Alcantara *et al.*, 1992)。據研究指出後轉譯修飾作用 (post-translational modification)，如醣化現象 (glycosylation) 會影



圖十、乳鐵蛋白與鐵及陰離子結合位置。

Fig. 10. Schematic representation of the iron and anion-binding sites in lactoferrin. Numbering is for the N-lobe, but the same arrangement is found in the C-lobe.

(Anderson *et al.*, 1989)

響蛋白在 SDS 膠體上位置，而乳鐵蛋白是醣蛋白 (glycoprotein)，不同的醣化程度會影響其大小 (Jin *et al.*, 1997)。另一個影響因素是乳鐵蛋白會和離子有不同程度的結合，而使乳鐵蛋白產生不同的構形，在 SDS 膠片上會出現在不同的位置 (Levay and Viljoen, 1995; Nuijens *et al.*, 1997)。

乳鐵蛋白具有抵抗胰蛋白酶 (trypsin) 及類胰蛋白酶 (trypsin-like) 的能力，這可避免經消化道時被分解，而這能力與是否結合離子及有無醣化現象相關 (Iyer and Lonnerdal, 1993)。以 glycan-dependent 形式，可幫助新生兒吸收母乳中的乳鐵蛋白。而 holo-lactoferrin 較 apo-lactoferrin 更可抵抗蛋白質水解 (Brines and Brock, 1983)。

2.3 乳鐵蛋白之功能

乳鐵蛋白具有多功能，但主要是藉由運輸及儲存鐵離子以維持體液中鐵離子的恆定。除此之外，許多的研究報告更發現乳鐵蛋白還具有抗微生物及調節免疫反應的功能 (Brock, 2002)。

2.3.1 天然抑菌劑

一般來說推測乳鐵蛋白抗菌機轉有其一、乳鐵蛋白螯合鐵離子能力為一般運鐵蛋白的 260 倍，使細菌因缺鐵而無法繁殖。其二、乳鐵蛋白之抑菌片段與革蘭氏陰性菌細胞壁之主成分—脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 結合，並令其由細胞壁上釋出，造成菌膜完整性喪失而呈現不穩定的狀態，並失去維持正常滲透壓或其他正常生理功能而導致菌體死亡 (Ellison *et al.*, 1988)。其三、乳鐵蛋白

能防止微生物附著於上皮下基質的蛋白質 (subepithelial matrix proteins)，並使微生物從黏膜表層去除。乳鐵蛋白能封鎖住細菌本身形成“結合因子” (attachment factor)，如髮狀的結合因子 (fimbriae) 及其他黏著因子 (adhesions)。乳鐵蛋白若能固定於含有硫酸乙醯肝素 (heparan sulfate)，多醣體或鹿角膠表面之黏液表面，其抑菌效果將增加很多倍 (Naidu, 2002)。

2.3.1.1 抗菌活性

未飽和的乳鐵蛋白 (apo-lactoferrin) 除了可以減少微生物對鐵的利用外，並可阻斷微生物對碳水化合物之代謝。若加入其他蛋白如溶菌酶 (lysozyme) 或免疫球蛋白 (Ig A) 協同作用下會提高乳鐵蛋白抗微生物生長之能力 (Balmer *et al.*, 1989)。Payne 等人 (1990) 研究牛之乳鐵蛋白和 apo-lactoferrin (apo-Lf) 在含有 2% 脂肪之超高温殺菌 (ultra high temperature sterilization, UHT) 牛乳中測試 *Listeria monocytogenes* 生長，結果顯示當加入乳鐵蛋白 (鐵飽和度約 52%) 對 *L. monocytogenes* 有抑制作用，加入 apo-Lf 時對 *L. monocytogenes* 有靜菌作用，之後並在 apo-Lf 中加入 ferric ammonium citrate 使 apo-Lf 鐵飽和，結果發現 apo-Lf 抑制菌體的影響徹底被破壞，因而得知乳鐵蛋白的影響是依靠鐵的飽和度及其濃度來決定的；Payne 等人 (1994)，將 EDTA 或 apo-Lf 結合溶菌酶 (lysozyme) 應用在超高温巴斯德殺菌之牛乳來抵抗 *Pseudomonas fluorescens*，*Salmonella typhimurium*，*Escherichia coli* O157 : H7 及 *Listeria monocytogenes*，結果發現不論 EDTA、apo-Lf 或 lysozyme 是單獨使用或結合在一起使用都不會影響 *P. fluorescens* 及 *S. typhimurium* 這兩

株菌的生長。Apo-Lf 濃度在 2.5 mg/mL 以上時，其抑制 *E. coli* O157:H7 和 *L. monocytogenes* 的作用與 lysozyme 的趨勢是相類似的，雖然抑制效果不彰，但經評估 apo-Lf (15 mg/mL) – lysozyme (150 mu-g/mL) 對 *E. coli* 的生長有一些實際的影響，但對 *L. monocytogenes* 則是緩慢的生長。

曹 (1999) 發現乳鐵蛋白能有效抑制大腸桿菌生長的最低濃度為 25 μ M，而鐵離子明顯的終止乳鐵蛋白抑制細菌生長的作用。鐵離子對乳鐵蛋白的影響是與鐵離子的濃度有關的，在含有過量鐵離子濃度的情況下，會導致乳鐵蛋白失去抑制大腸桿菌生長的作用。鐵離子會影響乳鐵蛋白的抑菌作用，其影響機制推測其一，可能乳鐵蛋白的抗菌作用是透過大腸桿菌競爭環境中的鐵離子，使得大腸桿菌無法獲得鐵離子作為養分來源而無法生長。但若有過量的鐵離子存在環境中時，使全數的乳鐵蛋白都與鐵離子結合後，環境中仍有足夠的鐵離子供給大腸桿菌作為養分之用，使大腸桿菌仍可以正常的生長；其二可能是當乳鐵蛋白與鐵結合後，造成乳鐵蛋白的三級結構發生改變，這種結構上的改變導致乳鐵蛋白的抗菌作用位無法表現，便使得乳鐵蛋白的抗菌作用受到影響。在其他人的研究報告中 (Ellison *et al.*, 1988)，發現乳鐵蛋白可以藉由與格蘭氏陰性菌外細胞壁的脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 直接作用，造成脂多醣的破壞與釋放，因此加入死菌觀察是否影響到乳鐵蛋白的抗菌作用，結果發現當乳鐵蛋白在這些死菌之影響下，導致其抗菌能力降低或消失，由此可以發現乳鐵蛋白的抗菌作用與細菌表面有直接性的相關性，此作用可能與細胞之外細胞壁有關。

