

壹、摘要

牛乳為高營養價值食品，必須經殺菌處理，消滅病原菌以確保飲用安全，其殺菌條件愈高，乳中殘留酵素活性及生菌數愈低，保存期愈長，然而，不同的殺菌條件造成牛乳不同程度之理化學性質變化。本研究主要藉不同殺菌條件之鮮乳，依據蛋白酶水解後胜肽生成量，應用反應曲面法，評估鮮乳之適宜殺菌條件。首先尋找反應曲面法二因子中心複合設計之第一因子 X_1 取得殺菌溫度；接著以其第二因子 X_2 取得殺菌時間；再以 X_1 與 X_2 二因子之最高點，作為二因子旋轉中心複合設計試驗之中心點，找出最適殺菌條件；進而分析最適殺菌條件鮮乳之理化學性質，並與市售低溫鮮乳及保久乳作比較。結果顯示，第一因子中心點為 81°C ，第二因子中心點為 20 秒，以 81°C ，20 秒作二因子旋轉中心複合設計試驗，經蛋白酶水解之胜肽生成量，利用 SAS 統計軟體系統分析，得 81°C ，20 秒殺菌鮮乳之胜肽生成量落在反應曲面圖之最高點與等高線圖之中心點；且 81°C ，20 秒殺菌鮮乳之鹼性磷酸酶及乳過氧化氫酶均呈陰性反應，其乳成分與市乳比較並無特別差異 ($P>0.05$)，色澤 L^* 、 b^* 值及滴定酸度較市乳低 ($P<0.05$)，pH 值、有效離胺酸含量及未變性乳清蛋白含量均高於市乳 ($P<0.05$)，經 SDS-PAGE 電泳分析顯示， 81°C ，20 秒殺菌鮮乳較市乳保有較多未變性乳清蛋白，

經蛋白酶水解後，其胜肽生成量較市乳高 ($P < 0.05$)，官能品評之總接受度介於各種市乳間。所以藉體外蛋白水解試驗之胜肽生成量，建立鮮乳最適殺菌條件為 81°C 維持 20 秒。

關鍵詞：鮮乳、殺菌條件、蛋白水解、反應曲面法

貳、前言

乳汁為哺乳類動物於分娩後，母畜乳腺所分泌之白濁汁液，乃為營養相當豐富之食物，如人乳、牛乳、豬乳...等，主要提供仔畜賴以生存之最佳營養來源。牛乳約含 88% 水分及 12% 總固形物，總固形物包括蛋白質、脂質、乳糖及其他無機鹽類等，蛋白質富含各種必需胺基酸，且其生物價相當高，僅次於雞蛋蛋白，為優良蛋白質，易滋長微生物，為維護牛乳產品衛生條件、確保產品貯存期間之品質，必須應用殺菌或滅菌方式來破壞乳中病原菌、降低酵素活性及生菌數，以延長其保存期 (Wilbey, 1996)。

於乳品工業，一般以熱處理方式殺菌，其中應用於低溫鮮乳之殺菌方法包括：高溫短時間殺菌 (HTST)、高溫殺菌 (HTP) 及超高溫瞬間滅菌 (UHT) 等方式；而保久乳則以超高溫瞬間滅菌 (UHT) 配合無菌充填密封包裝設備 (Tetra Pak)，或二段式高壓滅菌 (瓶裝滅菌)；相對於低溫殺菌，二段式高壓滅菌以高溫長時間加熱處理，導致牛乳之生物利用性與一般營養價值較低 (Morales *et al.*, 2000; Adriana *et al.*, 2003)。

不同的殺菌條件造成牛乳之理化學性質產生不同程度變化，適當的加熱，可改變蛋白質結構，使其橫向之共價鍵斷裂，而易被蛋白酶水解；然而，過當的加熱將破壞乳清蛋白之三級結構，硫氫基

(-SH group) 裸露而彼此產生雙硫鍵架橋，另一方面則係乳清蛋白受熱變性而與酪蛋白產生疏水交互作用，形成更強而有力之橫向共價鍵，而生成穩定的 κ -酪蛋白/ β -乳球蛋白之共價複合物，造成其結構發生嚴重變化 (Vasbinder and Kruif, 2003)，或致使蛋白質與糖類間交互作用產生梅納反應 (Sensidoni *et al.*, 1999) 等，此梅納反應之鍵結強韌，不易受蛋白酶破壞，而降低蛋白質消化率 (Erbersdobler and Dehn-Muller, 1989)。本研究主要就不同殺菌條件鮮乳之酵素水解率作探討要點，藉不同殺菌條件之鮮乳，依據體外蛋白水解試驗後胜肽生成量，應用反應曲面法分析，建立鮮乳之最適殺菌條件。

參、文獻檢討

一、牛乳之殺菌

於十九世紀，乳品工業已應用熱處理殺滅乳中所有病原菌，降低酵素活性與生菌數，以確保乳品食用衛生安全，其熱處理大致分為低溫長時間殺菌（Low temperature long time, LTLT）、高溫短時間殺菌（High temperature short time, HTST）、高溫殺菌（High temperature treatment, HTT）及超高溫瞬間滅菌（Ultra-high temperature, UHT）等方法（Wilbey, 1996）。Morales *et al.*（2000）指出乳品工業上之殺菌方式有 Pasteurization（85°C 維持 30 秒）、直接加熱方式超高溫瞬間滅菌法（Direct UHT, 150°C 維持 4 秒）、間接加熱方式超高溫瞬間滅菌法（Indirect UHT, 140°C 維持 3 秒）、二段式高壓滅菌法（Pre-sterilization, 130°C 維持 2 秒與 In-bottle sterilization, 116°C 維持 1000 秒）等，應用不同程度之殺菌條件使牛乳產生不同程度之理化學變化。

二、熱處理對乳成分之影響

牛乳乃係母牛提供仔牛所需要之營養物質，其營養組成完善，亦是微生物的良好培養基，因此易受微生物污染，致使保存不易，

自古以來即利用加熱方式以延長牛乳的保存性。然而，牛乳加熱處理，引起乳成分之種種物理或化學上的變化，且變化程度亦隨著加熱程度增加而加劇（林，1993）。

（一）酪蛋白（Casein）

Panouill'e *et al.* (2005) 指出，酪蛋白為牛乳之主要蛋白質，佔牛乳蛋白之 80~90%，以酪蛋白微球（Casein micelles）呈膠體狀溶液形式存在，酪蛋白微球直徑約 80 nm，主要包含四種不同次單元分子： α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 β -酪蛋白及 κ -酪蛋白等，其比例約為 3:1:3:1；酪蛋白含大量的脯胺酸（Proline）而具熱安定性，此熱安定性乃係由於脯胺酸可防止氫鍵形成，將牛乳於沸點經 14 小時、130°C 維持 1 小時或 140°C 數分鐘熱處理，發現酪蛋白不易經熱處理而破壞，且也不易產生熱凝固（Panouill'e *et al.*, 2004）。酪蛋白乾物質中約含有 8% 礦物質，鈣、無機磷酸鹽結合成細微的磷酸鈣集合體，稱為膠體磷酸鈣（Colloidal calcium phosphate, CCP），CCP 若與酪蛋白鍵結，稱酪蛋白微球，CCP 若吸附於酪蛋白微球表面，此與酪蛋白微球之構造穩定息息相關，因酪蛋白微球內部藉酪蛋白之磷酸根與鈣連結，使酪蛋白微球表面產生並維持適當靜電荷能量，形成懸浮膠體溶液，若微球結構之 CCP 被移除，則會影響酪蛋白微球間之穩定性，CCP 存在方式亦影響酪蛋白微球

顆粒大小，溫和加熱或 60-90°C 維持 10 分鐘或 140°C 維持 10 秒鐘，對酪蛋白微球無太大影響，但是 140°C 持續維持 4-10 分鐘，乳清蛋白會吸附於酪蛋白微球上，而凝集成 200 nm 膠體顆粒 (Carbonaro *et al.*, 2000; Panouill'e *et al.*, 2004)。溫度高於 90°C 時，會影響乳清蛋白與酪蛋白及酪蛋白微球間之交互作用而致結構改變，乳清蛋白之 β -乳球蛋白及 α -乳白蛋白之游離硫氫基，會與 κ -酪蛋白產生共價鍵結，使酪蛋白微球顆粒變大 (Milena and Dalgleish, 1999)。

(二) 乳清蛋白質 (Whey protein)

乳清蛋白對熱敏感，於 70°C 熱處理 30 分鐘，使 29% 乳清蛋白變性，乳清蛋白質佔牛乳蛋白質之 20%，主要次單元分子有 β -乳球蛋白 (β -Lactoglobulin)、 α -乳白蛋白 (α -Lactalbumin)、牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin)、乳鐵蛋白 (Lactoferrin)、免疫球蛋白 (Immunoglobulin)、蛋白胍 (Proteose) 及蛋白腓 (Peptone) 等，其對熱敏感性依序為免疫球蛋白、血清白蛋白、 β -乳球蛋白及 α -乳白蛋白，而蛋白腓及蛋白胍對熱則不敏感 (Milena and Dalgleish, 1996; Law and Leaver, 1999)。

Villamiel *et al.* (1997) 應用熱交換板進行牛乳加熱，調控交換板之溫度與流速，觀察熱處理程度與乳清蛋白變性之關係，顯示乳清蛋白之 β -乳球蛋白於 60°C 熱處理，即產生變性，變性乳清蛋白

與酪蛋白微球鍵結，當 pH 值調至酪蛋白等電點 pH 4.6 時，此時與酪蛋白鍵結之 β -乳球蛋白即隨酪蛋白沈降，且沈降量隨著熱處理程度加劇而增加，使乳中未變性乳清蛋白呈線性減少。

乳清蛋白質在溫和加熱時，由於氫鍵及疏水鍵等受到破壞，使其結構打開，而較易受蛋白酶水解，此溫和加熱反應屬可逆反應 (Schmidt and Morris, 1984; Mulvihill and Kinsella, 1987)。乳清蛋白於較劇烈熱處理下其三級結構遭破壞使硫氫基 (-SH group) 裸露，而裸露之硫氫基彼此鍵結產生自身雙硫鍵架橋，使乳清蛋白形成不可逆的變性或凝集 (Aggregation) (Jelen and Rattray, 1995; Kazmierski and Corredig, 2003)，此外，受熱變性的乳清蛋白與酪蛋白產生疏水交互作用，形成穩定的 κ -酪蛋白/ β -乳球蛋白之共價複合物 (Haque and Kinsella, 1988)。

De Wit *et al.* (1984) 指出，乳清蛋白於溫度達 70°C 時，開始發生變性，其次單元成分中以免疫球蛋白最易變性， α -乳白蛋白對熱最安定，於熱處理下，乳清蛋白之 β -乳球蛋白與 κ -酪蛋白會以雙硫鍵鍵結，由於 β -乳球蛋白與 κ -酪蛋白鍵結後，使 κ -酪蛋白露出自由的硫氫基，再與 α -乳白蛋白產生鍵結，因此， α -乳白蛋白與 κ -酪蛋白鍵結的比例較 β -乳球蛋白低；乳清蛋白中之 β -乳球蛋白於 30°C 以上，則由雙體變成單體， β -乳球蛋白

含有一個硫氫基和兩個雙硫鍵，其佔牛乳蛋白質中未鍵結硫氫基約 90%，為牛乳中最易受熱變性的蛋白質， α -乳白蛋白具較高的復原性(Renaturation)，故熱敏感性不及 β -乳球蛋白(Hashizume and Sato, 1988b; Parnell-clunies *et al.*, 1988)。一般乳清蛋白質在 70°C 下加熱即變性，95°C 下熱處理則產生不可逆變性(Hashizume and Sato, 1988a; Li-chan *et al.*, 1995)。

(三) 酵素 (Enzyme)

牛乳含許多酵素，如鹼性磷酸酶(Alkaline phosphatase, EC 3. 1. 3. 1)、酸性磷酸酶(Acid phosphatase, EC 3. 1. 3. 2)、觸酶(Catalase, EC 1. 11. 1. 6)、過氧化氫酶(Peroxidase, EC 1. 11. 1. 7)、黃色嫌氧化酶(Xanthine oxidase, EC 1. 2. 3. 2)、脂蛋白解脂酶(Lipoprotein lipase, EC 3. 1. 1. 34)、澱粉酶(Amylases, EC 3. 2. 1. 1 and EC 3. 2. 1. 2)、溶菌酶(Lysozyme, EC 3. 2. 1. 17)及血纖維蛋白溶酶(Plasmin, EC 3. 4. 21. 7)等；鹼性磷酸酶喪失活性條件為 63°C，30 分鐘，非產孢子病原菌致死溫度較鹼性磷酸酶喪失活性之溫度為低，因而乳品工業上常檢測牛乳中鹼性磷酸酶活性作為殺菌指標，當鹼性磷酸酶活性呈陰性反應時，表示牛乳已達最低殺菌標準(Farkye and Imafidon, 1995)；酸性磷酸酶耐熱性較高，於 95.9°C 維持 1 分鐘或 88.2°C 維持 3 分鐘失活(Griffiths, 1986)；觸酶活性隨著體細胞

數或微生物污染程度而增加，於 70°C 維持 30 分鐘時完全失活 (Ito and Akuzawa, 1983)；過氧化氫酶、過氧化氫 (H₂O₂) 及硫氰化物 (Thiocyanate) 三者構成具抗菌能力之乳過氧化氫酶系統 (Lactoperoxidase system, LPS)，80°C 加熱 3 至 5 秒造成過氧化氫酶完全失活 (Griffiths, 1986)；黃色嫌氧化酶於 90.5°C 維持 15 秒失活 (Greenbank and Pallansch, 1962)。乳品工業檢驗鹼性磷酸酶及乳過氧化氫酶以界限 HTST 之殺菌條件，當鹼性磷酸酶呈陰性反應時，表示牛乳達最低殺菌標準，而乳過氧化氫酶呈陰性反應時，表示牛乳經過高於 80°C，2.5 秒以上之加熱條件 (Burton, 1988)。

(四) 礦物質 (Mineral)

乳中之礦物質包括鈣 (Calcium)、鎂 (Magnesium)、鈉 (Sodium)、鉀 (Potassium)、氯 (Chloride)、檸檬酸鹽 (Citrate) 及磷酸鹽 (Phosphate) 等，其濃度範圍約為 5-40 mM (Holt, 1995)。牛乳之鹽類以溶解相與膠質相之間呈平衡狀態存在，但外部條件稍有變化，則會發現相與相間之轉移現象，此種轉移於外界緩和之變化下為完全可逆反應，如牛乳經殺菌處理後其鈣離子濃度將減少，於 4°C 下放置 24 小時後，即可恢復至原來濃度，然而，於劇烈之高溫熱處理，則將不可逆或僅部分可逆，故依溫度之變化，鹽類之分佈將有相當之變異，此為磷酸鈣在乳中以飽和狀態存在，而其溶

解度能隨溫度之上升而顯著減低之緣故（張，1989；林，1993）。

（五）維生素（Vitamin）

維生素乃係人體或動物於成長時所必須之微量成分，其可分為二大類：脂溶性維生素（Fat-soluble vitamin）及水溶性維他命（Water-soluble vitamin），其中維生素 B 群均屬水溶性維生素，包括最重要的維生素 B₁（Thiamin hydrochloride）、維生素 B₂（Riboflavin phosphate）、維生素 B₆（Pyridoxine hydrochloride）及維生素 B₁₂（Cyanobalamine）等，脂溶性維生素則包括維生素 A（Retinyl palmitate）、維生素 D₃（Cholecalciferol）及維生素 E（ α -Tocopherol acetate）等，可應用高效能液相層析儀（High-performance liquid chromatographic, HPLC）分析定量（Soledad *et al.*, 1997; Moreno and Salvadó, 2000）。熱安定性之維生素，包括維生素 A、D、E、 β -胡蘿蔔素（ β -Carotene），及部分維生素 B 群，如核黃素、菸鹼酸（Nicotinic acid）、泛酸（Pantothenic acid）及生物素（Biotin）等，於熱處理過程中，均不易受影響；而乳中之維生素 C（Ascorbic acid）、維生素 B₁、維生素 B₁₂ 及葉酸（Folic acid）等均為熱不安定物質，於熱處理下易受破壞，維生素 C 於低溫殺菌法即可造成流失，維生素 B₁、B₁₂ 及葉酸則於高溫高壓滅菌時會流失，且維生素 B₁₂ 及葉酸受破壞之反應複雜，與氧氣、