而比較乳鐵蛋白與其他攜鐵蛋白對抑制大腸桿菌能力的比較發

現，這些攜鐵蛋白同樣可以抑制大腸桿菌的生長。而乳鐵蛋白原本就存在於動物體中，分布於許多黏膜分泌物中，且為自體免疫防禦系統的一部份，此外也存在乳汁中保護新生兒，增加新生兒的抵抗力，所以乳鐵蛋白可以抑制這些已產生抗性的大腸桿菌更具有重大意義。乳鐵蛋白抑制細菌的生長作用不單單只是與細菌競爭鐵離子，更包括了與細菌直接作用而達到抑制細菌生長的效果。

Klebanoff 和 Waltersodorf (1990) 發現 Fe^{2+} 和 apo-lactoferrin 可經由 H_2O_2 當媒介物產生氫氧自由基 (hydroxy radicals, OH) 對 *E. coli* 產生毒性，並假設此作用會抑制微生物生長。另外，Bortner 等人 (1986, 1989) 指出二價陽離子對於乳鐵蛋白的抗菌活性有高度的影響，乳鐵蛋白對於 *Legionella pneumophila* 具有抗菌活性，但當氯化鈣、硝酸鎂及氯化鎂存在時，則抗菌作用會降低，但添加氯化鈉時則無此影響。Ellison 等人 (1990) 發現添加 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 可以封鎖脂多醣從膜中釋出。而乳鐵蛋白會增加 *E. coli* 對抗生素的敏感度，但於 Ca^{2+} 存在下會受到抑制。

目前乳鐵蛋白已證實對 *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* 等革蘭氏陰性菌、*Saphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* 等革蘭氏陽性菌、*Candida albicans*, *Cryptococcus uniguttulatus* 等真菌及好氧菌 (aerobes)、厭氧菌 (anaerobes) 及酵母菌 (yeast) 等都有抑制之作用表現 (Weinberg, 1984)。然而，目前已發現有許多微生物能製造出一種低分子量，且具有高親和力的嗜鐵分子 (siderophores)，能和乳鐵蛋白競爭鐵離子。某些細菌在細胞膜上表現乳鐵蛋白高特異性受器 (receptor)，能

與乳鐵蛋白結合，並吸收入細菌體而得到鐵離子 (Hammerschmidt *et al.*, 1999)。

2.3.1.2 抗真菌活性

Kirkpatrick 等人 (1971) 研究乳鐵蛋白與 fluconazole 結合，發現乳鐵蛋白可以降低 fluconazole 殺死念珠菌 (*Candida species*) 的最小抑制濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。Kuipers 等人 (1999) 建議可結合乳鐵蛋白一起使用於具抗藥性的念珠菌感染。將乳鐵蛋白與抗生素、抗真菌劑和抗菌劑一起使用可增加這些藥劑的效用，具有協同作用 (Ellison and Giehl, 1991; Naidu and Arnold, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1996, 1998)。由於乳鐵蛋白與抗真菌劑結合可抵抗念珠菌感染，因此是具有吸引力的治療選擇之一。Palma 等人 (1992) 的研究結果顯示，人乳鐵蛋白亦能增強多型核白血球 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) 對 *Candida albicans* 之吞噬作用，而被認為具有部份抗真菌的能力。

2.3.1.3 抗病毒活性

人乳鐵蛋白可藉由影響病毒之吸附以及穿透作用，而抑制人類免疫不全病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、巨細胞病毒 (cytomegalovirus) (Harmsen *et al.*, 1995) 以及皰疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) (Fujihara *et al.*, 1995) 感染細胞株。而預先局部投予 1%牛乳鐵蛋白溶液亦被證實可有效預防小鼠角膜 (cornea) 感染皰疹病毒 (Fujihara *et al.*, 1995)。

2.3.1.4 抗寄生蟲活性

關於乳鐵蛋白抗寄生蟲疾病這方面的報告較少，Tanaka 等人 (1996) 指出乳鐵蛋白除能抑制生物生長外，亦能抵抗寄生蟲入侵細胞。Omata 等人 (2001) 也觀察到在 *Toxoplasma gondii* 和 *Eimeria stiedai sporozoites* 的潛伏期下，牛之乳鐵蛋白胜肽可以使感染減弱，推測可能由胜肽直接作用寄生蟲的細胞膜或者是與寄主組織作用而產生影響。另一方面，亦有研究指出乳鐵蛋白對 *Pneumocystis carinii* 有抗寄生蟲的活性，可能的原因是破壞寄生蟲之鐵吸收代謝作用 (Cirioni *et al.*, 2000)，但也有相反的結果發現乳鐵蛋白對於一些寄生蟲也會有正面的幫助，如 *Tritrichomonas foetus* (Tachezy *et al.*, 1996)，此結果類似乳鐵蛋白對於一些病原細菌的作用，如 *N. meningitidis*，可能是細菌利用外膜上的蛋白質來獲得乳鐵蛋白或運鐵蛋白所結合的鐵。

2.3.2 抗氧化作用

微量的過渡金屬具有催化脂質氧化的能力，隨著金屬含量增加其氧化速率也增加。金屬會促進過氧化物的分解，有利於自由基的產生，自由基的反應會促使揮發物降解產物。過渡金屬會使食品的品质下降，這是一個很明顯的問題，但近年來為發展強化食品，故於加工前添加鐵及維生素 C；此二者共存時將促進產生活性氧，如過氧化氫 (hydrogen peroxide)、超氧自由基 (superoxide radical)、羥基自由基 (hydroxyl radical)，此等物質易導致食物中蛋白質組成之色氨酸氧化，因而影響蛋白質之功能性質，也影響了食品保存期限的問題。而此實驗顯示當培養基加入乳鐵蛋白時，可有效地抑制大部分由鐵所誘導之色氨酸氧化，但對維生素 C 氧化之作用較小