維生素 C 及游離硫氫基 (-SH group) 存在相關，維生素 B₆ 對熱雖僅受些微影響，但於貯存期間則會大量流失，經熱處理之乳製品，於室溫下貯存 90 天，使 50% 以上之維生素 B₆ 流失(Burton, 1988)。

(六) 糖類 (Carbohydrate)

乳糖於牛乳熱處理過程中會產生許多複雜反應，如梅納反應 (Maillard reaction) 及異構化反應等，生乳中並無乳酮糖(Lactulose, 4-o-β-Dgalactopyranosil-D-fructofuranose) 存在，而於熱處理時乳糖會受熱轉變成同分異構物之乳酮糖 (Andrews, 1986)，而於更嚴苛熱處理下，乳酮糖會降解成部分之果糖 (Fructose) 與半乳糖 (Galactose)，及產生蟻酸 (Formic acid)、乳酸 (Lactic acid) 等小分子有機酸(林, 1993; Pellegrino *et al.*, 1995)。Morales *et al.* (2000) 將生乳經85°C，30秒殺菌、直接加熱方式超高溫瞬間滅菌 (150°C 4秒)、間接加熱方式超高溫瞬間滅菌 (140°C，3秒) 及二段式高壓滅菌法處理 (先以130°C 維持2秒之Pre-sterilization處理，再以116°C 維持1000秒之In-bottle sterilization滅菌)，發現乳酮糖含量隨著熱處理程度提高而增加，經低溫殺菌處理之乳酮糖生成量低於50 mg/L，經直接、間接二種超高溫瞬間滅菌及超高溫瞬間滅菌配合無菌充填包裝乳之乳酮糖含量分別為：120、250及456 mg/L，而經二段式高壓滅菌瓶裝保久乳之乳酮糖為1121 mg/L。

三、熱處理對牛乳理化學性質之影響

(一) 風味 (Flavor)

牛乳於熱處理溫度達 70°C 以上時，會產生一特殊風味，稱之為加熱臭 (Heated flavour)，如 β -乳球蛋白，其於 70°C 下加熱，蛋白質之雙硫鍵被切斷而釋出游離硫氫基 (-SH group)，此為揮發性物質，賦予剛加熱之新鮮牛乳之特殊氣味，且隨著加熱程度增加而增強；若於 90°C 以上之較高溫度處理時產生滅菌臭 (Sterilized flavour)，滅菌臭之形成與褐色化反應具相當密切之關係，易發生於滅菌乳或滅菌乳製品中，此風味之強度於貯存期間並不會減弱，相反地，會隨貯存時間而增強，並使牛乳色澤變深 (Burton, 1988)。

(二) 色澤 (Color)

牛乳色澤與加熱程度有相當之關聯性，於 60~80°C 間熱處理，牛乳色澤會隨著溫度升高加深白色度，此為一可逆反應，此可能因乳中鈣離子於受熱時形成分子形式鹽類吸附於酪蛋白微球表面，致使酪蛋白微球體積增大，光之折射率增加，而增加牛乳白色程度；或由於牛乳於受熱時，乳清蛋白熱變性產生凝集懸浮，並有部分變性乳清蛋白附著於酪蛋白微球上，使牛乳光之折射率增加，色澤變白，此為不可逆反應 (Burton, 1988)。牛乳於較嚴苛的熱處理條件

下，如間接加熱方式超高溫瞬間滅菌法或瓶裝滅菌法，或貯存期間之時間延長或溫度提高，會造成乳中蛋白質的胺基及糖類的羰基鍵結，發生梅納反應之褐色化物質，使牛乳褐色加深 (Sensidoni *et al.*, 1999)。

(三) 有效離胺酸 (Available lysine)

有效離胺酸為促進嬰孩生長的重要因子，一般而言，牛乳蛋白質中有效離胺酸含量近似母乳，由於牛乳於加工過程中高溫處理，或於高溫或長時間貯存，糖類之醛基易與蛋白質之胺基發生鍵結，產生褐化反應，此即梅納反應，尤以 ϵ -胺基酸最易起反應，如離胺酸等，致造成有效離胺酸的流失，且隨著貯存時間及溫度提昇，有效離胺酸流失量隨之增加，且梅納反應產生之共價複合物使蛋白質較不易受蛋白酶水解，而降低牛乳營養價值 (Ames, 1998; Naranjo *et al.*, 1998; Adriana *et al.*, 2003)。梅納反應之形成，會影響乳品質與乳製品的色澤、風味及營養價值等，初期梅納反應，僅造成部分有效離胺酸流失，並不影響牛乳色澤及風味，如直接加熱方式超高溫瞬間滅菌 (145°C 數秒鐘)，然於嚴苛之熱處理，如瓶裝滅菌、間接加熱方式超高溫瞬間滅菌或長時間或高溫貯存，均會造成牛乳之進階或後期梅納反應，致使乳製品色澤加深與風味之改變 (Erbersdobler and Dehn-Muller, 1989; van Boekel, 1998)。

四、熱處理對消化率之影響

蛋白質體外消化試驗 (*In vitro* digestibility)，可以提供營養價值之參考依據，一般而言， β -乳球蛋白、溶菌酶及卵白蛋白 (Ovalbumin) 等球蛋白具抗消化性 (Church *et al.*, 1981; Porter *et al.*, 1984)，而牛乳之酪蛋白則較易受蛋白酶水解 (Swaisgood and Catignani, 1991)，雙硫鍵之裂解可以鬆開蛋白質之三級結構，增加其彈性，而使蛋白質較易受水解，如經 Mercaptoethanol 裂解之 β -乳球蛋白雙硫鍵，則較易受胃蛋白酶或胰蛋白酶等之水解 (Singh and Fox, 1987; Reddy *et al.*, 1988)。

牛乳經殺菌或滅菌等熱處理，導致其蛋白質結構與特性上之改變，而改變乳產品之機能性及營養價值，當加熱溫度升高時，乳清蛋白與 κ -酪蛋白會產生雙硫鍵鍵結之複合物 (Singh and Creamer, 1993)。

Maria *et al.* (1997) 以生乳、高溫短時間殺菌乳 (72°C, 15 秒)、煮沸殺菌乳 (常壓下煮沸 30 秒) 及超高溫瞬間滅菌 (130-150°C 維持數秒) 四個處理組之牛乳，經冷凍乾燥製成乳粉，作為 28 日齡離乳大鼠之飼糧，測其蛋白質利用效率 (Protein efficiency ratio, PER)，結果生乳、高溫短時間殺菌乳及煮沸殺菌乳間之 PER 沒有

差異，皆較超高溫瞬間殺菌乳之 PER 為高，顯示較嚴苛熱處理之牛乳，其蛋白質利用效率較低。

乳清蛋白之消化率，與加熱時乳清蛋白變性產生凝集之程度及乳清蛋白雙硫鍵受熱裂解相關，Carbonaro *et al.* (1998) 將生乳以高溫短時間殺菌、超高溫瞬間滅菌及瓶裝滅菌處理，再以 HCl 溶液調整 pH 值至酪蛋白等電點，離心取得乳清並分成二組，進行體外模擬人體腸道消化蛋白質試驗，一組直接加入蛋白酶水解，結果是乳清蛋白之消化率以生乳者 68.24% 最高，其次為高溫短時間殺菌乳者 65.47%，而以超高溫瞬間滅菌乳者及瓶裝滅菌乳者最低，分別為 61.69 及 60.49%，此乃因生乳之乳清蛋白未因受熱變性凝集，因而其乳清蛋白消化率較其他熱處理組高；另一組將乳清經 0.45 μm 彈夾式過濾管過濾取其濾液，再加入蛋白酶進行水解，乳清蛋白濾液之消化率以高溫短時間殺菌乳者最高為 74.67%，其次為生乳者 73.87%，再其次為超高溫瞬間滅菌乳者 66.77%，瓶裝滅菌乳者之消化率 63.80% 為最低，係因過濾之乳清蛋白，已除去因熱變性凝集之分子，此時乳清蛋白消化率係由於乳清蛋白雙硫鍵因加熱切斷，消化率因而稍高；且各熱處理組乳清蛋白經 0.45 μm 彈夾式過濾管過濾較未過濾乳清蛋白有較高之消化率，此顯示乳清蛋白受熱凝集對消化率之影響大於乳清蛋白內之雙硫鍵受熱裂解之程度。

De Wit and Klarenbeek (1984) 指出，隨著加熱溫度提高至 75-80°C 以上，或延長加熱時間，使蛋白質分子間產生共價鍵結，增加及擴大乳清蛋白凝集，顆粒加大，使蛋白質之消化率降低。

Alkanhal *et al.* (2001) 採用 24 隻 Sprague-Dawley 六週齡公鼠，逢機分配為四組，分別餵予四種不同蛋白質來源之飼糧，各為酪蛋白、低溫殺菌鮮乳、超高溫瞬間滅菌鮮乳及超高溫瞬間滅菌合成乳，並測定其表相消化率 (Apparent digestibility, AD)、真消化率 (True digestibility, TD)、生物價 (Biological value, BV) 及蛋白質淨利用值 (Net protein utilization, NPU) 等蛋白質營養品質參數，結果顯示，超高溫瞬間滅菌合成乳，其生物價及蛋白質淨利用值顯著較低，且隨著延長貯存時間或升高貯存溫度，而降低其蛋白質營養品質。

五、牛乳之加熱程度評估

殺菌係殺滅乳中所有病原菌，降低產品菌數及酵素活性，以達衛生安全 (Wilbey, 1996)，由於非產孢病原菌中以肺結核菌耐熱性最高，而鹼性磷酶之耐熱性高於肺結核菌，因此，乳品工業常以鹼性磷酶活性作為殺菌指標，當鹼性磷酶呈陽性反應時，表示殺菌不完全 (Mustapha *et al.*, 2001)。另外，乳過氧化氫酶於 80°C，2.5

秒種加熱則失去活性，藉此以判定牛乳之殺菌溫度是否高於 80°C (林, 1993)。Mansel (1986) 指出，若乳過氧化氫酶呈陰性反應，表示此牛乳經過高於 76°C，15 秒鐘或 80°C，2.5 秒鐘以上之加熱處理。

乳清蛋白氮的相對值 (Relative soluble whey protein nitrogen, RSWPN) 乃係乳中未變性乳清蛋白態氮佔牛乳總氮含量之百分率，由於乳清蛋白經 70°C 以上加熱，即產生不同程度之變性，因此，RSWPN 可作為殺菌乳的加熱程度評估，義大利殺菌乳依此區分等級，根據 RSWPN 的數值定義三種殺菌乳：高品質鮮乳殺菌條件為 75°C 維持 15 秒鐘，RSWPN 值為 15.5% 以上；殺菌鮮乳殺菌條件為 80°C ~ 85°C 維持 15 秒鐘，RSWPN 值為 11.0 ~ 14.0%；一般殺菌乳殺菌條件為高於 90°C 維持 15 秒鐘者，RSWPN 值為 11.0% 以下；以 RSWPN 作為分辨鮮乳之殺菌條件與等級區分。而 RSWPN 指數閾值下限為 72°C，15 秒鐘 (Pellegrino *et al.*, 1995)。

Pellegrino *et al.* (1995) 利用兩種方式，藉以評估殺菌程度，第一種方式主要探討乳清蛋白、酵素及維生素等之熱變性、降解及交互作用等；第二種方式探討乳酮糖、羥甲呋喃甲醛 (Hydroxy methyl furfural, HMF) 及呋喃甲基離胺酸 (Furosine) 等熱反應物質的生成量，此三者生乳含量極微，加熱程度愈高，生成量隨之

增加。低溫殺菌處理之牛乳，其乳過氧化氫酶活性呈陽性反應，乳中未變性 β -乳球蛋白含量為 1710 mg/L (Morales *et al.*, 2000) 至 2600 mg/L (Villamiel *et al.*, 1999)，HMF 含量為 2.49 mg/L (Morales *et al.*, 2000)，且無乳酮糖存在；而高溫殺菌處理之牛乳，其乳過氧化氫酶活性呈陰性反應，乳中含大量乳酮糖及 Furosine，且未變性乳清蛋白質之含量極少 (Villamiel *et al.*, 1999)，直接與間接加熱方式超高溫瞬間滅菌之牛乳，乳中未變性 β -乳球蛋白含量分別為 389 及 322 mg/L、乳酮糖含量為 12.0 及 250 mg/L 和 HMF 含量為 5.6 及 8.7 mg/L，而高溫高壓滅菌乳中乳酮糖含量為 1120 mg/L，HMF 含量為 22 μ mol/L，且無未變性乳清蛋白質之存在 (Morales *et al.*, 2000)。因此未變性 β -乳球蛋白含量可作為評估溫和殺菌乳之指標，而乳酮糖及 HMF 可作為評估高溫殺菌乳之指標。

肆、材料與方法

一、材料

(一) 生乳 (取自東海大學實習農牧場)

市售鮮乳與保久乳 (購自各大超市及有機飲食店)

(二) 儀器及器材

1. 乳組成暨體細胞測定儀 (MilkoScanTM 4000; Fossomatic 5000, Foss Electric, Denmark)
2. 色差計 (Color and color different meter, Model TC-1500SX, Tokyo Denshoku, Japan)。
3. 桌上型酸鹼度計 (pH meter Cyber Scan PH510, Germany)。
4. 高速泛用冷凍型離心機 (Z323K, Hermil Labortechnik, Germany)。
5. 分光光度計 (Spectrophotometer UV-1601, Jasco, USA)。
6. 恆溫振盪水浴槽 (Shaking bath Model B602D, Firstek Scientific, Taiwan)。
7. 電泳設備 (Mini-Protein 3 cell, Bio-Rad Laboratories, USA)
8. 恆溫培養箱 (DBL-120 登盈儀器公司, Taiwan)
9. 高壓滅菌釜 (High-pressured steam sterilizer, Tomin Inc., Taiwan)

二、試驗方法

依沈 (2004) 反應曲面法，加以整理應用。不同殺菌條件之鮮乳，模擬人體腸胃消化試驗，以蛋白酶水解後所釋放之胜肽量，依統計學之「反應曲面法」(Response surface methodology, RSM) 分析，再依據 RSM 之中心複合設計 (Central composite design, CCD) 求出牛乳最適殺菌條件，並以求出之殺菌條件製作鮮乳，分析其理化化學性質。實驗分為以下四部分：

(一) 反應曲面法二因子中心複合設計之第一因子中心點 X_1 (殺菌溫度)。

自乳品加工廠取得生乳，隨機分為九組，以不同溫度相同維持時間作批式殺菌處理，分別為 72°C 維持 20 秒、75°C 維持 20 秒、78°C 維持 20 秒、81°C 維持 20 秒、84°C 維持 20 秒、87°C 維持 20 秒、90°C 維持 20 秒及 93°C 維持 20 秒，並以 63°C 維持 30 分作為對照組，殺菌後之鮮乳接著進行模擬人體消化試驗，以蛋白酶水解釋出之胜肽量，依統計分析之一般線性模式，進行不同處理間之差異性分析，找出胜肽生成量最高處理組之溫度，作為反應曲面法二因子中心複合設計之第一中心點 X_1 。

(二) 反應曲面法二因子中心複合設計之第二因子中心點 X_2 (殺菌時間)。

第一因子中心點確立後，固定其殺菌溫度，變化殺菌時間，分別以維持 10、15、20、25 及 30 秒作批式殺菌處理，殺菌後之鮮乳接著進行模擬人體消化試驗，以蛋白酶水解後之第 0、2、4、6 及 8 小時，分析各乳樣之胜肽生成量，並依統計學之一般線性模式，進行不同處理間之差異性分析，找出胜肽生成量最高熱處理組之維持時間，作為反應曲面法二因子中心複合設計之第二因子中心點 X_2 。

(三) 反應曲面法二因子 (溫度與維持時間) 中心旋轉複合設計。

試驗 I 及 II 結果確立後，牛乳最適殺菌條件即胜肽生成量最高，落在 (X_1, X_2) 附近，利用中心旋轉複合設計求更精確反應值，其試驗點如圖 1，由 CCD 圖所示，有 4 個試驗點 $(1, 1)$ 、 $(1, -1)$ 、 $(-1, 1)$ 及 $(-1, -1)$ 等，4 個軸上點 $(1.414, 0)$ 、 $(0, 1.414)$ 、 $(-1.414, 0)$ 及 $(0, -1.414)$ 等及 5 重複之中心點 $(0, 0)$ ，完整試驗設計如表 1 所示，生乳經此 13 組加熱處理後，接著進行模擬人體消化試驗，以蛋白酶水解後第 4 及 6 小時之胜肽生成量，利用 SAS 統計軟體系統分析，得等高線圖及三維空間之反應曲面圖，並由完成之反應曲面圖得知最適殺菌條件。