(Bihel and Birlerez-Aragon, 1998)。乳鐵蛋白的抗氧化機制牽涉到蛋白質結合或螯合金屬離子的催化，金屬的濃度是非常大的影響因子，然而這些複合物能促進氧化的催化，因此 Satué-Gracia 等人 (2000) 在兩種不同的嬰兒奶粉下加入不同濃度的乳鐵蛋白及鐵，結果發現不論有無含鐵的情況下，乳鐵蛋白都扮演抗氧化劑的角色，且乳鐵蛋白抑制氧化的效果是依靠其濃度。另外，在玉米油乳化液和卵磷脂脂質體 (liposome) 之緩衝溶液 (pH 6.6、50°C) 系統下，乳鐵蛋白有抑制氧化的效果，並發現乳鐵蛋白的抗氧化或促氧化效果是受脂質系統、緩衝溶液、乳鐵蛋白的濃度、金屬離子的濃度和氧化時間的影響 (Huang *et al.*, 1999)。然而，Gutteridge 等人 (1981) 報告鐵飽和的乳鐵蛋白在脂質體系統中是不能抑制氧化作用的。Baldwin 等人 (1984) 建議當鐵的濃度超過乳鐵蛋白的結合能力時，是會促進氫氧自由基的形成。Matsue 等人 (1994) 的報告指出乳鐵蛋白除了有結合鐵的能力，還有抑制丙二醛形成能力。

2.3.3 鐵離子的運送與吸收

乳鐵蛋白以高濃度存在哺乳類動物乳汁中，並結合了乳汁中 30--40% 的鐵離子 (Lonnerdal, 1984; Fairweather-Tait *et al.*, 1987)，因其能抵抗腸胃蛋白酶的消化，所以能將鐵離子安全的送達腸道。而在小鼠、小豬、猴子及小嬰孩的腸道纖毛細胞上，具有對乳鐵蛋白特異性的受器 (Mazurier *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 1990; Gislason *et al.*, 1995)，與乳鐵蛋白結合後，並將其吸收入腸細胞內，達到吸收鐵離子的目的。而乳鐵蛋白也可藉內噬作用而釋放到體內循環，造成全身性的影響。

Nagasako 等人 (1993) 發現在富含鐵溶液中，二價鐵很不穩定且容易變成三價鐵，但是在乳鐵蛋白存在時能穩定二價鐵，而酪蛋白水解液和牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 則不能穩定鐵。使用 cibacron blue affinity gel 證實乳鐵蛋白可結合鐵，根據 native PAGE electrophoresis 顯示過飽和的乳鐵蛋白電荷會高於鐵飽和的乳鐵蛋白，此證明乳鐵蛋白除了螯合位置可抓鐵之外，還有其他的位置可抓鐵，因此乳鐵蛋白可以穩定鐵。

從不同作者所獲得的結果判定牛之乳鐵蛋白添加到嬰兒奶粉中是不會影響到鐵的吸收，因為它可能結合鐵，因此用在嬰兒奶粉中能幫助嬰兒腸道來抵抗所需要鐵之細菌的感染，乳鐵蛋白可以減少內元素 (interelemental) 的作用，且可保護添加鐵和維生素 C 而產生自由基的嬰兒奶粉。雖然牛之乳鐵蛋白非常容易應用，添加乳鐵蛋白可以增加鐵的生物利用性，且現在也有重組人類乳鐵蛋白之乳鐵蛋白，但是添加至嬰兒奶粉的毒性評估也應該考慮 (Jovani *et al.*, 2001)。

2.3.4 調節發炎免疫反應

未結合鐵離子的乳鐵蛋白 (apo-form)，藉著競爭鐵離子，來抑制病原菌生長 (Bullen and Armstrong, 1979)，而在已飽和鐵離子的乳鐵蛋白 (holo-form)，可提供吞噬細胞的吞噬溶酶體產生自由基，再進一步殺死入侵的微生物 (Lima and Kierszenbaum, 1987)。

細菌脂多醣成分可刺激單核白血球/巨噬細胞及嗜中性球蛋白產生細胞激素等內源性媒介物質，誘導發炎部位免疫細胞之補充及活化；因此，當大量脂多醣存在時將造成過度釋放細胞激素之現象，

進而導致敗血性休克 (septic shock)；而乳鐵蛋白則藉由與脂多醣結合，可減少脂多醣對單核球刺激產生過量之 interleukin-1、6 (IL-1、6) 及 Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)，因此乳鐵蛋白具有抗發炎之效果 (Crouch *et al.*, 1992; Machnicki *et al.*, 1993; E-Rochard *et al.*, 1998)。

當細菌感染引發宿主之免疫反應時，造成炎症細胞的浸潤、嗜中性白血球 (neutrophils) 聚集。其中嗜中性球內的顆粒會分泌釋放出高濃度的乳鐵蛋白，並有效的促進自然殺手細胞 (natural killer cell, NK cell) 的細胞毒殺作用 (cytotoxicity)。乳鐵蛋白可限制單核白血球 (monocytes) 及巨噬細胞 (macrophage) 利用鐵離子催化過氧化物 (superoxide) 及 H_2O_2 形成自由基 (free radical) 的反應，此能保護炎症區組織細胞免於自由基的傷害 (Britigan *et al.*, 1991)。

2.3.5 抗癌作用及抗腫瘤作用

在乳鐵蛋白之抗癌研究發現，於小鼠的基本日糧中額外添加 0.2 至 2% 牛乳鐵蛋白，再以皮下注射的方法來誘導結腸癌發生，其機率分別為 25% 及 15%，與無添加之對照組 (57%) 相比，呈現明顯較低的趨勢 (Sekine *et al.*, 1997a)。另一方面，臨床上也證實乳鐵蛋白能於脾臟中增加自然殺手細胞之活性 (Sekine *et al.*, 1997b)。

在乳鐵蛋白對腫瘤細胞的影響方面，乳鐵蛋白已被證明可增加單核白血球以細胞毒殺作用對抗腫瘤細胞的能力 (Nishiya and Horwitz, 1982)。母源之乳鐵蛋白亦可以提高幼兒體內自然殺手細胞的活性，而有效提高幼兒之免疫力 (Horwita *et al.*, 1984; Shau *et al.*, 1992)。