(四) 分析最適殺菌條件處理鮮乳之理化學性質。

最適殺菌條件確立後，以此條件處理生乳，分析鮮乳之鹼性磷酸酶、過氧化氫酶、組成分、pH 值、酸度、色澤、有效離胺酸、未變性乳清蛋白、蛋白酶水解之胜肽生成量及感官評估等，並與市乳作比較。

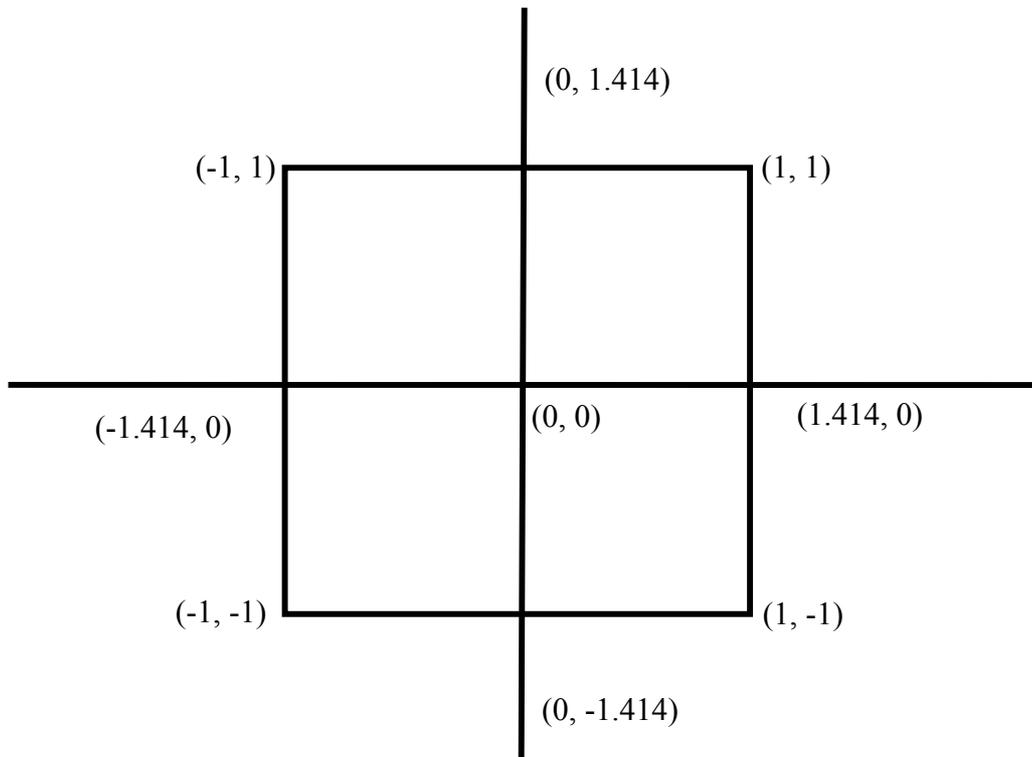


圖 1. 反應曲面法之二因子中心旋轉複合設計圖。

Fig. 1. The central composite rotatable design in two variables of response surface methodology.

(沈，2004)

表 1. 反應曲面法之二因子中心旋轉複合設計

Table 1. The natural and coded variables of central composite rotatable design in two variables of response surface methodology

Natural variable		Coded variable	
X_1	X_2	x_1	x_2
76 °C	15 sec	-1	-1
76 °C	25 sec	-1	1
86 °C	15 sec	1	-1
86 °C	25 sec	1	1
81 °C	20 sec	0	0
81 °C	20 sec	0	0
81 °C	20 sec	0	0
81 °C	20 sec	0	0
81 °C	20 sec	0	0
88.07 °C	20 sec	1.414	0
73.93 °C	20 sec	-1.414	0
81 °C	27.07 sec	0	1.414
81 °C	12.93 sec	0	-1.414

三、分析項目

(一) 蛋白質水解與胜肽生成量 (Protein hydrolysis and peptide content)

1. 模擬人體腸胃道之消化

依 Adriana *et al.* (2003) 之方法。取 3 mL 乳樣於試管中，以 1N HCl (聯工化學廠股份有限公司) 調整至 pH 2.0-3.0，加入 75 μ L 1% 胃蛋白酶 (Pepsin, Sigma chemical, USA)，以 37°C 120 \times g 振盪水浴水解 3 小時；取出反應中之試管，以 1N NaOH (聯工化學廠股份有限公司) 調整至 pH 8.0-9.0，停止胃蛋白酶之作用，隨後加入 75 μ L 1% 胰酶 (Pancreatin, Sigma chemical, USA)，以 37°C 120 \times g 振盪水浴水解 5 小時；水解期間，於第 0、2、4、6 及 8 小時採樣，加入 1 mL 30% 三氯醋酸溶液 (Trichloroacetic acid, TCA, Merck Laboratories, Germany)，於室溫下靜置 60 分鐘，隨後以 12000 \times g 離心 10 分鐘，取上清液，分析蛋白水解後之胜肽及胺基酸生成量。

2. 胜肽與胺基酸總生成量

依 Moore and Stein (1948) 及 Pearce *et al.* (1988) 之方法加以綜合整理。

(1) 寧海都寧試劑 (Nihydrin reagent) 製備

A. 寧海都寧溶液 (Nihydrin solution)

稱取 3 g Nihydrin (Merck Laboratories, Germany) 溶於 Methyl cellosolve (Merck Laboratories, Germany), 定量至 100 mL

(Nihydrin 容易氧化, 避免曝氣作用, 且必須每日更新)。

B. 醋酸氰化鈉溶液 (Acetate cyanide solution)

a. 0.01 M 氰化鈉溶液 (Sodium cyanide solution)

稱取 490 mg 氰化鈉 (Sodium cyanide, Sigma chemical, USA)

以去離子水定容成 1 L。

b. pH 5.4 醋酸緩衝溶液 (Acetate buffer solution)

稱取 180 g 醋酸鈉 (Sodium acetate • 3H₂O) 及 33.3 mL 冰醋酸, 以去離子水定量成 500 mL, 並調整至 pH 5.4。

取 2 mL 步驟 a 之 0.01 M 氰化鈉溶液及 100 mL 步驟 b 之 pH 5.4 醋酸緩衝溶液混合均勻後即為醋酸氰化鈉溶液, 必須每日更新。

(2) 胜肽及胺基酸生成量測定

取 1 mL 蛋白水解後之上清液, 加入 0.5 mL 醋酸氰化鈉溶液及 0.5 mL 寧海都寧溶液混合均勻, 以沸水浴 15 分鐘, 於冷卻前加入 5 mL 50% 異丙醇溶液 (Isopropyl alcohol, 聯工化學廠股份有限公司), 於波長 570 nm 測定其吸光值, 並以圖 2 白胺酸標準曲線估算胜肽及胺基酸生成量。

3. 胺基酸生成量

依 Angela and Malcata (1997) 之方法。取 1 mL 蛋白水解後之上清液，加入 0.7 mL 3.95 M 硫酸溶液 (Sulfuric acid, Merck Laboratories, Germany) 及 0.3 mL 33.3% (w/w) 磷鎢酸溶液 (Phosphotungstic acid, PTA, Sigma chemical, USA)，於室溫下靜置 60 分鐘，以 $14000 \times g$ 離心 10 分鐘，取 1 mL 上清液，隨後同上述 2 之方法，測得水解後胺基酸生成量。

4. 胜肽生成量

以步驟 2 (2) 之胜肽與胺基酸總量 - 步驟 3 之胺基酸量 = 胜肽生成量。

5. 標準曲線製作

精稱白胺酸 (Leucine, Sigma chemical, USA) 0.0033 g，以 1% SDS 溶液定容成 10 mL，此標準液濃度為 $2.286 \mu\text{mole/mL}$ ，分別取 0 - 375 μL 標準液，並加入蒸餾水，使總溶液量均為 1 mL (表 2)，將不同濃度白胺酸溶液分別加入 0.5 mL 醋酸氰化鈉溶液及 0.5 mL 寧海都寧溶液混合均勻，以沸水浴 15 分鐘，於冷卻前加入 5 mL 50% 異丙醇溶液，於波長 570 nm 測其吸光值，並作標準曲線 (圖 2)，以供依據 OD 值估算含量。標準曲線公式： $y = 2.4461 x$ ， R^2 值達

表 2. 胺基酸標準液之製備

Table 2. The preparation of amino acid standard solution

No.	Leucine (μL)	DW (μL)	Content (μmole)
1	0	1000	0
2	25	975	0.057
3	50	950	0.114
4	75	925	0.172
5	100	900	0.229
6	150	850	0.343
7	200	800	0.457
8	250	750	0.572
9	375	625	0.858

Stock solution of leucine concentration: $2.286 \mu\text{mole/mL} = 0.002286 \mu\text{mole}/\mu\text{L}$.

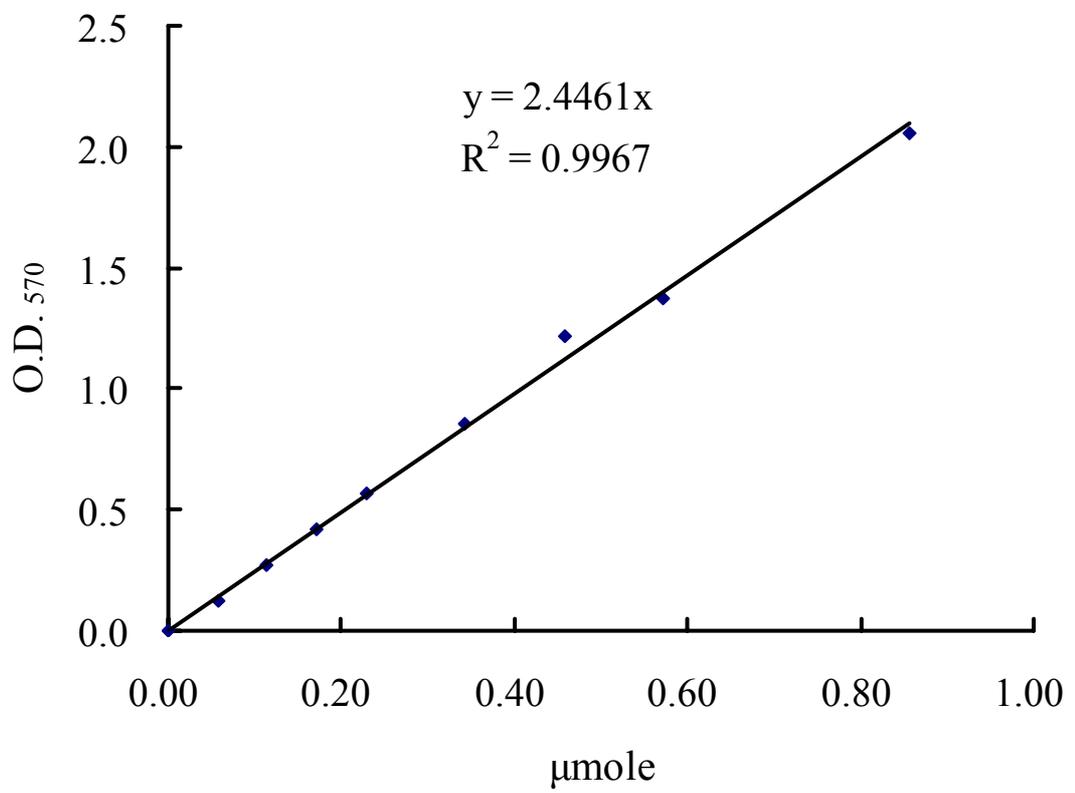


圖 2. 胺基酸標準曲線圖。

Fig. 2. Standard curve of amino acid.

0.9967；以樣品所測得之吸光值帶入 y 值，即求得 x 值為其胜肽及胺基酸生成量。

(二) 鹼性磷酶活性 (Alkaline phosphatase activity)

依中國國家標準 (1970) 之方法。

1. 試劑製備：

(1) 硼酸鹽緩衝溶液

取 28.427 g 硼砂 (Sodium tetraborate · 10H₂O, Merck Laboratories, Germany) 溶於蒸餾水中，加入 81.75 mL 1 N NaOH 溶液，再以蒸餾水定量成 1000 mL。

(2) Gibb's 試藥 (BQC)

取 40 mg 2,6-Dibromoquinonechlorimide (BQC, Sigma chemical, USA) 以甲醇或 95%乙醇定容成 10 mL，置於著色瓶密封冷藏。

(3) 基質緩衝液

取結晶 0.5 g Disodium phenylphosphat (Na₂C₆H₄PO₄) 置入試管中，加入 5 mL 蒸餾水使之溶解，次加 0.5 mL 硼酸鹽緩衝溶液充分混勻，加 0.04 mL BQC 溶液振盪混勻放置 5 分鐘。若溶液呈藍色，則加 2 ml 中性正丁醇 (n-Butyl alcohol, 聯工化學廠股份有限公司) 將其靛酚 (Indophenol) 之藍色抽出，並將之靜置至丁醇部分完全分離後，將上層液之丁醇除去，加 100 mL 硼酸鹽緩衝液至下層液

中，再加蒸餾水定量至 1 L。

2. 鹼性磷酶活性測定

取 5 mL 基質緩衝液於試管中，加入 0.5 mL 乳樣，振盪混合均勻，於 37-45°C 水浴 10 分鐘，次加入 BQC 液 6 滴，充分振盪混合均勻後放置 5 分鐘。此時若呈現藍色則表示試乳殺菌不當。

(三) 過氧化氫酶活性 (Lactoperoxidase activity)

依 Mustapha *et al.* (2001) 之方法。

1. 0.1 M pH 4.4 醋酸緩衝溶液 (Acetate buffer solution) 製備：

(1) 0.01 M 醋酸溶液 (Acetate acid solution)：

取 56.76 μ L 冰醋酸 (聯工化學廠股份有限公司) 加水定量至 100 mL。

(2) 0.01 M 醋酸鈉溶液 (Sodium acetate solution)：

稱取 0.136 g 醋酸鈉 (Sodium acetate \cdot 3H₂O, Merck Laboratories, Germany) 以蒸餾水定容成 100 mL。

取 59 mL 步驟 (1) 溶液及 41 mL 步驟 (2) 溶液混合均勻即為 0.01 M pH 4.4 醋酸緩衝溶液。

2. 過氧化氫酶活性測定

取 125 μ L 乳樣加入 5 mL 0.01 M pH 4.4 醋酸緩衝溶液中振盪

混勻，靜置 15 分鐘，以 0.45 μm 濾器過濾，取 1025 μL 濾液於試管中，加入 425 μL 1 mM 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 溶液(ABTS, Sigma chemical, USA)及 50 μL 0.3 M 雙氧水溶液 (Hydrogen peroxide, Merck Laboratories, Germany) 振盪混勻，於 37°C 下反應 60 分鐘。此時若反應液呈現綠色表示此乳樣之乳過氧化氫酶活性為陽性反應。

(四) 乳成分 (Milk composition)

依 Rodriguez-Otero *et al.* (1997) 之方法，利用乳成分暨體細胞測定儀，分析乳中脂質、蛋白質、乳糖、乳無脂固形物及總固形物之含量，每一乳樣取 10 mL 水浴至 37°C 並以玻棒攪拌混勻進行分析，每次分析前，先以蒸餾水沖洗樣品抽取器，再以拭鏡紙將其拭淨。

(五) 滴定酸度 (Titratable acidity)

依中國國家標準 (1995) 之方法，取 17.6 mL 乳樣加入等量蒸餾水，再加入 1 mL 0.5% 之酚酞 (Phenolphthalein, 片山試藥株式會社，日本) 指示劑，隨後以 0.1 N 之氫氧化鈉溶液滴定，滴定至液呈微紅色在 30 秒鐘內不消失，記錄 0.1 N 氫氧化鈉之消耗量。

滴定酸度 % 表示計算公式如下：

$$\text{滴定酸度} \begin{matrix} (\%) \\ = \frac{0.1 \times 90 \times \text{NaOH 消耗量(mL)} \times \frac{1}{1000} \times f}{17.6 \times 1.032} \times 100\% \end{matrix}$$

f = 0.1 N NaOH 之力價

(六) pH 值 (pH value)

依 Atherton and Newlander (1977) 之方法，利用 pH-meter 測定，以 pH 4.0 及 pH 7.0 標準液校正，將乳樣回溫至 7°C 並以玻棒攪拌混勻，每次測定前，先以蒸餾水沖洗，再以拭鏡紙將感應電極部位拭乾。

(七) 有效離胺酸量 (Available lysine content)

依 Adriana *et al.* (2003) 之方法。

1. 對苯二甲醛試劑 (o-Phthaldialdehyde reagent, OPA reagent) 製備

(1) 取 80 mg 對苯二甲醛 (OPA, Sigma chemical, USA) 溶於 2.0 mL

乙醇 (聯工化學廠股份有限公司)。

(2) 0.1 M pH 9.7-10.0 硼酸鈉緩衝溶液 (Sodium tetraborate buffer):

取 38.14 g 硼砂 (Sodium tetraborate · 10H₂O) 以蒸餾水定容成 1000 mL，並調至 pH 9.7-10.0。

(3) 20% 月桂基硫酸鈉溶液 (Sodium dodecyl sulfate solution, SDS solution)

稱取 20 g 月桂基硫酸鈉 (Sodium dodecyl sulfate, SDS, Sigma chemical, USA) 以蒸餾水定容成 100 mL。

取 50 mL 步驟 (2) 溶液、5.0 mL 步驟 (3) 溶液及 200 μ L β -巯基乙醇 (β -Mercaptoethanol, Sigma chemical, USA) 加入步驟 (1) 溶液中，並以去離子水定量成 100 mL 混勻，即為 OPA 試劑，必須每日更新。

2. 有效離胺酸測定

取 200 μ L 乳樣、800 μ L 去離子水及 1 mL 10% SDS 溶液混合均勻，於 4°C 下反應 12 小時，取出後回復至室溫，取 50 μ L 該反應液加入 1.5 mL OPA 試劑混合均勻，於室溫下反應 2 分鐘，隨後於波長 340 nm 測定其吸光值，並依標準曲線求出有效離胺酸含量。

3. 標準曲線製作

精稱白胺酸 (Leucine, Sigma chemical, USA) 0.0066 g，以 1% SDS 溶液定容成 10 mL，此標準液濃度為 5 μ mole/mL，分別取 0 - 40 μ L 白胺酸標準液，並加入蒸餾水，使總溶液量均為 50 μ L (表 3)，將各個濃度白胺酸標準液分別加入 1.5 mL OPA 試劑中，於室溫下反應 2 分鐘，於波長 340 nm 測其吸光值，作出標準曲線 (圖 3)，以供依據 OD 值估算有效離胺酸含量，標準曲線公式：

表 3. 有效離胺酸標準液之製備

Table 3. The preparation of available lysine standard solution

No.	Leucine (μL)	DW (μL)	Content (μmole)
1	0	50	0
2	10	40	0.050
3	15	35	0.075
4	20	30	0.100
5	25	25	0.125
6	30	20	0.150
7	35	15	0.175
8	40	10	0.200

Stock solution of leucine concentration: $5.0 \mu\text{mole/mL} = 0.005 \mu\text{mole}/\mu\text{L}$.

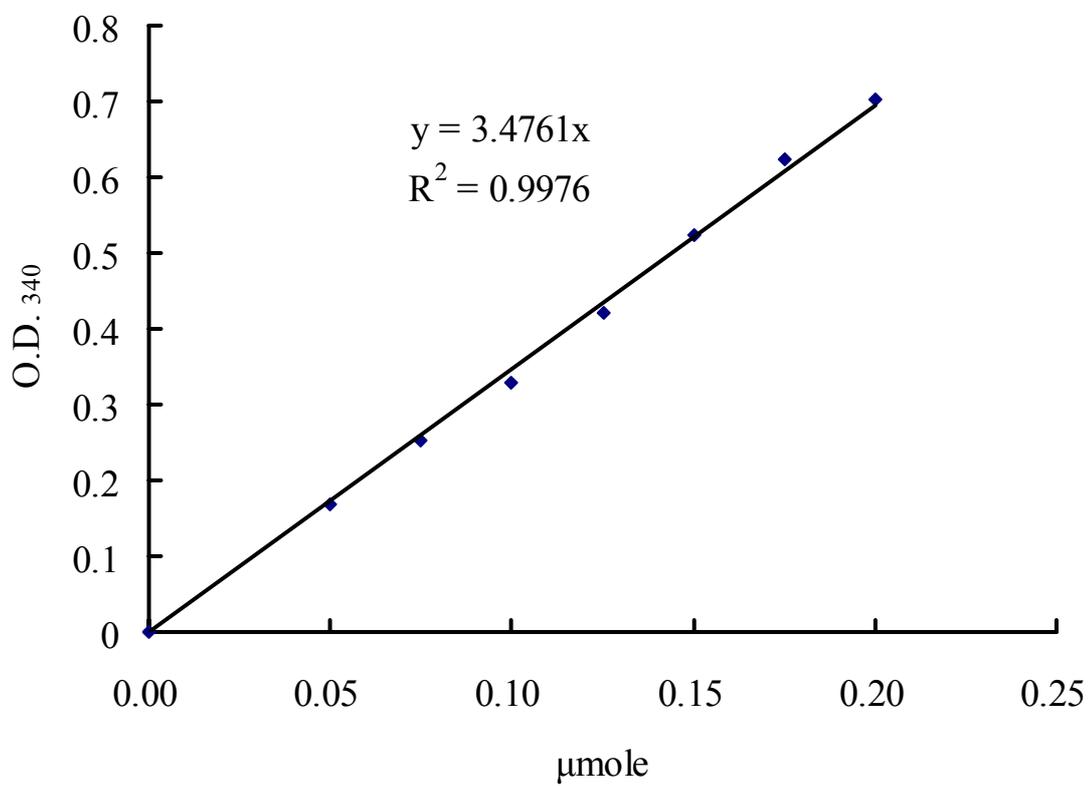


圖 3. 有效離胺酸標準曲線圖。

Fig. 3. Standard curve of available lysine.

$y = 3.4761x$ ， R^2 值達 0.9976。

(八) 色澤 (Color difference test)

依 Morgan and Gaborit (2001) 之方法。色差計先用標準板 (Standard plate, $X=94.05$, $Y=92.04$, $Z=110.35$) 校正，取 3 mL 攪拌混勻之乳樣，置於石英皿中，利用色差計分析色澤，分別測定乳樣之亮度值 (L^*) 及黃色值 (b^*)，以區分各乳樣之色澤差。每次測定前，先以蒸餾水沖洗石英皿，再以拭鏡紙將其拭乾。

(九) 乳清蛋白變性程度分析 (Denature whey protein analysis)

1. 乳清液之取得

依 Estelle *et al.* (1988) 之方法，以 0.1 N HCl，將牛乳之 pH 值調至 4.6，靜置 50 分鐘，再以 $4500 \times g$ 離心 12 分鐘，取其上清液，得乳清。

2. 乳中未變性乳清蛋白含量

(1) 未變性乳清蛋白含量測定

依 Bradford (1976) 之方法。取 10 μ L 乳清液加入 1 mL 20% (v/v) Coomassie brilliant blue 試劑 (Bio-Rad commercial reagent) 混合均勻，於室溫下反應 5 分鐘，於波長 595 nm 測定其吸光值。配合標準曲線求得各處理組乳樣中未變性乳清蛋白含量，並以生乳之未變

性乳清蛋白含量為 100% ，求得各乳樣未變性乳清蛋白之百分率 (%)。

(2) 標準曲線製作

精稱 0.2 g 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA, Sigma chemical, USA) 以蒸餾水定容成 100 mL，此溶液 BSA 為 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，如表 4 分別取 0 - 12 μL BSA 標準液，並加入蒸餾水，使總溶液量均為 20 μL ，將不同濃度 BSA 溶液分別加入 1 mL Coomassie brilliant blue 試劑中，於室溫下反應 5 分鐘，於波長 595 nm 測其吸光值，並作標準曲線 (圖 4)，以供依據 OD 值估算未變性乳清蛋白含量，標準曲線公式： $y = 0.037x$ ， R^2 值達 0.9965。

3. 乳清蛋白 SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳分析

依 Laemmli (1970) 之方法加以修飾使用。

(1) 試藥製備

A. 1.5 M pH 8.8 Tris-Cl 溶液

稱取 18.15 g Trizma base (Merck Laboratories, Germany) 溶於蒸餾水中，以 1 N HCl 調整至 pH 8.8，定量成 100 mL，貯在於 4°C。

表 4. 蛋白質標準液之製備

Table 4. The preparation of protein standard solution

No.	BSA (μL)	DW (μL)	Content ($\mu\text{g}/20\mu\text{L}$)
1	0	20	0
2	2	18	4
3	4	16	8
4	6	14	12
5	8	12	16
6	10	10	20
7	12	8	24

Stock solution of BSA concentration: $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

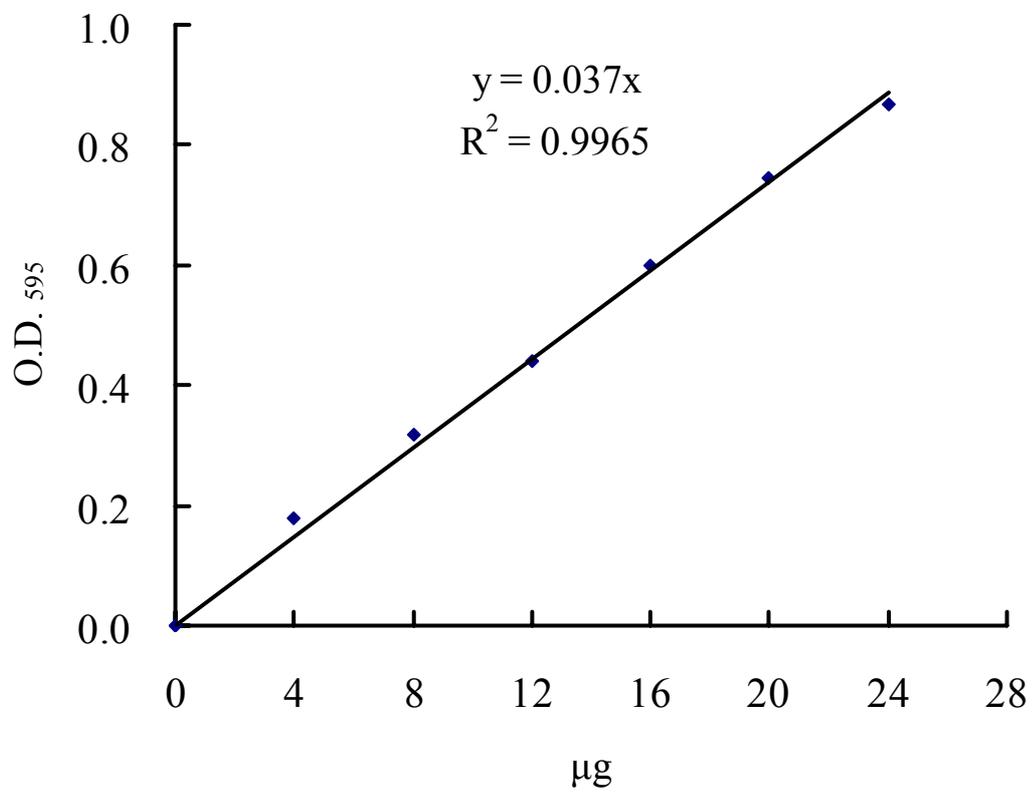


圖 4. 蛋白質標準曲線圖。

Fig. 4. Standard curve of protein.

B. 0.5 M pH 6.8 Tris-Cl 溶液

稱取 3.0 g Trizma base 溶於蒸餾水中，以 1 N HCl 調整至 pH 6.8，定量成 50 mL，貯存於 4°C。

C. SDS-PAGE Sample buffer

取 4.0 mL 去離子水再加入 1.0 mL 0.5 M Tris-Cl 溶液、0.8 mL 甘油 (Glycerol, Sigma chemical, USA)、1.6 mL 10% SDS 溶液、0.4 mL β -Mercaptoethanol 及 0.2 mL 0.5% 溴酚藍溶液 (Bromophenol blue, BPB, Bio-Rad Laboratories)，混合均勻後貯存於 4°C，並於二週內使用完。

D. pH 8.3 SDS-PAGE Electrode buffer

稱取 3.0 g Tris 及 14.4 g 甘胺酸 (Glycine, Merck Laboratories, Germany) 溶於蒸餾水中，加入 5 mL 20% SDS 溶液 (pH 7.2)，以冰醋酸調整至 pH 8.0，定量成 1 L。

E. 染液 (Stain solution)

稱取 5 g Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories) 溶於蒸餾水中，加入 450 mL 甲醇 (聯工化學廠股份有限公司) 及 100 mL 冰醋酸，以蒸餾水定量成 1 L，並以 Whatman No. 3 濾紙過濾，避光貯存於室溫下。

F. 褪染液 (Destain solution)

取 450 mL 甲醇、100 mL 冰醋酸及 450 mL 蒸餾水，混合均勻

貯存於室溫下。

(2) 電泳分析

A. 取 12 μ L 乳清液加入等量之 2X Sample buffer 混合均勻，以沸水浴 10 分鐘後，冷卻至室溫以進行注膠。

B. 此電泳設備為 Bio-Rad 第三代迷你電泳槽之直立平板式電泳裝置。利用 12.5% Separating gel 及 5% Stacking gel 之膠片（表 5）以分離乳清蛋白質不同大小之分子，每一樣品槽注入步驟（2）

A. 處理完之樣品，同時也以蛋白質分子標記（Protein marker, Sigma chemical, USA）比對分子量大小，每片以 35 安培的電流，跑至膠片底部，使蛋白質依分子量大小依序分離。

C. 取下膠片，以蛋白質染液（Stain solution）染色 30 分鐘，再以褪染液（Destain solution）褪染 2 小時，隨後將其置於 10% 醋酸溶液中直至膠片背景呈透明，掃描照相存檔。

(十) 牛乳蛋白 SDS-PAGE 電泳分析 (Milk protein SDS-PAGE electrophoresis)

所有乳樣均取 10 μ L 加入 1 mL 20% (v/v) Coomassie brilliant blue 試劑混合均勻，於室溫下反應 5 分鐘，以波長 595 nm 測定其吸光值，配合圖 4 之標準曲線求得牛乳蛋白含量，每一乳樣蛋白質

表 5. 蛋白質 SDS-PAGE 電泳膠片配方

Table 5. The prescriptions of separating gel and stacking gel

Ingredients	12.5% Separating gel	5% Stacking gel
Deionized water	13.13 mL	2.815 mL
1.5 M Tris-Cl	9.75 mL	--
0.5 M Tris-Cl	--	1.250 mL
10% SDS	0.39 mL	0.050 mL
37.5:1 Acrylamide-Bis	15.60 mL	0.835 mL
10% AP	0.13 mL	0.050 mL
TEMED	9.75 μ L	2.500 μ L

37.5:1 Acrylamide-Bis (Bio-Rad commercial reagent).

Ammonium persulfate, AP (Sigma chemical, USA).

Tetramethylenediamine, TEMED (Sigma chemical, USA).