2.3.6 乳鐵蛋白之受器與功能

關於乳鐵蛋白之特異性受器，目前已可在數種細胞上被發現，其中包括單核白血球 (monocyte) (Birgens *et al.*, 1983)、巨噬細胞 (macrophage) (Miyazawa *et al.*, 1991)、血小板 (Leveugle *et al.*, 1993) 恒河猴和小鼠之小腸細胞 (Davidson and Lonnerdal, 1988; Hu *et al.*, 1990)、癌症細胞株 HL-60 (Miyazawa *et al.*, 1991) 以及乳腺上皮細胞等。此外，Bennett 等人 (1986) 以去氧核糖核酸酵素 (deoxyribonuclease, DNase) 與多型淋巴球 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) 共同培養後，發現 PMN 失去與乳鐵蛋白結合的能力，認為乳鐵蛋白受器除了由胺基酸組成外，細胞膜上的某些去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 分子亦可能為受器之部分組成。

至目前為止，各種細胞之乳鐵蛋白特異性受器的功能仍尚未被完全明瞭，目前僅知免疫細胞上之受器可能與細胞素 (cytokine) 的分泌調控有關 (Crouch *et al.*, 1992)；而位於小腸細胞上之乳鐵蛋白受器則被認為可能與鐵離子於腸道的吸收有關 (Davidson and Lonnerdal, 1988; Hu *et al.*, 1990)。此外，乳鐵蛋白與血小板之結合則被 Leveugle 等人 (1993) 認為會抑制血小板的凝集。

2.4 乳鐵蛋白未來之法規及應用

牛乳獲得之乳鐵蛋白被美國食品藥物管理局 (FDA) 視為安全物質 (GRAS)，在牛肉中之允許濃度為 62.5 mg/kg (U.S FDA, 2001)。歐洲國家視乳鐵蛋白為牛乳蛋白質，在日本、南韓則視為天

然添加物 (Naidu, 2002)，而在台灣乳鐵蛋白是屬於食品添加物第八類，是當作營養添加劑使用，限量為「每日食用量中其乳鐵蛋白總量不得高於 100mg」 (行政院衛生署，2002)。

乳鐵蛋白可從牛乳中獲得，可開發為天然抑菌劑，具體上乳鐵蛋白的應用是水溶液，此水溶液包含固定化的乳鐵蛋白和天然的乳鐵蛋白及一些緩衝溶液 (如生理上所需的酸，像檸檬酸和生理上所需的鹼，如氯化鈉)，乳鐵蛋白可被固定化在天然存在的物質，如含有半乳糖的多醣類，可以應用在食品上 (Naidu, 2002)，能去除病原性微生物，並可延長保存期限及於腸道中抑制壞菌之生長，且可用於肉品上，美國農業部 (U. S. Department of Agriculture, USDA) 及食品藥物管理局 (FDA) 已批准使用乳鐵蛋白於新鮮肉品，可噴灑在屠體表面，防止微生物的污染，於包裝前應用於分切牛肉表面，以抑制微生物生長，延長期保存期限 (Naidu, 2002)。

近年來乳鐵蛋白的商業應用，包含了藥劑、嬰兒奶粉、鐵的補充及其飲料、發酵乳、口香糖、促進免疫系統之健康食品、化妝品配方及寵物飼料 (Steijns, 2001)。

材料與方法

一、實驗材料

(一) 豬里肌肉 (pork loin) 購自台中市西區模範市場。

(二) 食品添加物

乳鐵蛋白 (bovine lactoferrin, 由乳清分離, 純度 97%, 蛋白質 95.5%, 水分 4%, 灰分 0.5%, 結合鐵能力 76%, DMV International, Veghel, the Netherlands)、乳過氧化酵素 (bovine lactoperoxidase, 由乳清分離, 蛋白質 95.6%, 水分 4.3%, 灰分 0.8%, 活性 1000 U/mg, DMV International, Veghel, the Netherlands)、過氧化氫 (昭合化學株式會社, 日本)、硫氰酸鈉 (sodium thiocyanate, 林純藥工業株式會社, 日本)。

(三) 包裝材料

發泡生鮮盤 (polystyrene foam tray, 19 × 12.5 cm)、PE 膜 (泉軒企業有限公司, 台灣)。

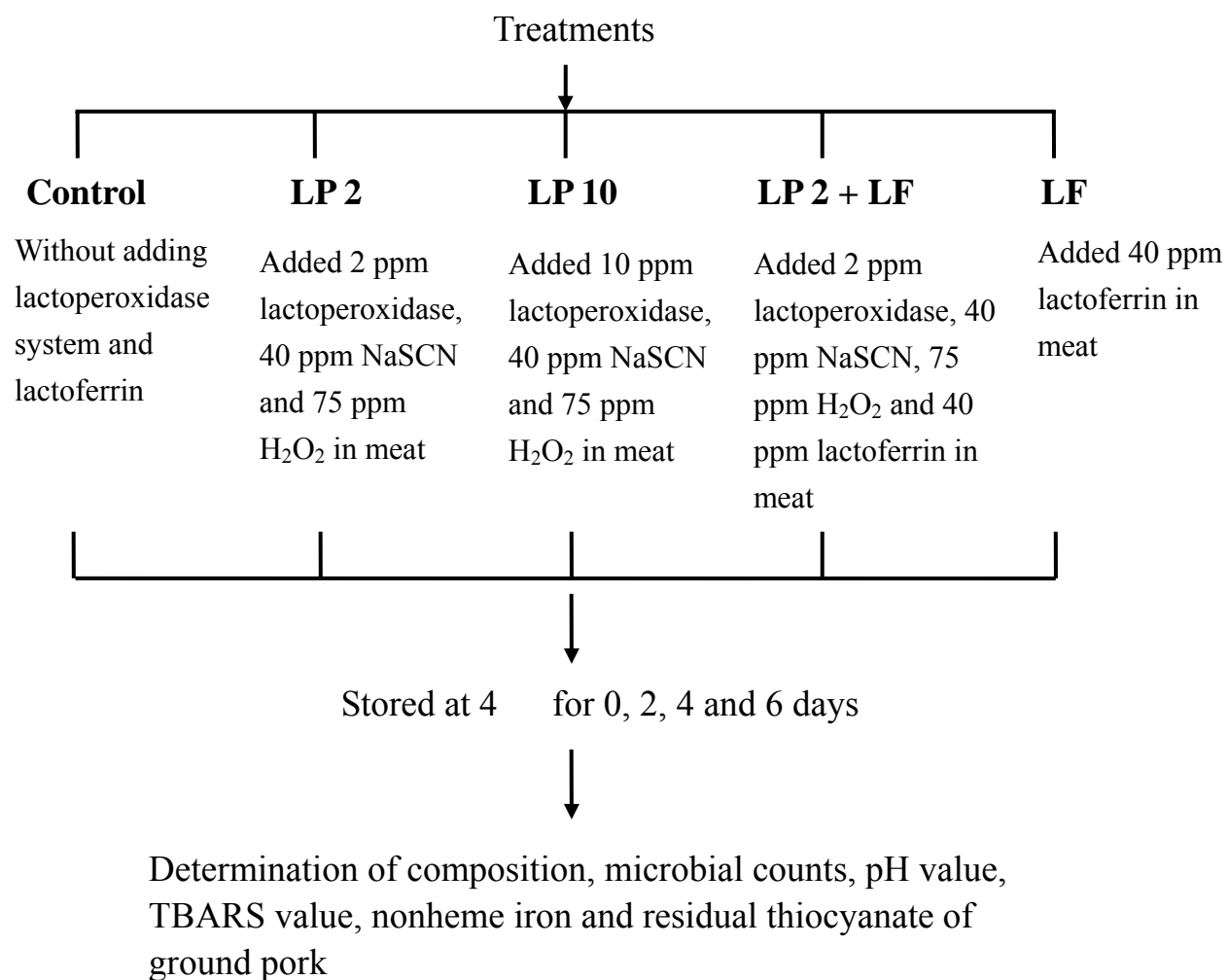
二、試驗設計

本實驗之試驗設計如圖十一所示。

三、實驗方法

(一) 絞碎豬肉之製備

自台中市模範市場購買溫體豬里肌肉 (loin), 以快速 (30 分鐘



圖十一、試驗設計。

Fig. 11. Experimental design.

內) 和低溫保藏 (約 4) 下運至東海大學品質管制研究室，把豬里肌肉以去離水清洗擦乾後，放置於-20 冷凍貯藏 (約 60 小時)。在試驗前再解凍 (4°C，約 34 小時)，此為模擬國外之試驗方式 (Burke and Monahan, 2003)。試驗當天將豬里肌肉去除結締組織及可見脂肪，以絞肉機 (Hobart, model 4612, Ohio, USA) 絞碎，以直徑 1.6 cm 孔徑絞肉盤 (plate) 進行粗絞，再以直徑 1.0 cm 的絞盤進行細絞，即為絞碎豬里肌肉 (ground pork loin)。將樣品稱重分成五組，第一組為控制組 (原料肉中無添加乳過氧化酵素系統及乳鐵蛋白)；第二組添加 2 ppm 乳過氧化酵素、40 ppm 硫氰酸鈉及 75 ppm 過氧化氫；第三組添加 10 ppm 乳過氧化酵素、40 ppm 硫氰酸鈉及 75 ppm 過氧化氫；第四組添加 2 ppm 乳過氧化酵素、40 ppm 硫氰酸鈉、75 ppm 過氧化氫及 40 ppm 乳鐵蛋白；第五組添加 40 ppm 乳鐵蛋白。將試藥先溶於無菌去離子水 (10 mL) 後再添加入樣品 (控制組也添加等量去離子水)，以攪拌機 (Hobart, Kitchen Aid model K45SS, Ohio, USA) 攪拌 5 分鐘 (攪動速度：2，約 38 圈/10 秒)。攪拌之後，各組稱重並置於發泡生鮮盤中，以 PE 膜包裝。於 4°C 冷藏下貯藏 0、2、4 及 6 天。

(二) 一般成份分析 (composition analysis)

1. 水分 (moisture content)

依據 A.O.A.C. (1991) 之方法分析。取樣品約 10 克 (W_1) 放入已達恆重的鋁盤 (W_2) 中，置入 100 ± 2 恆溫乾燥箱 (Risen, RUD-30L, Taipei, Taiwan) 乾燥 16--18 小時，以鑷子將鋁盤取出放在玻璃乾燥器中冷卻至室溫後稱重，反覆稱重達恆重 (W_3) 為止。

計算公式：

$$\text{水分 (\%)} = \frac{(W_1 + W_2) - W_3}{W_1} \times 100\%$$

W_1 ：樣品重 (g)

W_2 ：鋁盤恆重重量 (g)

W_3 ：鋁盤及樣品乾燥至恆重的重量 (g)

2. 粗蛋白質 (crude protein)

依據凱氏氮測定法 (Micro-Kjeldahl method) 分析。以秤量紙稱取 1 克樣品放入玻璃消化管 (digestion glass tube) 中，依序加入 1 顆催化錠 (含 5 克 kaliumsulfat, K_2SO_4 和 5 毫克 selen Se)、3--5 顆沸石 (boiling stone) 和 20 毫升濃硫酸 (sulfuric acid)，再置於蛋白質消化器 (BÜCHI Digestion Unit K-435, Zurich, Switzerland) 上，以 400--450°C 加熱進行消化，使蛋白質態氮 (protein nitrogen) 分解轉為硫酸銨 (ammonium sulfate)，消化中以廢氣過濾器 (BÜCHI Digestion Unit K-414, Zurich, Switzerland) 接收並中和消化過程中所產生的廢氣，直至消化液從黑褐色分解變成澄清無色，取出消化管經冷卻後加入 75 毫升蒸餾水，置於蒸餾裝置 (BÜCHI Digestion Unit K-314, Zurich, Switzerland) 上，添加 40% 氫氧化鈉 (sodium hydroxide) 溶液，使消化管內的消化液為鹼性 (約需 70 毫升)，以盛有 60 毫升、4% 硼酸 (boric acid) 的接收瓶接收氨氣 (ammonia)，收集蒸餾液達 150 毫升，再以盛有 0.1 N HCl 的數位滴定氣 (Brand, Digital Burette III, Nertheim, Germany) 滴定，測其氮量並加以計算出含氮量，再換算成粗蛋白質含量。