含量均定量為 40 μg 進行 SDS-PAGE 電泳分析，方法同乳清蛋白 SDS-PAGE 電泳分析。

(十一) 感官品評 (Sensory evaluation)

依 Morgan and Gaborit (2001) 之方法，由六位經過品評訓練之研究生針對牛乳不同感官特性進行品評，所有乳樣維持於 4°C 進行，採七分制 (7-point scale) 評分，各項目之代表意義如下，色澤 (Color): 受測者利用肉眼依樣品外觀判定顏色深淺，由白色 1 分，至褐色 7 分；乳香 (Milky odor): 經由嗅覺判斷樣品乳香之濃厚程度，1 分為極淡，7 分為極濃；濃厚感 (Thickness): 經由舌頭與口腔的感覺判斷樣品之濃厚程度，1 分為極淡，7 分為極濃；牛乳風味 (Milky flavor): 樣品於口中所帶有的獨特香味及產品風味濃厚程度，由非常淡薄 1 分，至非常濃郁 7 分；總接受度 (Overall acceptability): 對產品的總喜好程度，由非常不喜歡 1 分，至非常喜歡 7 分，由此評估一般消費者對此乳品之接受度，並以市乳為對照組。

四、統計分析

採用 Statistical analysis system (SAS) 統計套裝軟體分析。試驗設計為完全隨機試驗 (Completely randomized design; CRD)。試驗 I、試驗 II 及試驗 IV 所得之實驗結果依一般線性模式 (GLM procedure) 進行不同處理間之差異性分析 (SAS, 1999)；另外以鄧式新多變域分析法 (Duncan's new multiple range test) 比較各處理組平均值之差異性。試驗 III 所得之實驗結果依反應曲面法 (Response surface methodology; RSM)，配合二階模式，二因子旋轉中心複合設計 (Central composite design; CCD) 利用 SAS 統計軟體系統，以 proc rsreg 程序分析，得等高線圖及三維空間之反應曲面圖。

伍、結果與討論

一、反應曲面法二因子中心複合設計之第一因子中心點 X_1 (殺菌溫度)

反應曲面法乃是研究數個變數或數個因子組合所產生之反應值 (Response) 在何種變數組合條件下可獲得最適效果 (Optimum solution) (沈, 2004)。經不同溫度相同時間殺菌之鮮乳，模擬人體腸道消化試驗，分別於蛋白酶水解之第 0、2、4、6 及 8 小時，分析胜肽量，結果如表 6 所示，於第 0 及 2 小時胜肽量，各組間均無顯著差異 ($P > 0.05$)；於水解第 4 及 6 小時，各組間之胜肽量均以 81°C ，20 秒鐘之胜肽生成量最高， 93°C ，20 秒鐘及 63°C ，30 分鐘之胜肽生成量最低，各組間達顯著差異 ($P < 0.05$)，且成二次曲線關係；於水解第 8 小時，以 81°C ，20 秒鐘之胜肽生成量最高，但與 84°C ，20 秒鐘及 78°C ，20 秒鐘並無顯著差異 ($P > 0.05$)；於水解第 8 小時，可能係由於蛋白酶水解時間長，蛋白質水解程度過高，無法區分各組胜肽生成量 (Yvon *et al.*, 1992)；因而依據水解後第 4 及 6 小時之胜肽生成量之二次曲線上最高點，而確定殺菌第一因子 (溫度) 之中心點落在 81°C 。

表 6. 不同溫度維持20秒殺菌之鮮乳經蛋白酶水解之胜肽量

Table 6. The peptide content of milk pasteurized at different temperatures for 20 seconds after enzyme hydrolysis^x

Treatment	0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr
	mmole/mL				
63°C, 30 min	0.025	0.393	3.538 ^g	5.505 ^g	10.920 ^d
72°C, 20 sec	0.023	0.390	3.693 ^f	5.960 ^f	10.965 ^{cd}
75°C, 20 sec	0.022	0.399	4.143 ^d	6.430 ^d	10.995 ^{bc}
78°C, 20 sec	0.021	0.393	4.353 ^b	6.733 ^b	11.028 ^{ab}
81°C, 20 sec	0.024	0.395	4.553 ^a	6.845 ^a	11.058 ^a
84°C, 20 sec	0.025	0.385	4.375 ^b	6.748 ^b	11.003 ^{abc}
87°C, 20 sec	0.022	0.380	4.235 ^c	6.563 ^c	10.958 ^{cd}
90°C, 20 sec	0.023	0.388	3.938 ^e	6.095 ^e	10.918 ^d
93°C, 20 sec	0.021	0.383	3.533 ^g	5.540 ^g	10.920 ^d

^x Enzyme hydrolysis: the first 3 hours by pepsin, then the last 5 hours by pancreatin.

^{a-g} Means in same columns followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

二、反應曲面法二因子中心複合設計之第二因子中心點 X_2 (殺菌時間)

由試驗 I 結果得第一因子中心為 81°C ，因此在本試驗，於乳品加工廠取得生乳，隨機分為五組，將殺菌溫度固定為 81°C ，並變化殺菌時間，分別以維持 10、15、20、25 及 30 秒鐘進行殺菌，殺菌後之鮮乳接著進行模擬人體消化試驗，以蛋白酶水解之第 0、2、4、6 及 8 小時，分析各乳樣之胜肽生成量，結果如表 7 所示，於第 0 及 2 小時，各組間胜肽量並無顯著差異 ($P > 0.05$)；於第 4 及 6 小時，各組之胜肽生成量均以 81°C ，20 秒鐘之胜肽生成量最高， 81°C ，10 秒鐘之胜肽生成量最低，各組間達顯著差異 ($P < 0.05$)，且成二次曲線關係；於第 8 小時，以 81°C ，10 秒鐘之胜肽生成量顯著 ($P < 0.05$) 較其他處理組低，但其餘四個處理組間並無顯著差異 ($P > 0.05$)，此乃由於蛋白酶水解時間長，各組蛋白水解程度均高，無法區分各組間胜肽生成量之高低 (Yvon *et al.*, 1992)；故依據水解後第 4 及 6 小時之胜肽生成量之二次曲線關係上最高點為 81°C ，20 秒鐘，而確定殺菌第二因子 (維持時間) 之中心點落在 20 秒鐘。

表 7. 於81°C 不同時間殺菌之鮮乳經蛋白酶水解之胜肽量

Table 7. The peptide content of milk pasteurized at 81°C with different holding time after enzyme hydrolysis^x

Treatment	0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr
	mmole/mL				
81°C, 10 sec	0.023	0.388	3.683 ^e	5.867 ^e	10.813 ^b
81°C, 15 sec	0.025	0.392	4.260 ^c	6.477 ^c	11.663 ^a
81°C, 20 sec	0.022	0.393	4.547 ^a	6.850 ^a	11.820 ^a
81°C, 25 sec	0.022	0.393	4.413 ^b	6.593 ^b	11.783 ^a
81°C, 30 sec	0.021	0.389	4.013 ^d	6.030 ^d	11.597 ^a

^x Enzyme hydrolysis: the first 3 hours by pepsin, then the last 5 hours by pancreatin.

^{a-e} Means in same columns followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

三、反應曲面法二因子（溫度與維持時間）中心旋轉複合設計

由試驗 I 及 II 結果得知，鮮乳經蛋白水解後第 4 及 6 小時，各組間胜肽生成量成二次曲線關係，為配合更高階模式，應用二因子旋轉中心複合設計，以獲得較精確的試驗結果。由試驗 I 及 II 得知牛乳最適殺菌條件，即胜肽生成量最高點應落在第一因子 81°C，及第二因子 20 秒鐘附近；圖 1 所示，二因子中心旋轉複合設計之中心點 (0, 0) 為 81°C，20 秒，配合一階模式，找出 4 個試驗點為 (1, 1)、(1, -1)、(-1, 1) 及 (-1, -1)，其二因子之每一簡化變數 (Coded variables) 為 5°C 及 5 秒，得四個試驗點之原變數 (Natural variable) 分別為 86°C 維持 25 秒、86°C 維持 15 秒、76°C 維持 25 秒及 76°C 維持 15 秒，然而，為了配合更高階模式，將軸上 4 個試驗點 (1.414, 0)、(0, 1.414)、(-1.414, 0) 及 (0, -1.414) 併入模式中，得原變數分別為 88.07°C 維持 20 秒、81°C 維持 27.07 秒、73.93°C 維持 20 秒及 81°C 維持 12.93 秒，且為了能估算試驗誤差，而做 5 重複之中心點，經此 13 組加熱處理之鮮乳，經蛋白酶水解 4 及 6 小時之胜肽生成量，以 SAS 統計軟體系統分析，第 4 小時胜肽生成量之二因子中心旋轉複合設計試驗結果如表 8 所示，5 個中心點之胜肽生成量分別為 4.49、4.58、4.53、4.50 及 4.48 mmole/mL，四個試驗點之胜肽生成量分別為 3.49、4.15、4.28 及 4.23 mmole/mL，四個軸

表 8. 鮮乳經蛋白酶水解 4 小時胜肽量之二因子旋轉中心複合設計

Table 8. The natural and coded variables of central composite rotatable design in two variables of peptide content after enzyme hydrolysis for 4 hours^x

Natural variable		Coded variable		Peptide content
Temperature	Time	X ₁	X ₂	4 hr
°C	second			mmole/mL
76	15	-1	-1	3.94
76	25	-1	1	4.15
86	15	1	-1	4.28
86	25	1	1	4.23
81	20	0	0	4.49
81	20	0	0	4.58
81	20	0	0	4.53
81	20	0	0	4.50
81	20	0	0	4.48
88.07	20	1.414	0	4.14
73.93	20	-1.414	0	4.03
81	27.07	0	1.414	4.35
81	12.93	0	-1.414	4.06

^x Enzyme hydrolysis for 4 hours: the first 3 hours by pepsin, then the last 1 hour by pancreatin.

表 9. 鮮乳經蛋白酶水解 4 小時胜肽量二因子旋轉中心複合設計之變方分析

Table 9. Analysis of variance of central composite rotatable design in two variables of peptide content after enzyme hydrolysis for 4 hours

Source	Degree of freedom	Sum of square
Regression		
Linear	2	0.082**
Quadratic	2	0.432**
Cross-product	1	0.017
Total model	5	0.531**
Residual		
Lack of fit	3	0.017
Pure error	4	0.007
Total error	7	0.023
Total	12	0.554
R-square	0.9583	

** Significant at the 1% level of probability.

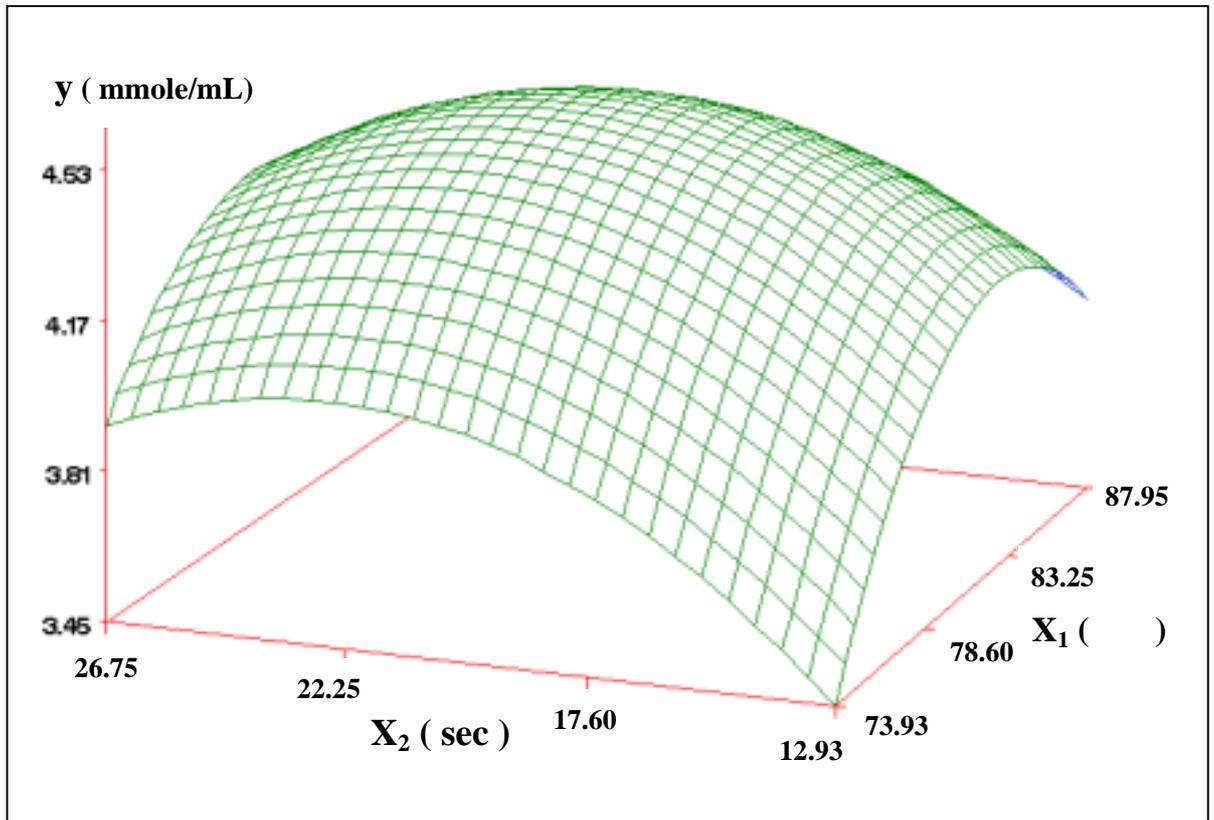


圖 5. 鮮乳經蛋白酶水解 4 小時胜肽量之反應曲面圖。

Fig. 5. The analysis of response surface of peptide content after enzyme hydrolysis for 4 hours^x.

^xEnzyme hydrolysis for 4 hours: the first 3 hours by pepsin, then the last 1 hour by pancreatin.

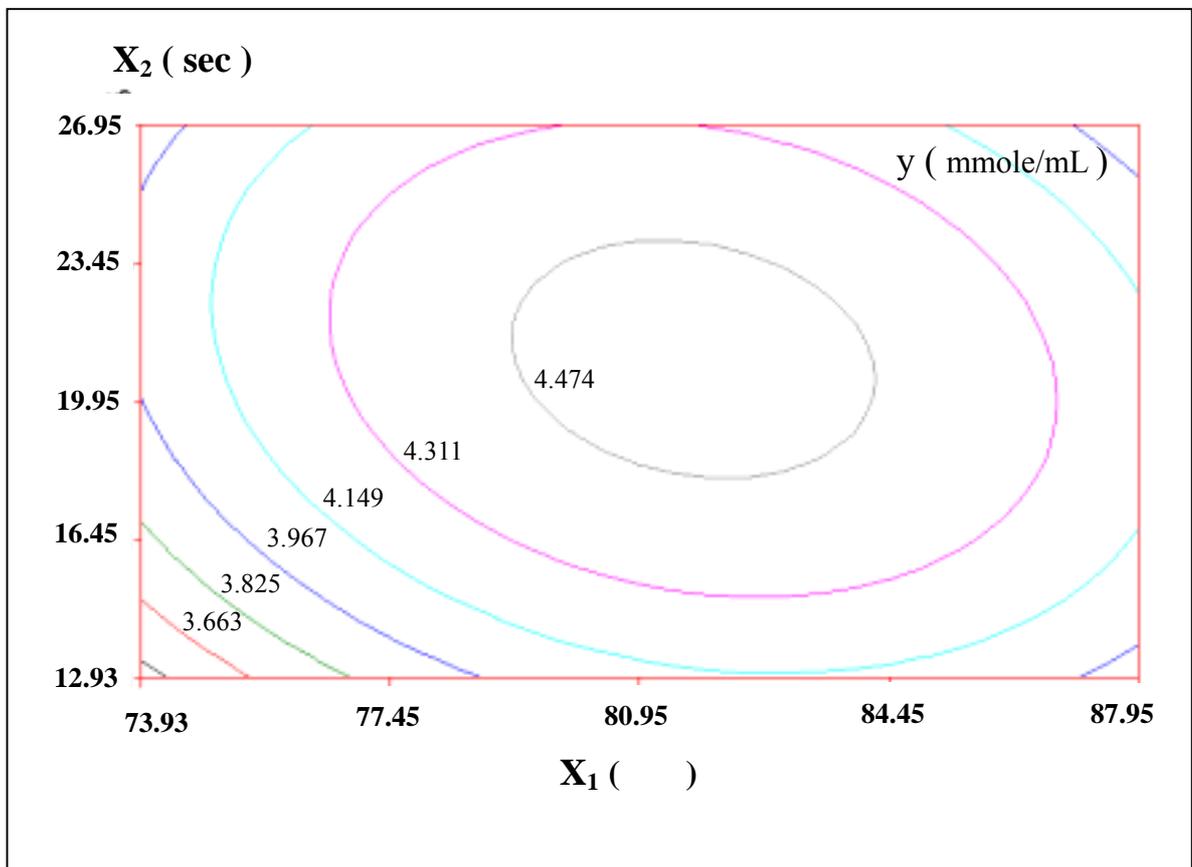


圖 6. 鮮乳經蛋白酶水解 4 小時胜肽量之等高線圖。

Fig. 6. The contour plot of peptide content after enzyme hydrolysis for 4 hours^x.

^x Enzyme hydrolysis for 4 hours: the first 3 hours by pepsin, then the last 1 hour by pancreatin.

上試驗點之胜肽生成量分別為 4.14、4.03、4.35 及 4.06 mmole/mL，此結果經 SAS 統計軟體系統分析後，得圖 5 之三維空間反應曲面圖，及圖 6 之等高線圖，其反應值估式為：

$$Y = 4.516 + 0.072X_1 - 0.214X_1^2 + 0.071X_2 - 0.154X_2^2 - 0.065X_1X_2$$

由圖 5 反應曲面圖得知，第一因子之殺菌溫度及第二因子之殺菌維持時間，均成二次曲線關係，眾曲線交會成曲面，在曲面圖上之最高點，即胜肽生成量最高點，將此結果以等高線圖表示，如圖 6 所示，圖上之每一等高線代表不同之胜肽生成量，由外圍向中心遞增，依序為 3.663、3.825、3.967、4.419、4.311 及 4.474 mmole/mL，而 81°C，20 秒鐘殺菌鮮乳，經蛋白酶水解 4 小時後之胜肽生成量落在等高線圖之中心區域，因此，就蛋白酶水解後之胜肽生成量而言，鮮乳之最適殺菌條件為 81°C，20 秒。此外，蛋白質水解 6 小時之二因子中心旋轉複合設計試驗結果如表 9 所示，此 5 個中心點之胜肽生成量分別為 6.82、6.78、6.89、6.83 及 6.87 mmole/mL，4 個試驗點之胜肽生成量分別為 6.18、6.35、6.48 及 6.42 mmole/mL，4 個軸上試驗點之胜肽生成量分別為 6.36、6.25、6.48 及 6.24 mmole/mL，此結果經 SAS 統計軟體系統分析後，得圖 7 三維空間反應曲面圖，及圖 8 等高線圖，其反應值估式為：

$$Y = 6.838 + 0.066X_1 - 0.260X_1^2 + 0.056X_2 - 0.233X_2^2 - 0.058X_1X_2$$

於圖 7 曲面圖上有最高點，即胜肽生成量最高點，將此結果以等高

線圖表示，81°C，20 秒殺菌鮮乳，經蛋白酶水解 6 小時後之胜肽生成量落在等高線圖之中心區域，因此，就蛋白酶水解後之胜肽生成量而言，鮮乳之最適殺菌條件為 81°C 維持 20 秒。

表 10. 鮮乳經蛋白酶水解 6 小時胜肽量之二因子旋轉中心複合設計

Table 10. The natural and coded variables of central composite rotatable design in two variables of peptide content after enzyme hydrolysis for 6 hours^x

Natural variable		Coded variable		Peptide content
Temperature	Time	x ₁	x ₂	6 hr
°C	second			mmole/mL
76	15	-1	-1	6.18
76	25	-1	1	6.35
86	15	1	-1	6.48
86	25	1	1	6.42
81	20	0	0	6.82
81	20	0	0	6.78
81	20	0	0	6.89
81	20	0	0	6.83
81	20	0	0	6.87
88.07	20	1.414	0	6.36
73.93	20	-1.414	0	6.25
81	27.07	0	1.414	6.48
81	12.93	0	-1.414	6.24

^x Enzyme hydrolysis for 6 hours: the first 3 hours by pepsin, then the last 3 hours by pancreatin.

表 11. 鮮乳經蛋白酶水解6小時胜肽量二因子旋轉中心複合設計之變方分析

Table 11. Analysis of variance of central composite rotatable design in two variables of peptide content after enzyme hydrolysis for 6 hours

Source	Degree of freedom	Sum of square
Regression		
Linear	2	0.060**
Quadratic	2	0.751**
Cross-product	1	0.013
Total model	5	0.824**
Residual		
Lack of fit	3	0.014
Pure error	4	0.007
Total error	7	0.021
Total	12	0.845
R-square	0.9751	

** Significant at the 1% level of probability.

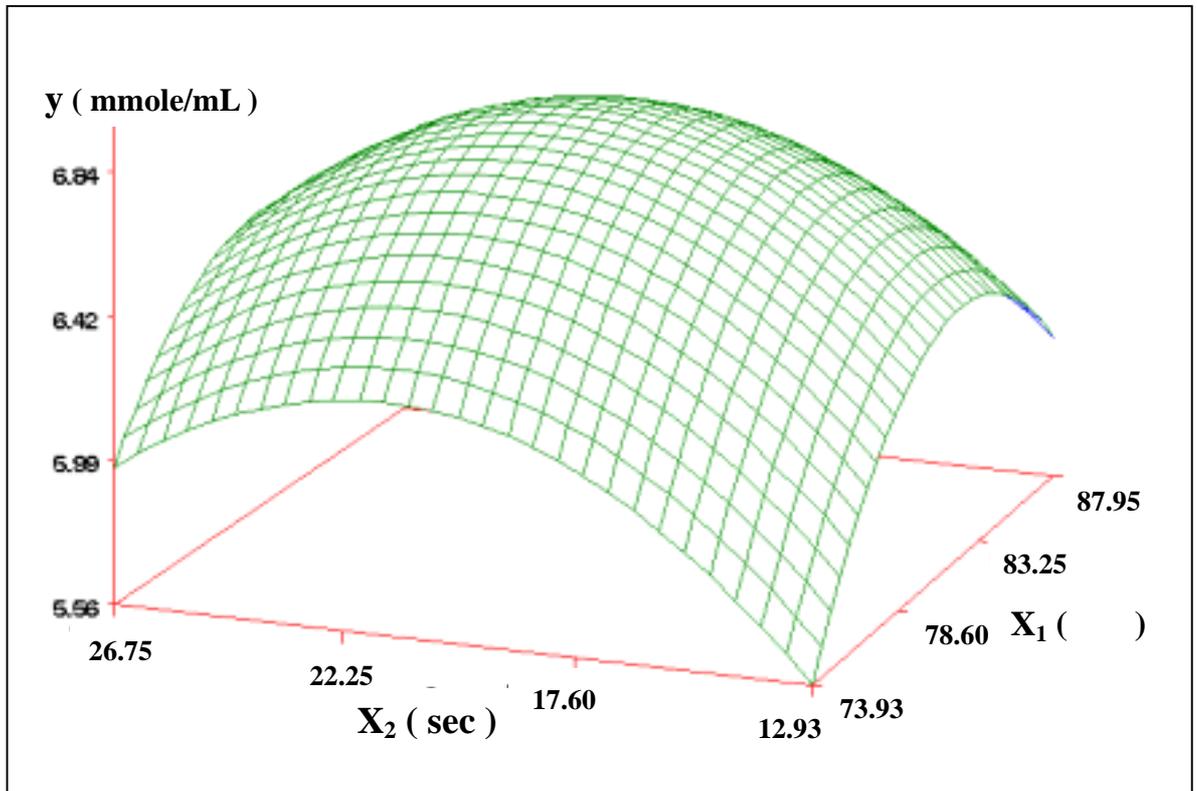


圖 7. 鮮乳經蛋白酶水解 6 小時胜肽量之反應曲面圖。

Fig. 7. The analysis of response surface of peptide content after enzyme hydrolysis for 6 hours^x.

^x Enzyme hydrolysis for 6 hours: the first 3 hours by pepsin, then the last 3 hours by pancreatin.

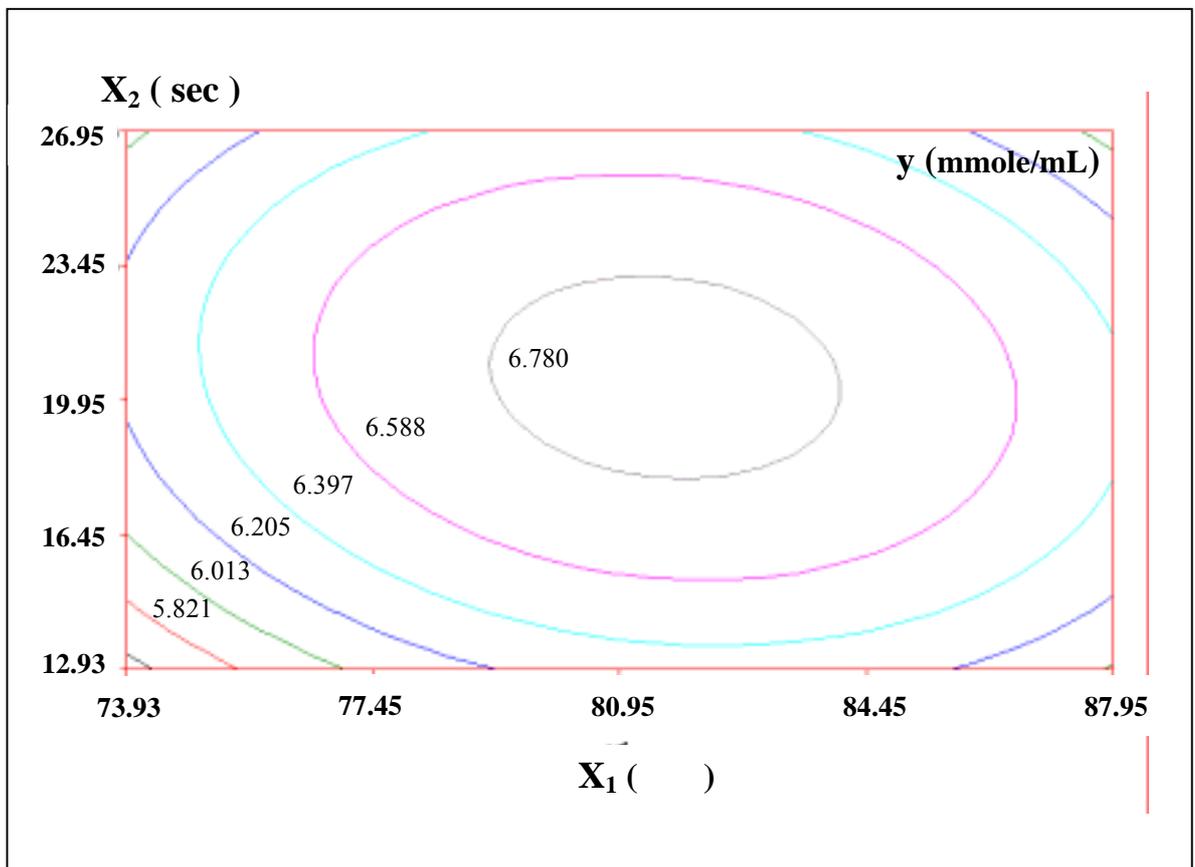


圖 8. 鮮乳經蛋白酶水解 6 小時胜肽量之等高線圖。

Fig. 8. The contour plot of peptide content after enzyme hydrolysis for 6 hours^x.

^x Enzyme hydrolysis for 6 hours: the first 3 hours by pepsin, then the last 3 hours by pancreatin.

四、分析最適殺菌條件處理鮮乳之理化學性質。

由試驗Ⅲ反應曲面法二因子旋轉中心複合試驗設計結果得知，依鮮乳經蛋白酶水解後之胜肽生成量評估，鮮乳之最適殺菌條件為 81°C，20 秒鐘。以 81°C，20 秒鐘為選取殺菌條件之鮮乳，分析其理化學性質，並與不同殺菌條件之市售鮮乳及保久乳作比較。表 12 為市售產品之鹼性磷酶活性及乳過氧化氫酶活性，81°C，20 秒鮮乳、HTST 鮮乳（90°C，10 秒鐘）、三家市售 UHT 鮮乳及三家市售 UHT 保久乳均呈陰性反應，表示各產品均達最低殺菌標準，且殺菌條件均高於 80°C，2.5 秒鐘（Burton, 1988）。

81°C，20 秒鮮乳、HTST 鮮乳（90°C，10 秒鐘）、三家 UHT 鮮乳及三家 UHT 保久乳之乳成分如表 13 所示，脂肪、蛋白質、乳糖、乳無脂固形物及總固形物等之含量在各產品間雖有顯著差異性（ $P < 0.05$ ），但並無規則性變化，顯然是與不同廠商之生乳成分不同有關。

牛乳色澤受加熱程度、貯存溫度與時間所影響，81°C，20 秒鐘鮮乳、HTST 鮮乳（90°C 10 秒鐘）、三家 UHT 鮮乳及三家 UHT 保久乳之亮度值（ L^* ）及黃色值（ b^* ）如表 14 所示，B 及 C 廠牌 UHT 鮮乳之亮度值最高（ $P < 0.05$ ），G 廠牌 UHT 保久乳之亮度值最低（ $P < 0.05$ ），此乃因牛乳適度殺菌時，乳清蛋白受熱變性產生

表 12. 81°C / 20 秒鮮乳與市乳之鹼性磷酶與乳過氧化氫酶測試

Table 12. The Alkaline phosphatase (AP) and lactoperoxidase (LP) test of 81°C / 20 sec pasteurized milk and market milk^x

Market milk	Treatment	AP	LP
	Raw milk	+	+
	81°C 20 sec	-	-
A	HTST	-	-
B	UHT	-	-
C	UHT	-	-
D	UHT	-	-
E	UHT	-	-
F	UHT	-	-
G	UHT	-	-

^x A, B, C and D: pasteurized milk; E, F and G: aseptic milk.

Raw milk as reference.

+: active.

-: inactive.

表 13. 81°C / 20 秒鮮乳與市乳成分

Table 13. The composition of 81°C / 20 sec pasteurized milk and market milk^x

Market milk	Treatment	Fat	Protein	Lactose	SNF	TS
				%		
	Raw milk	3.64 ^{ab}	3.31 ^a	4.80 ^a	8.69 ^{ab}	12.04 ^b
	81°C 20 sec	3.64 ^{ab}	3.32 ^a	4.78 ^a	8.68 ^{ab}	12.04 ^b
A	HTST	3.62 ^{bc}	3.31 ^a	4.50 ^{bc}	8.34 ^{cd}	12.00 ^b
B	UHT	3.52 ^c	3.23 ^b	4.62 ^b	8.46 ^{bc}	12.89 ^a
C	UHT	3.66 ^{ab}	3.30 ^a	4.78 ^a	8.72 ^a	12.63 ^a
D	UHT	3.59 ^{bc}	3.09 ^c	4.87 ^a	8.50 ^{abc}	12.54 ^a
E	UHT	3.75 ^a	3.21 ^b	4.58 ^{bc}	8.39 ^{cd}	12.15 ^b
F	UHT	3.74 ^a	3.14 ^c	4.47 ^c	8.19 ^d	11.93 ^b
G	UHT	3.70 ^{ab}	3.25 ^b	4.46 ^c	8.30 ^{cd}	11.94 ^b

^x A, B, C and D: pasteurized milk; E, F and G: aseptic milk.

^{a-d} Means in same columns followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

自身凝集或與酪蛋白微球鍵結，使乳中分子顆粒變大，致使牛乳之光折射率增加，而增加亮度值，在一定殺菌條件下，當殺菌溫度愈高、維持時間愈長時，反應量愈大，亮度值隨之增加 (Burton, 1988)，81°C，20 秒鐘鮮乳與生乳之亮度值較市售鮮乳低，表示市售鮮乳之殺菌條件高於 81°C，20 秒之熱變性程度，而 G 廠牌 UHT 殺菌保久乳之亮度值較低 ($P < 0.05$)，係熱處理程度較高或常溫貯存，乳中還原糖醛基與蛋白質胺基產生梅納反應，而使牛乳產生褐色化，且褐色化程度遠高於乳清蛋白熱變性上昇之折射率 (van Boekel, 1998)，所以各產品間，G 廠牌 UHT 保久乳之黃色值最高 ($P < 0.05$)，鮮乳乃因低溫冷藏貯存，褐色化程度大幅降低，所以 B 廠牌 UHT 鮮乳之黃色值最低 ($P < 0.05$)，81°C，20 秒鮮乳之黃色值較 HTST (90°C，10 秒) 鮮乳與 UHT 鮮乳為高，但較 UHT 保久乳為低，且皆達顯著差異 ($P < 0.05$)。

81°C，20 秒鐘鮮乳與市乳之理化學性質如表 15，G 廠牌 UHT 保久乳之滴定酸度最高 ($P < 0.05$)，81°C，20 秒鮮乳之滴定酸度最低 pH 值最高，皆達顯著差異 ($P < 0.05$)，而 E 及 G 廠牌 UHT 保久乳之 pH 值最低，且達顯著 ($P < 0.05$)，此乃因牛乳於加熱過程中，游離鈣離子會與磷酸根鍵結，改變乳中鹽類平衡，而使磷酸鹽釋放出氫離子，且於較嚴苛熱處理下，乳酮糖會降解成部分之果

表 14. 81°C / 20 秒鮮乳與市乳色澤 (L* 及 b* 值)

Table 14. Color (L* and b* value) of 81°C / 20 sec pasteurized milk and market milk^x

Market milk	Treatment	L*	b*
	Raw milk	78.40 ^c	6.70 ^{bc}
	81°C 20 sec	78.55 ^c	6.38 ^{cd}
A	HTST	80.01 ^b	5.57 ^{ef}
B	UHT	81.32 ^a	5.39 ^f
C	UHT	81.30 ^a	5.82 ^e
D	UHT	80.14 ^b	6.26 ^d
E	UHT	80.26 ^b	6.50 ^{bcd}
F	UHT	80.22 ^b	6.77 ^b
G	UHT	77.83 ^d	10.51 ^a

^x A, B, C and D: pasteurized milk; E, F and G: aseptic milk.