計算公式：

$$\text{粗蛋白質 (\%)} = \frac{(A - B) \times N \times 14.007 \times 6.25}{S} \times 100\%$$

A：樣品組之滴定量 (mL)

B：空白組之滴定量 (mL)

N：HCl 之克當量數 (即 0.1)

14.007：氮分子量

6.25：氮係數 (因蛋白質含 16% 的氮，故 $100/16=6.25$)

S：樣品重量 (mg)

3. 粗脂肪 (crude fat)

依據 A.O.A.C. (1984) 之方法分析。以秤量紙稱取 5 克樣品 (W_1)，放入圓筒濾紙 (thimble) 內，於 100°C 恆溫箱乾燥 1--2 小時，將萃取杯 (extraction cup) 稱重 (W_2) 後盛裝 $2/3$ 容積的石油醚 (petroleum ether)，以粗脂肪快速測定儀 (Tecator, Soxtec System HT6 Extraction Unit 1043 011 和 Service Unit 1044 011, HöGANÄS, Sweden) 萃取粗脂肪，萃取完後之萃取杯於加熱板上乾燥至無味為止，在置於玻璃乾燥器中冷卻 30 分鐘，稱重並紀錄 (W_3) 之，代入下列公式計算粗脂肪含量。

計算公式：

$$\text{粗脂肪 (\%)} = (W_3 - W_2) / W_1 \times 100\%$$

W_1 ：樣品重量 (g)

W_2 ：萃取杯重量 (g)

W_3 ：萃取杯及樣品乾燥至恆重時的總重量 (g)

4. 灰分 (ash)

依據 Ockerman (1985) 之方法分析。稱取 5 克樣品 (W_1) 至已達恆重之坩鍋 (W_2) 中，以 $100 \pm 2^\circ\text{C}$ 的恆溫箱乾燥 8 小時，再置於高溫灰化爐 (N5/RL, Nabertherm, Germany) 中以 525°C 灰化 18 小時，取出後置於玻璃乾燥器中冷卻 30 分鐘，稱重並記錄 (W_3) 之，代入下列公式計算粗脂肪含量。

計算公式：

$$\text{灰分 (\%)} = (W_3 - W_2) / W_1 \times 100\%$$

W_1 ：樣品重量 (g)

W_2 ：坩鍋恆重 (g)

W_3 ：坩鍋及樣品灰化至恆重時的總重量 (g)

(三) 微生物測定 (microbial analysis)

1. 總生菌數 (total plate counts)

依據中國國家標準 (1991) 之方法分析。自各組中隨機取出一盤絞碎豬肉 (約 75 克)，稱取 25 克樣品，放入已滅菌之刀口瓶中，加入 225 毫升含 0.1% peptone (Bacto™ peptone, Difco, USA) 之無菌水，均質 1 分鐘 (Osterizer, Mexico) 後，將樣品稀釋成各種不同適當濃度；取 1 毫升樣品稀釋液於無菌培養皿 (petri dish) 中，以傾倒法 (pour plate method) 倒入 12--15 毫升 (約 $45\text{--}50^\circ\text{C}$) 的無菌 PCA (plate count agar, Difco, USA)，經凝固後，倒置於 $35\text{--}37^\circ\text{C}$ 恆溫培養箱 (Kuan Sheng, Taipei, Taiwan) 中培養 48 ± 2 小時。選取菌落數在 25--250 間之培養皿，計算其菌落數 (CFU/g)。

2. 假單胞菌數 (*Pseudomonas* spp. counts)

以 Hinton Jr. 等人 (2004) 之方法分析。吸取 0.1 毫升樣品稀釋液於已製備好之 *Pseudomonas* CFC 選擇性培養基 (*Pseudomonas* selective agar base and *Pseudomonas* CFC selective supplement, Merck, Germany) 上，以表面塗佈法 (surface spread method) 塗抹。等培養基表面乾燥後，倒置於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 恆溫培養箱 (Kuan Sheng, Taipei, Taiwan) 中培養 44 ± 4 小時。選取菌落數在 25--250 間之培養皿，計算其菌落數 (CFU/g)。

(四) 分析項目

1. 酸鹼值 (pH value)

依據 Ockerman (1985) 之分析方法。稱取樣品 10 克加入 100 毫升蒸餾水，以均質機 (Osterizer, Mexico) 均質 1 分鐘。酸鹼度計 (InoLab pH 720, Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim, Germany) 先以 pH 4 和 pH 7 (WTWM 108 708, Weilheim, Germany) 進行校正，再將玻璃電極 (glass electrode) (InLab 427, WTW, Weilheim, Germany) 插入樣品中，直到 pH 值不再變動為止。

2. 硫巴比妥酸值 (thiobarbituric acid-reactive substances values)

依據 Ockerman (1985) 所述之方法分析。

(1) 試劑之配製

(a) 4 N 鹽酸溶液 (hydrochloric acid, HCl solution)

取 1 體積之 12 N 之濃鹽酸 (37%) 與 2 體積之蒸餾水溶液混合。強酸溶液於加熱蒸餾時可使結合於肉蛋白質的丙二

醛水解出來。

(b) 0.02 M 硫巴比妥酸試劑 (2-thiobarbituric acid, TBARS reagent)

取 1.442 克 2-thiobarbituric acid ($\text{NHCSNHCOCH}_2\text{CO}$, Sigma, St. Louis, USA) 溶於 500 毫升之 90% 冰醋酸 (glacial acetic acid, 島久藥品株式會社, 大阪市, Japan) 中, 並置於棕色玻璃瓶中, 此為 TBARS 試劑。

(2) 測定之步驟

稱取 10 克樣品於刀口瓶中, 加入 50 毫升蒸餾水, 使用均質機 (Osterizer, Mexico) 均質 2 分鐘, 移入克氏燒瓶中, 再用 47.5 毫升蒸餾水清洗刀口瓶並倒入克氏燒瓶 (PYREX[®], Raleigh, USA), 加入 2.5 毫升之 4 N HCl (聯工化學廠股份有限公司, Taiwan)、數滴抗泡劑 (antifoam A emulsion, Sigma, St. Louis, USA) 和數顆沸石 (boiling stone, 林純藥工業株式會社, 日本) 進行蒸餾。當收集 50 毫升之蒸餾液後, 取 5 毫升之蒸餾液 (空白組以 5 毫升蒸餾水取代), 加入 5 毫升 TBARS 試劑後於沸水浴加熱 35 分鐘, 流水冷卻 10 分鐘, 以分光光度計 (Milton Roy, Spectronic[®] Genesys[™] 5 Spectrophotometers, Rochester, New York, USA) 於 538 nm 波長下測其吸光值。