^{a-g} Means in same columns followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

糖與半乳糖，及產生蟻酸、乳酸等低分子有機酸，因此牛乳經熱處理後滴定酸度提高，而 pH 值降低（林，1993；Pellegrino *et al.*, 1995）。有效離胺酸含量以生乳及 81°C，20 秒鮮乳最高（ $P < 0.05$ ），G 廠牌 UHT 保久乳最低，且達顯著（ $P < 0.05$ ），而 81°C，20 秒鮮乳與 A 廠牌 HTST（90°C，10 秒）鮮乳及 C 廠牌 UHT 鮮乳之有效離胺酸含量，並無顯著差異（ $P > 0.05$ ），生乳及鮮乳較保久乳含更高之有效離胺酸，因牛乳於熱處理過程中，蛋白質胺基與還原糖醛基發生鍵結致使產生梅納反應，胺基中以 ϵ -胺基較易與還原糖醛基鍵結，較其他胺基高出 5-15 倍機率，而離胺酸即屬於 ϵ -胺基，因此，保久乳之有效離胺酸含量低於鮮乳（Adriana *et al.*, 2003）。

牛乳蛋白質為牛乳營養素之重要物質之一，包括 80% 酪蛋白及 20% 乳清蛋白，其中乳清蛋白為熱敏感性之物質，易受熱而產生變性（Milena *et al.*, 1996; Law and Leaver, 1999），圖 9 為 81°C，20 秒鮮乳與市乳之未變性乳清蛋白百分率，係以生乳之未變性乳清蛋白為 100%，各組未變性乳清蛋白百分率依 81°C，20 秒、HTST 及 UHT 之熱處理程度增加而遞減，且達顯著差異（ $P < 0.05$ ）。圖 10 為 81°C，20 秒鮮乳與市乳之蛋白質 SDS-PAGE 電泳分析圖，酪蛋白之各次單元： α -酪蛋白、 β -酪蛋白及 κ -酪蛋白片段，以及乳清蛋白各次單元： α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、牛血清白蛋白、

表 15. 81°C / 20 秒鮮乳與市乳之滴定酸度、pH 值及有效離胺酸
含量

Table 15. The titratable acidity, pH value and available lysine content
of 81°C / 20 sec pasteurized milk and market milk^x

Market milk	Treatment	Titratable acidity (%)	pH value	Available lysine (mM)
	Raw milk	0.149 ^{ef}	6.69 ^a	1.20 ^a
	81°C 20 sec	0.148 ^f	6.68 ^a	1.19 ^{ab}
A	HTST	0.158 ^{cd}	6.64 ^b	1.17 ^{bc}
B	UHT	0.150 ^{ef}	6.65 ^b	1.14 ^c
C	UHT	0.154 ^{de}	6.62 ^c	1.17 ^{bc}
D	UHT	0.154 ^{de}	6.61 ^{cd}	0.99 ^e
E	UHT	0.162 ^{bc}	6.53 ^e	1.05 ^d
F	UHT	0.167 ^{ab}	6.60 ^d	0.92 ^f
G	UHT	0.171 ^a	6.54 ^e	0.83 ^g

^x A, B, C and D: pasteurized milk; E, F and G: aseptic milk.

^{a-g} Means in same columns followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

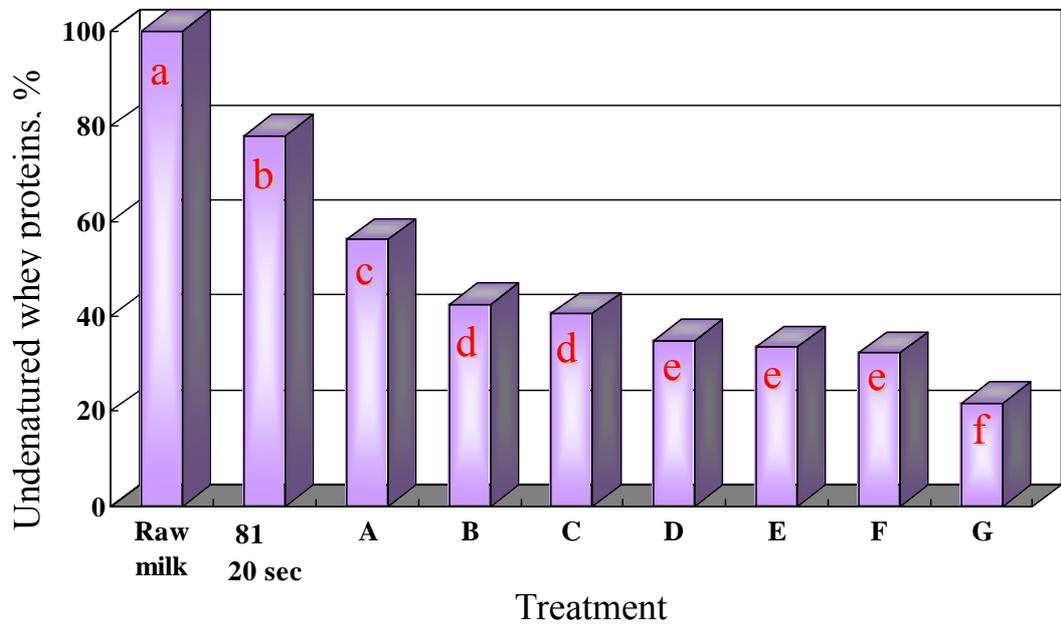


圖 9. 81°C / 20 秒鮮乳與市乳^{*}之未變性乳清蛋白百分率。

Fig. 9. The undenatured whey proteins of 81°C / 20 sec pasteurized milk and market milk^x.

^x A, HTST; B, C, D, UHT pasteurized and E, F, G, aseptic UHT milk. Reference: raw milk.

^{a-f} Means in columns followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

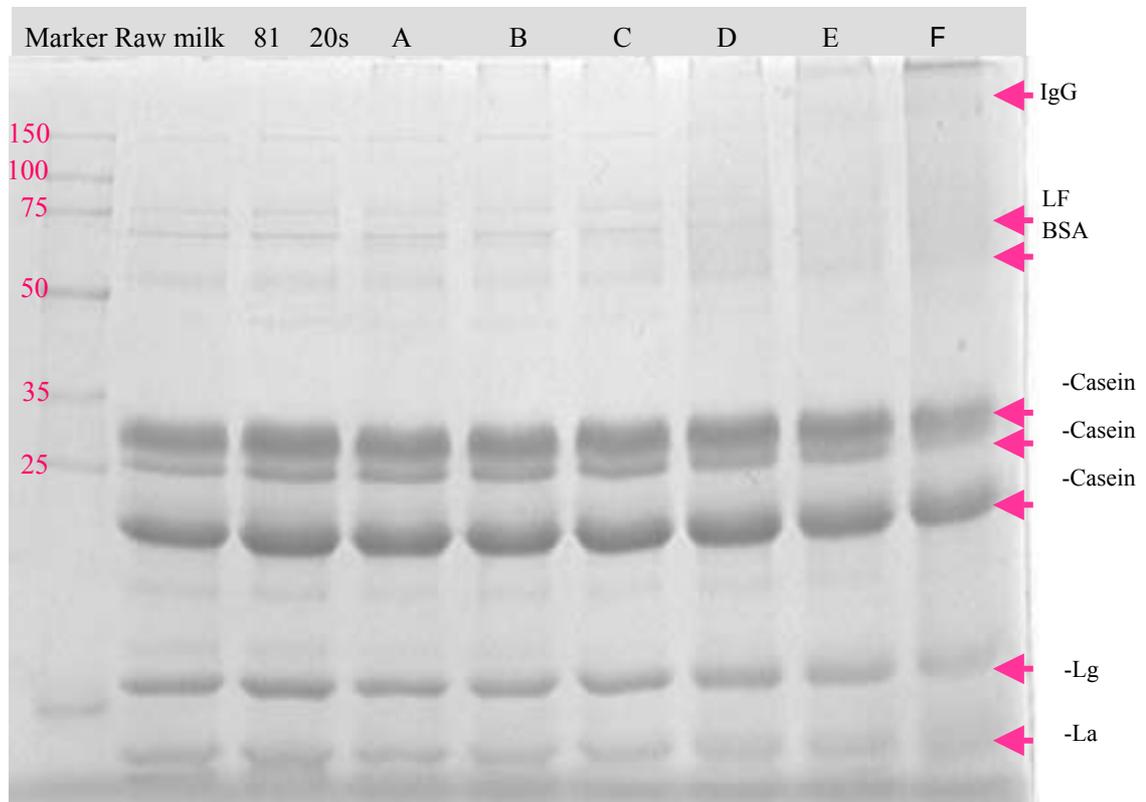


圖 10. 81°C / 20 秒鮮乳、生乳與市乳*之蛋白質 SDS-PAGE 電泳圖。

Fig. 10. Milk protein SDS-PAGE of 81°C / 20 sec pasteurized milk and market milk^x.

^x A, HTST pasteurized; B, C UHT pasteurized; D, E aseptic UHT milk and F bottle-sterilized milk. Reference: raw milk.

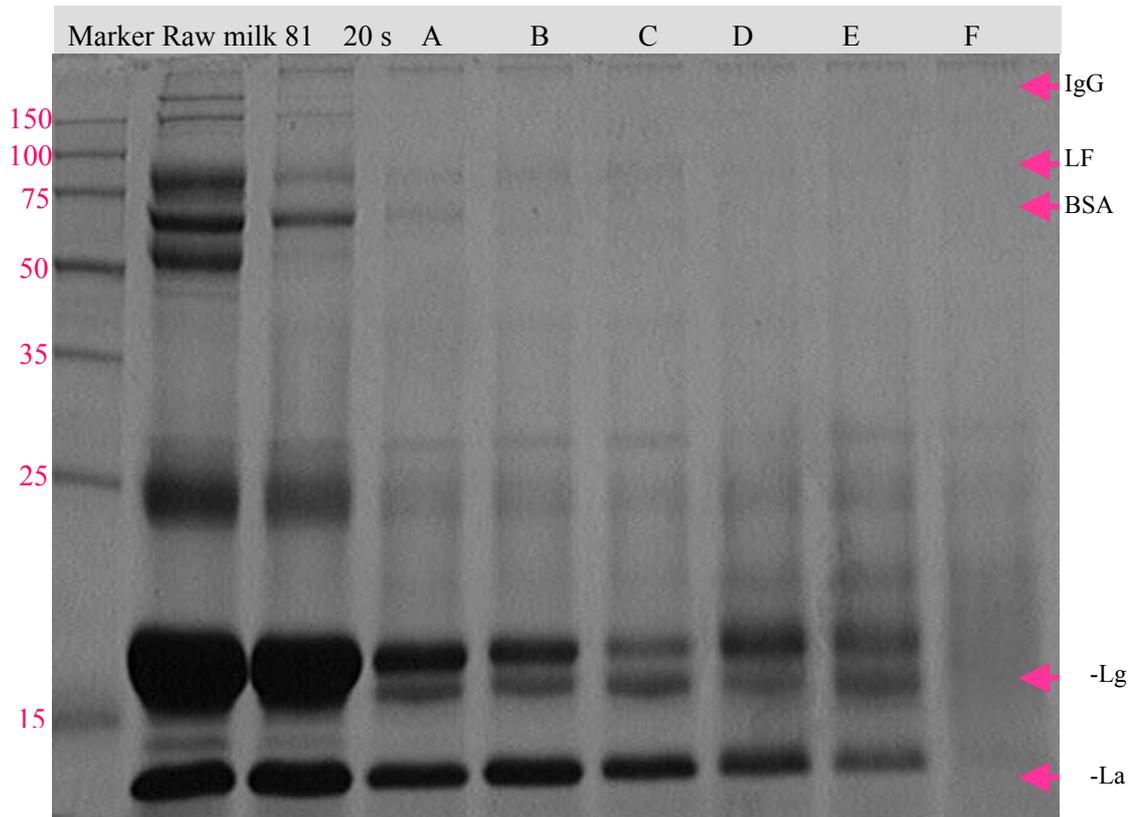


圖 11. 81°C / 20 秒鮮乳、生乳與市乳*之乳清蛋白 SDS-PAGE 電泳圖。

Fig. 11. Whey protein SDS-PAGE of 81°C / 20 sec pasteurized milk and market milk^x.

^x A, HTST pasteurized milk; B, C UHT pasteurized milk; D, E aseptic UHT milk; F bottle-sterilized milk. Reference: raw milk.

乳鐵蛋白及免疫球蛋白等片段，於生乳皆清晰可見，其他七組：
81°C，20 秒鮮乳、A 組 HTST (90°C，10 秒) 鮮乳、B 及 C 組 UHT
鮮乳、D 及 E 組為 UHT 保久乳與 F 組瓶裝滅菌乳之酪蛋白各次
單元片段變化不大，因酪蛋白對熱安定，因此其次單元之片段不因
熱處理程度不同而有差異，而乳清蛋白各次單元之片段則隨著熱處
理程度而有所變化 (Carbonaro *et al.*, 1998)。而經由圖 11 得知各產
品之未變性乳清蛋白之 SDS-PAGE 電泳圖，乳清蛋白之各次單元：
 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、牛血清白蛋白、乳鐵蛋白及免疫球蛋
白等片段，於生乳均清楚可見；81°C，20 秒鮮乳與 HTST (90°C，
10 秒) 之 A 組鮮乳之免疫球蛋白已消失，乳鐵蛋白及牛血清白蛋
白微量；UHT 鮮乳 (B, C) 及 UHT 保久乳 (D, E) 等之免疫球白、
乳鐵蛋白及牛血清白蛋白均已消失，而 α -乳白蛋白及 β -乳球蛋
白微量；瓶裝滅菌乳 (F) 乳清蛋白中各次單元均已消失。

不同程度熱處理產品之蛋白質水解程度如表 16 所示，於水解
第 4 及 6 小時，以 81°C，20 秒鮮乳之胨肽生成量最高，其次為 HTST
(90°C，10 秒) 鮮乳，再其次為 UHT 鮮乳，而以 UHT 保久乳最
低，且各組間達顯著差異 ($P < 0.05$)；因此，81°C，20 秒為鮮乳之
最適殺菌條件。

感官品評依色澤、乳香、濃厚感、風味及總接受度等進行品評，評分採用1至7級分，色澤以眼觀之，1為白色至7為褐色；乳香以鼻嗅之，1最稀薄至7最濃郁；濃厚感以口嚐之，1最稀薄至7最濃厚；風味則綜合口嚐及鼻聞之感覺，1最稀薄至7最濃郁；總接受度則綜合所有品評項目之結果，1極不喜歡至7極喜歡。表15為81°C，20秒鮮乳與市乳表17為之感官品評結果，F廠牌UHT保久乳顏色最深，B廠牌UHT鮮乳顏色最淺，且達顯著差異 ($P < 0.05$)；B及D廠牌UHT鮮乳之乳香最淡 ($P < 0.05$)；濃厚感則以E廠牌UHT保久乳顯著高於81°C，20秒鐘殺菌鮮乳 ($P < 0.05$)，其他組間之濃厚感均無顯著差異 ($P > 0.05$)；各組之牛乳風味介於3.50至4.33級分間，未達顯著差異 ($P > 0.05$)；綜合各品評項目，B及C廠牌UHT鮮乳最能被接受，A廠牌HTST鮮乳接受度最差，而81°C，20秒鐘殺菌鮮乳之總接受度則介於各市乳間，表示能被消費大眾所接受。

表 16. 81°C / 20秒鮮乳與市乳經蛋白酶水解之胜肽量

Table 16. The peptide content of 81°C / 20 sec pasteurized milk and market milk^y after enzyme hydrolysis^x

Market milk	Treatment	0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr
		mmole/mL				
	Raw milk	0.024	0.393	3.516 ^e	5.496 ^d	10.901 ^c
	81°C 20 sec	0.023	0.398	4.561 ^a	6.869 ^a	11.163 ^a
A	HTST	0.024	0.391	4.273 ^b	6.091 ^b	11.073 ^b
B	UHT	0.021	0.389	4.042 ^c	5.702 ^c	10.793 ^d
C	UHT	0.022	0.386	3.873 ^d	5.675 ^c	10.709 ^e
D	UHT	0.023	0.390	3.722 ^d	5.463 ^d	10.714 ^e
E	UHT	0.020	0.376	3.395 ^f	4.965 ^e	10.006 ^f
F	UHT	0.021	0.370	3.363 ^f	4.922 ^e	9.982 ^f
G	UHT	0.021	0.372	3.191 ^g	4.897 ^e	9.793 ^g

^x Enzyme hydrolysis: the first 3 hours by pepsin, then the last 5 hours by pancreatin

^y A, B, C and D: pasteurized milk; E, F and G: aseptic milk.