計算公式：

$$\text{TBARS value (mg malonaldehyde/kg meat)} = \text{O.D. value} \times 7.8$$

7.8：濃度 0--10 μM TMP (1,1,3,3-tetramethoxypropane) 製作 TMP 標準曲線, 所得一常數 K 值。

3. 非血基質鐵 (nonheme iron)

依據 Rhee and Zuprin (1987) 之方法分析。

(1) 試劑之製備

(a) 0.39%亞硝酸鈉 (sodium nitrite, NaNO₂) 溶液

稱取 0.39 克亞硝酸鈉以去離子水定量至 100 毫升，此溶液含有 0.39%亞硝酸鈉，由於加入 0.2 毫升此溶液至酸混合溶液 (acid mixture) 中，且樣品重為 5 克，故在全部溶液中亞硝酸鈉為 156 ppm。此試劑需要新鮮配置。亞硝酸鈉之目的為穩定 porphyrin ring 避免酸或溫度造成血基質鐵 (heme-associated iron) 斷裂成非血基質鐵 (nonheme iron) 而造成非血基質鐵的高估 (overestimate)。

(b) 酸混合溶液 (acid mixture, HCl-TCA solution)

將 6 N HCl 和 40%三氯醋酸 (trichloroacetic acid; TCA, Sigma, St. Louis, USA) 等體積混合。所含的 TCA 為一種蛋白質沉澱劑，可以使肉血基質蛋白 (hemeprotein) 沉澱。

(c) 深啡啉雙磺酸酯試劑 (bathophenanthroline disulfonate reagent, Sigma, St. Louis, USA)

取 0.162 克 bathophenanthroline disulfonic acid，溶於 100 毫升的去離子水，加入 2 毫升硫乙醇酸 (thioglycolic acid, Merck, Darmstadt, Germany)，把配好的試劑存於褐色瓶中。因為加熱樣品時會促進硫化基生成，使 Fe³⁺ 還原成 Fe²⁺，此亞鐵離子會與 bathophenanthroline disulfonate reagent 反應生成複合物，於 540 nm 有吸收峰。

(d) 顏色試劑 A (color reagent A)

配製 water : saturated sodium acetate solution : bathophenanthroline disulfonate reagent = 20 : 20 : 1 之溶液，此試藥需要新鮮配製。

(e) 顏色試劑 B (color reagent B)

配製 water : saturated sodium acetate solution = 21 : 20 之溶液，此試藥需要新鮮配製。

(2) 標準曲線 (圖十二) 之製作

鐵標準溶液 (iron standard solution, 1000 mg Fe³⁺/L, Merck, Darmstadt, Germany) 濃度為 1000 mg Fe³⁺/L (即 1000 ppm 或 0.1%)，依據以下方式，以 acid mixture 稀釋，配製成濃度 0、0.5、1、2、3 及 4 mg Fe³⁺/L 的 iron standard solution-acid mixture。

濃度 (mg/L, ppm)	0	0.5	1	2	3	4
鐵標準溶液 (mL)	0	0.0125	0.025	0.05	0.075	0.1
酸混合溶液 (mL)	25	24.9875	24.975	24.95	24.925	24.9
總體積 (mL)	25	25	25	25	25	25

各取 1 毫升 iron standard solution-acid mixture 加入 5 毫升顏色試劑 A，振盪混合均勻，在 4°C 下以 35000 ×g 離心 10 分鐘 (Hitachi, Himac SCR 20B, Tokyo, Japan)，利用分光光度計 (Milton Roy, Spectronic[®] Genesys[™] 5 Spectrophotometers,

Rochester, New York, USA) 於 540 nm 波長下測定其吸光值。

(3) 測定之步驟

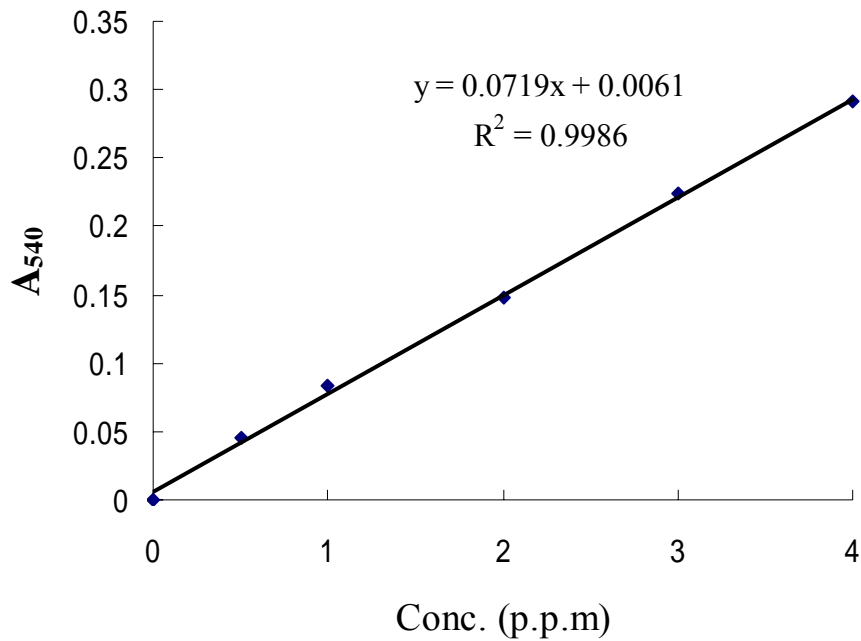
取 5 克絞碎豬肉於試管中，加入 0.2 毫升之 0.39% 亞硝酸鈉溶液和 15 毫升酸混合溶液。蓋上塑膠蓋，於 65°C 之水浴振盪槽 (TKS, Model SB 301, Taipei, Taiwan) 反應 20 小時後，冷卻至室溫。取 1 毫升上層液 (incubated liquid phase) 至離心管，加入 5 毫升顏色試劑 A，此時呈淡粉紅色，混合均勻後，在 4°C 下以 3500 ×g 離心 10 分鐘。利用分光光度計於 540 nm 下測定吸光值 (A 值)。另取 1 毫升上層液 (空白組則取 1 毫升酸混合液) 置入離心管，加入 5 毫升顏色試劑 B，此時呈淡黃色，混合均勻後，在 4°C 下以 3500 ×g 離心 10 分鐘。利用分光光度計於 540 nm 下測定吸光值 (B 值)。A 值減 B 值即得 C 值，便可扣除因加熱所造成褐色升成的干擾。