^{a-g} Means in same columns followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

表 17. 81°C / 20 秒鮮乳與市乳感官品評之比較

Table 17. The sensory evaluation of 81°C / 20 sec pasteurized milk and market milk^x

Market milk	Treatment	Color	Milky odor	Thickness	Milky flavor	Overall acceptability
	81°C 20 sec	3.50 ^d	3.47 ^{ab}	3.53 ^b	3.92	3.42 ^b
A	HTST	3.92 ^{cd}	3.75 ^a	3.92 ^{ab}	3.42	2.25 ^c
B	UHT	3.25 ^d	2.67 ^b	4.00 ^{ab}	4.00	4.67 ^a
C	UHT	3.83 ^{cd}	3.92 ^a	3.92 ^{ab}	4.00	4.33 ^a
D	UHT	5.00 ^b	2.58 ^b	3.67 ^{ab}	3.50	3.08 ^{bc}
E	UHT	4.33 ^c	3.33 ^{ab}	4.50 ^a	4.33	3.83 ^{ab}
F	UHT	6.33 ^a	3.25 ^{ab}	4.25 ^{ab}	3.92	3.08 ^{bc}

^x A, B, C and D: pasteurized milk; E and F: aseptic milk.

Color: 1-7 (white to brown); Milky odor: 1-7 (thin to thick); Thickness: 1-7 (thin to thick); Milk flavor: 1-7 (thin to thick);

Overall acceptability: 1-7 (unaccepted to accepted).

^{a-d} Means in same columns followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

陸、結論

不同殺菌條件之鮮乳，模擬人體腸胃消化試驗，以蛋白酶水解後之胜肽生成量，依反應曲面法之中心複合設計求出牛乳最適殺菌條件，試驗結果得第一因子中心點為 81°C，第二因子中心點為 20 秒，以 81°C，20 秒為中心點作二因子中心旋轉複合設計試驗，以 13 組條件處理之鮮乳，經蛋白酶水解之胜肽生成量，利用 SAS 統計軟體系統分析，得 81°C，20 秒殺菌鮮乳之胜肽生成量落在反應曲面圖之最高點及等高線圖之中心點，81°C 維持 20 秒為鮮乳最適殺菌條件。

柒、參考文獻

- 中國國家標準。1970。CNS 3447。N 6063。乳品檢驗法—磷酶之試驗。經濟部中央標準局。台北市。
- 中國國家標準。1995。CNS 3441。N 6057。乳品檢驗法—酸度之滴定。經濟部中央標準局。台北市。
- 沈明來。2004。試驗設計學，第 537- 594 頁。九州圖書文物有限公司，台北市。
- 林慶文。1993。乳品加工學，第 41-141 頁。華香園出版社，台北市。
- 張勝善。1989。牛乳與乳製品，第 263-293 頁。長河出版社。台北市。
- Adriana, S. G., B. N. Gabriela, S. M. Laura, and S. U. Maria. 2003. Available lysine, protein digestibility and lactulose in commercial infant formulas. *Int. Dairy J.* 13: 95-99.
- AlKanhil, H. A., A. A. Al-Othman, and F. M. Hewedi. 2001. Changes in protein nutritional quality in fresh and recombined ultra high temperature treated milk during storage. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 52: 509-514.
- Ames, J. M. 1998. Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chem.* 62(4): 431-439.
- Andrews, G. R. 1986. Formation and occurrence of lactulose in heated milk. *J. Dairy Res.* 53: 665-680.
- Angela, C. M. and F. X. Malcata. 1997. Secondary proteolysis in Serra cheese during ripening and throughout the cheese-making season. *Z Lebensm Unters Forsch A.* 204: 173-179.

- Atherton, H. V. and J. A. Newlander. 1977. Tests for milk quality. & Acidity of milk and its products. In *Chemistry and testing of dairy products*. pp. 173-199, 264-267. AVI Publ. Co. Inc. Westport, Connecticut.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Burton, H. 1988. Chemical and physical changes in milk at high temperatures. In *Ultra-high-temperature processing of milk and milk products*. pp. 44-76. Elsevier applied science publishers LTD. England.
- Carbonaro, M., F. Bonomi, S. Iametti, M. Cappelloni, and E. Carnovale. 1998. Aggregation of proteins in whey from raw and heat-processed milk: Formation of soluble macroaggregates and nutritional consequences. *Lebensm.-wiss. U.-Technol.* 31: 522-529.
- Carbonaro, M., M. Lucarini, and G. Dilullo. 2000. Composition and calcium status of acid whey from pasteurized, UHT-treated and in-bottle sterilized milks. *Nahrung* 44: 422-425.
- Church, F. C., G. L. Catignani, and H. E. Swaisgood. 1981. Hydrolysis of milk protein by *Streptomyces griseus* pronase. *J. Dairy Sci.* 64: 724.
- De Wit, J. N. and G. Klarenbeek. 1984. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *J. Dairy Sci.* 67: 2701-2710.
- Erbersdobler, H. F. and B. Dehn-Muller. 1989. Formation of early Maillard products during UHT treatment of milk. *Bull IDF* 238: 62-67.
- Estelle, P. C., Y. Kakuda, and D. Irvine. 1988. Heat-induced protein changes in milk processed by vat and continuous heating systems.

- J. Dairy Sci. 77: 1473-1483.
- Farkye, N. Y. and G. I. Imafidon. 1995. Thermal denaturation of indigenous milk enzymes. In *Heat-induced changes in milk*. 2nd. pp. 331-348. Int. Dairy Federation. Ireland.
- Greenbank, G. R. and M. J. Pallansch. 1962. Inactivation and reactivation of xanthine oxidase in dairy products. J. Dairy Sci. 45: 958-961.
- Griffiths, M. W. 1986. Use of milk enzymes as indices of heat treatment. J. Food Prot. 49: 696-705.
- Haque, Z. and J. E. Kinsella. 1988. Interaction between heated κ -casein and β -lactoglobulin: predominance of hydrophobic interactions in the initial stages of complex formation. J. Dairy Res. 55: 67-80.
- Hashizume, K. and T. Sato. 1988a. Gel-forming characteristics of milk proteins. I. Effects of heat treatment. J. Dairy Sci. 71(6): 1439.
- Hashizume, K. and T. Sato. 1988b. Gel-forming characteristics of milk proteins. II. Roles of sulfhydryl groups and disulfide bonds. J. Dairy Sci. 71(6): 1447.
- Holt, C. 1995. Effect of heating and cooling on the milk salts and their interaction with casein. In *Heat-induced changes in milk*. 2nd. pp. 105-133. Int. Dairy Federation. Ireland.
- Ito, O. and R. Akuzawa. 1983. Purification, crystallization and properties of bovine milk catalase. J. Dairy Sci. 66: 967-973.
- Jelen, P. and W. Rattray. 1995. Thermal denaturation of whey proteins. Chapter 4. pp. 66-80. In: *Heat-induced changes in milk*. edited by. Brussels, Belgium: Int. Dairy Federation.
- Kazmierski, M. and M. Corredig. 2003. Characterization of soluble aggregates from whey protein isolate. Food Hydro. 17: 685-692.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the

- assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 681.
- Law, A. J. R. and J. Leaver. 1999. Factors affecting the heat denaturation of whey proteins in cow's milk. *Int. Dairy J.* 9: 407-408.
- Li-chan, E., A. dummer, J. N. Losso, D. D. kitts, and S. Nakai. 1995. Stability of bovine immunoglobulins to thermal treatment and processing. *Food Res. Int.* 28 (1): 9-16
- Mansel, W. G. 1986. Use of milk enzymes as indices of heat treatment. *J. Food Prot.* 49(9): 696-705.
- Maria, E., B. Pova, and M. S. Tasso. 1997. Effect of heat treatment on the nutritional quality of milk proteins. *Int. Dairy J.* 7: 609-612.
- Milena, C. and D. G. Dalgleish. 1996. Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Res. Int.* 29 (1): 49-55.
- Milena, C. and D. G. Dalgleish. 1999. The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. *Int. Dairy J.* 9: 233-236.
- Moore, S. and W. H. Stein. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176: 367-388.
- Morales, F. J., C. Romero, and J. P. Salvio. 2000. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35: 193-200.
- Moreno, P. and V. Salvadó. 2000. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 870: 207-215.
- Morgan, F. and P. Gaborit. 2001. The typical flavour of goat milk

- products: technological aspects. *Int. J. Dairy Technol.* 54(1): 38-40.
- Mulvihill, D. M. and J. E. Kinsella. 1987. Gelation characteristics of whey proteins and β -lactoglobulin. *Food Technol.* 41(9): 102.
- Mustapha, B., M. F. Guingamp, J. L. Gaillard, and G. Humbert. 2001. Improvement of a method for the measurement of lactoperoxidase activity in milk. *Int. Dairy J.* 11: 795-799.
- Naranjo, G. B., L. S. Malec, and M. S. Vigo. 1998. Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. *Food Chem.* 62: 309-313.
- Panouill'e, M., T. Nicolai, and D. Durand. 2004. Heat induced aggregation and gelation of casein submicelles. *Int. Dairy J.* (14): 297-303.
- Panouill'e, M., D. Durand, T. Nicolai, E. Larquet, and B. Nicolas. 2005. Aggregation and gelation of micellar casein particles. *J. Colloid and Interface Sci.* 287: 85-93.
- Parnell-Clunies, E., Y. Kakuda, and A. Irvine. 1988. Heat-induced protein changes in milk processed by vat and continuous heating systems. *J. Dairy Sci.* 71(6): 1472.
- Pearce, K. N., D. Karahalios, and M. Friedman. 1988. Ninhydrin assay for proteolysis in ripening cheese. *J. Food Sci.* 53(2): 432-438.
- Pellegrino, L., P. Resmini, and W. Luf. 1995. Assesment (indices) of heat treatment. In: *Heat induced changes in milk*. 2nd. pp. 409-453. Int. Dairy Federation. Ireland.
- Porter, D. H., H. E. Swaisgood, and G. L. Catignani. 1984. Characterization of an immobilized digestive enzyme system for determination of protein digestibility. *J. Agric. Food. Chem.* 32: 334.

- Reddy, I. M., N. K. D. Kella, and J. E. Kinsella. 1988. Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestions. *J. Agric. Food. Chem.* 36: 737.
- Rodriguez-Otero, J. L., M. Hermida, and J. Centeno. 1997. Analysis of dairy products by near-infrared spectroscopy: a review. *J. Agric. Food. Chem.* 45: 2815-2819.
- SAS. 1999. SAS procedure guide for personal computers. 6th ed. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Schmidt, R. H. and H. A. Morris. 1984. Gelation properties of milk proteins, soyproteins, and blended protein systems. *Food Technol.* 38(5): 85.
- Sensidoni, A., D. Peressini, and C. M. Pollini. 1999. Study of the Maillard reaction in model systems under conditions related to the industrial process of pasta thermal VHT treatment. *J. Sci. Food Agric.* 79: 317-322.
- Singh, H. and P. F. Fox. 1987. Heat stability of milk: role of β -lactoglobulin in the pH-dependent dissociation of micellar κ -casein. *J. Dairy Res.* 54: 509.
- Singh, H. S. and L. K. Creamer. 1993. *In vitro* digestibility of whey protein- κ -casein complexes isolated from heated concentrated milk. *J. Food Sci.* 58: 299-302.
- Soledad, A. H., V. N. Teresa, and I. P. María. 1997. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogra. A.* 778: 247-253.
- Swaisgood, H. E. and G. L. Catignani. 1991. Protein digestibility: *in vitro* methods of assessment. *Adv. Food Nutr. Fes.* 35: 185.
- van Boekel, M. S. J. S. 1998. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem.* 62(4): 403-414.

- Vasbinder, A. J. and C. G. de Kruif. 2003. Casein-whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. *Int. Dairy J.* 13: 669-677.
- Villamiel, M., R. Lopez-Fandino, N. Corzo, and A. Olano. 1997. Denaturation of β -lactoglobulin and native enzymes in the plate exchanger and holding tube section during continuous flow pasteurization of milk. *Food Chem.* 58: 49-52.
- Villamiel, M., M. Arias, N. Corzo, and A. Olano. 1999. Use of different thermal indices to assess the quality of pasteurized milks. *Z Lebensm Unters Forsch A* 208: 169-171.
- Wilbey, R. A. 1996. Estimating the degree of heat treatment given to milk. *J. Soc. Dairy Technol.* 49: 109-112.
- Yvon, M., S. Beucher, P. Scanff, S. Thirouin, and J. P. Pélissier. 1992. *In vitro* simulation of gastric digestion of milk proteins: comparison between *in vitro* and *in vivo* data. *J. Agric. Food Chem.* 40: 239-244.

捌、英文摘要

Establishment of an optimal pasteurization condition of fresh milk by the peptide content from protein hydrolysis *in vitro*

Ling-Tsai Wu

Milk is a highly nutritious food, and must be pasteurized to destroy all the pathogenic and microorganisms in order to extend shelf life. However, the different pasteurization conditions could induce physicochemical changes in milk. This study was intended to establish an optimal pasteurization condition of milk using response surface methodology by the peptide content from protein hydrolysis *in vitro*. The first factor temperature (X_1) and the second factor holding time (X_2) of response surface were located through preliminary study. Then X_1 and X_2 were used as the center point of central composite rotatable design in order to establish an optimal pasteurization condition of fresh milk. The physicochemical properties of fresh milk processed from the optimal pasteurization condition were then compared with market milk. Results suggested that temperature (X_1) of 81°C and holding time (X_2) of 20 seconds, were used as center point for central composite rotatable design. Fresh milk pasteurized by 81°C for 20 seconds had the highest peptide content. The alkaline phosphatase and lactoperoxidase activity tests were negative of fresh milk pasteurized by 81°C for 20 seconds. The L^* , b^* value and titratable acidity of fresh milk pasteurized by 81°C for 20 seconds were significantly lower ($P < 0.05$) than market milk. In addition, pH value, available lysine content, undenatured whey

protein content and peptide content were significantly ($P < 0.05$) higher than market milk. The electrophoresis showed that fresh milk pasteurized by 81°C for 20 seconds had more undenatured whey protein than market milk. The overall acceptability of fresh milk pasteurized by 81°C for 20 seconds in sensory evaluation was among different market milk. Therefore, temperature of 81°C and holding time of 20 seconds was the optimal pasteurization condition of fresh milk.

Key words: fresh milk, pasteurization condition, protein hydrolysis, response surface methodology.

玖、小傳

作者吳鈴彩，台灣省雲林縣人，民國 66 年 9 月 12 日出生。先後畢業於雲林縣立客厝國小、嘉義市私立宏仁女中附設國中部、嘉義市立嘉義女中。民國 88 年考取私立東海大學畜產學系、民國 92 年畢業獲東海大學農學學士學位，並於同年甄試進入東海大學畜產與生物科技研究所加工組，追隨恩師 洪連欏 老師從事乳品之研究。承蒙恩師於課業上的悉心指導與生活上的關心及鼓勵，方可於民國 94 年 7 月順利完成此論文。

拾、附錄

一、研討會發表論文

1. 吳鈴彩，洪連欉。2002。熱處理對乳中 γ -glutamyltranspeptidase 活性的影響。中畜會誌 31 (Suppl.): 301。
2. 洪連欉，吳鈴彩。2003。鮮乳與保久乳成分及風味差異性之探討。行政院農業委員會中部辦公室農產經營管理計畫—草食家畜—乳牛輔導加強計畫。台中。台灣。
3. 吳鈴彩，洪連欉。2004。鮮乳熱處理程度之評估。中畜會誌 33 (Suppl.): 88。
4. 吳鈴彩。2005。藉體外蛋白水解試驗之胜肽生成量建立鮮乳最適殺菌條件。私立東海大學畜產與生物科技學系。碩士論文。
台中。