計算公式：

Nonheme iron content :

$$\frac{\text{nonhem iron (}\mu\text{g)}}{\text{meate (g)}} =$$

$$\frac{\text{Fe conc. of liquid (}\mu\text{g/mL)} \times (15 \text{ mL} + \text{moisture content of 5 g meat})}{5 \text{ (g)}}$$



圖十二、非血基質鐵之標準曲線。

Fig. 12. Standard curve for nonheme iron content.

4. 硫氰酸根離子殘留量 (Residual thiocyanate)

依據 Seifu 等人 (2003) 之方法並經過修飾進行分析。

(1) 試劑之製備

(a) 20%三氯醋酸溶液 (trichloroacetic acid solution, w/v)

取 20 克三氯醋酸 (trichloroacetic acid, TCA, Sigma, St. Louis, USA) 溶於 80 毫升去離子水。

(b) 硝酸鐵試劑 (ferric nitrate reagent)

取 5 克硝酸鐵 ($[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}]$ ，林純藥工業株式會社，日本) 加入 10 毫升硝酸 (比重 1.40) 後，以去離子水定量至 50 毫升。

(2) 硫氰酸根離子標準曲線 (圖十三) 之製作

硫氰酸鈉溶液 (sodium thiocyanate, NaSCN, 林純藥工業

株式會社，日本) 濃度為 100 mg /L (即 100 ppm)，依據以下方式，以去離子水稀釋，配製成濃度 0、1、2、3、4 及 5 mg /L 的硫氰酸鈉溶液稀釋液。

濃度 (mg/L, ppm)	0	1	2	3	4	5
硫氰酸鈉溶液 (mL)	0	0.5	1	1.5	2	2.5
去離子水 (mL)	50	49.5	49	48.5	48	47.5
總體積 (mL)	50	50	50	50	50	50

各取 1.5 毫升稀釋液加入 1.5 毫升硝酸鐵試劑，混合均勻後以分光光度計 (Milton Roy, Spectronic[®] Genesys[™] 5 Spectrophotometers, Rochester, New York, USA) 於 460 nm 波長下測定其吸光值。

(3) 測定步驟

取 5 克絞碎豬肉於離心管中，加入 25 毫升去離子水，以 7000 ×g 均質 10 秒 (POLYTRON[®] PT 3000, KINEMATICA[®], Newark, USA) 後，在 4°C 下以 8000 ×g 離心 20 分鐘 (Hitachi, Himac SCR 20B, Tokyo, Japan) ，進行過濾 (Whatman No. 1, England) 得濾液。取 4 毫升濾液加入 2 毫升 20% 三氯醋酸溶液均勻混合後，靜置 30 分鐘後過濾 (Whatman No. 1, England) ，取此濾液 1.5 毫升加入 1.5 毫升硝酸鐵試劑，利用分光光度計 (Milton Roy, Spectronic[®] Genesys[™] 5 Spectrophotometers, Rochester, New York, USA) 於 460 nm 波

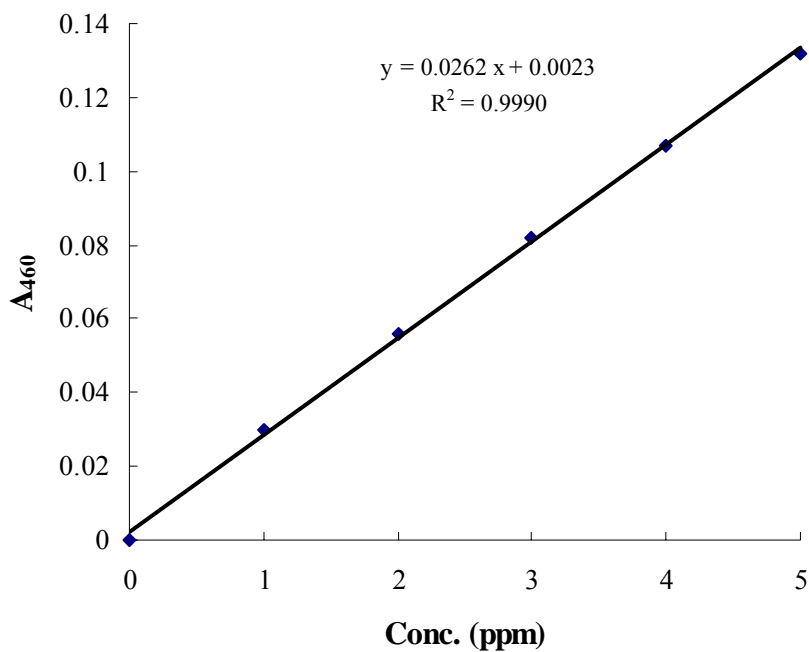
長下測定其吸光值。

計算公式：

Residual thiocyanate :

$$\frac{\text{thiocyanate (}\mu\text{g)}}{\text{meat (g)}} =$$

$$\frac{\text{SCN}^- \text{ conc. of liquid (}\mu\text{g/mL)} \times (25 \text{ mL} + \text{moisture of 5 g meat})}{5 \text{ (g)}}$$



圖十三、 硫氰酸根離子之標準曲線。

Fig. 13. Standard curve for thiocyanate.

5. 統計分析

本試驗為完全逢機設計 (completely randomized design; CRD) 處理間安排採用複因子試驗 (factorial experiment)，所測得數據利用 statistical analysis system (SAS, 2002) 統計套裝軟體進行變方分析，以一般線性模式程序 (GLM procedure) 進行各種不同處理之差異性測定，並以最小平方平均法 (least-square mean) 比較各處理間平均值之差異顯著性。