

壹、中文摘要

含存於雞肉中的主要 dipeptide 為 carnosine 與 anserine，此二者係維持血液固定酸鹼度的重要生物化學物質，並能螯合金屬離子及捕捉自由基，因此能降低氧化作用，可用於食品抗氧化之添加。本實驗建立一系列流程，由價格便宜的機械去骨雞肉 (Mechanically Deboned Chicken meat, MDCM) 中，分離純化出 carnosine 與 anserine。以去離子水為洗滌液進行水洗步驟，進行 oligopeptide 溶液的分取，經過一連串的離心、過濾、加熱、離心及 Hollow Fiber 超過濾後，再以 Sulphopropyl (SP) 管柱層析，可除去大部分的鐵與氨基酸，得到高純度的 oligopeptide 溶液(主要為 carnosine 與 anserine 混合液)，最後以毛細管電泳 (Capillary Zone Electrophoresis ; CZE) 及 C₁₈ 管柱進行高效能液相層析 (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC)，將 carnosine 與 anserine 定量。

實驗中開發之 HPLC 與 CZE 分析條件，能有效將肌 (carnosine) 與甲肌 (anserine) 分離，其 HPLC 分析條件分別為：semi preparative ODS column，mobile phase：50mM KH₂PO₄(pH7.0)，流速 1ml/min，偵測波長設在 200nm，毛細管電泳分析條件為 65cm fused-silica capillary tube，25mM KH₂PO₄(pH7.0)，9KV voltage，electric injection time is 2secs，detection wavelength at 200nm。以上述條件能有效的將 oligopeptide 溶液中的 carnosine 與 anserine 分離開來，並定量出機械去骨雞肉水洗液中 carnosine 與 anserine 含量。最後總產率為原始肉(約 2 公斤) 中 carnosine 與 anserine 總含量的 58.04%。

Abstract

Carnosine and anserine are two major dipeptide found in chicken muscle. Both dipeptide contained histidine or its derivatives and have been shown to be chelating agent for transition metal ions such as Cu^{2+} and Fe^{2+} which are catalyst in lipid autoxidation. These two dipeptide also showed scavenger for free radical produced in free radical chain reaction of lipid autoxidation. They are natural antioxidant and can be used as food additive to inhibit oxidation. The research was designed to isolate and purify these two dipeptides from cheap mechanical deboned chicken meat. This study, we choose deionized water to washed MDCM to get oligopeptide solution. After a succession of centrifugation, filtration, heating, ultra-filtration by Hollow Fiber, Sulphopropyl (SP) column chromatography was used to remove Fe^{2+} and most free amino acids in filtrate. The final oligopeptide solution rich in carnosine and anserine was obtained.

Two analytic methods, HPLC and CZE, have been developed to quantitate the carnosine and anserine in MDCM. Semi-preparative ODS with 50mM KH_2PO_4 (pH7.0) has been found to give baseline separation of carnosine and anserine from other free amino acid without any derivatization. CZE with 25mM KH_2PO_4 (pH7.0) and 9.0KV also gave good separation of these two dipeptides from each other and from other

free amino acids in few minutes. By using these two methods, the yield of carnosine and anserine content in MDCM was found to be around 58%.

貳、研究動機

根據行政院農委會中華民國農業統計年報指出，1999 年台灣地區雞隻年總生產量高達三十八億五千多萬餘隻，且有逐年上升之趨勢。雞肉分切銷售係目前及將來選購消費的主要趨勢，禽類的骨架、背骨、胸骨，隨著禽類製品之需求而增加，如此龐大的廢棄物數量，不但造成廢棄物處理上之困難，同時也容易產生環境污染的問題。而機械去骨肉的開發，可帶動二次加工禽肉的發展，不但可以有效的回收骨架上的剩肉，提高附加價值外，同時可降低廢棄物與環境污染的問題。分切後的剩餘骨架及零星碎肉為求有效的回收利用，係用機械去骨處理，所得之肉漿（機械去骨肉）中富含不飽和脂肪酸、heme pigments，再加上去骨時溫度上升、與空氣充分混合等因素，使 mechanically chicken deboned meat (MDCM) 顏色過於深紅、易氧化酸敗、且有不良氣味（鐵鏽味），不易為消費者所接受，只適合部份添加於其他產品。因此機械去骨雞肉價位低廉，適合用於 dipeptide 的分取，使用去離子水洗滌機械去骨雞肉，水洗液即可用於 dipeptide 的分取，而經洗滌過之 MDCM 以除去大部分脂肪與 heme pigment，安定性增加，大大提升其使用限量。

含存於雞肉中的主要 dipeptide 為 carnosine 及 anserine，這兩種 dipeptide 係維持血液固定酸鹼度的重要生物化學物質，二者在不同動物肌肉中含量比例不同（Chan and Decker, 1994），因此其含量比值可用於肉品原料是否摻假之檢定。另外，此兩種 dipeptides 具有螯合

金屬離子及捕捉自由基能力，能有效降低氧化反應之速率，可用於食品抗氧化之添加，是一優良天然抗氧化劑。本實驗擬建立一系列由機械去骨雞肉中分取 carnosine 與 anserine 之流程，並建立以高效能液相層析法應用 ODS 管柱與毛細管電泳分析定量 carosine 與 anserine 的最適條件，提供業者與學者參考。

參、文獻回顧

一、機械去骨禽肉之介紹 (MDPM)

(一) 簡介機械去骨肉：

機械去骨禽肉 (mechanically deboned poultry meat, MDPM) 是以家禽屠體骨架、背部、頸部或整隻屠體為原料，以機械分離肉骨所得到之肉漿；亦可說是禽肉加工上副產物或廢棄物之利用。從前，經人工取肉後剩餘骨架在加工上幾乎沒有利用價值，一般都製成肉骨粉用於動物飼料的添加劑或肥料 (Froning,1976)。早在 1940 年代，日本人即開始使用機械去骨的方式分離出魚肉和魚骨，1950 年代末期，Paoli 公司開始發展去骨機，這種操作方式才開始應用在禽肉加工上 (Froning,1976)。

一般應用在禽肉加工上所使用的去骨機，大致可分成擠壓式與壓力式兩種形式，其間差異主要在於擠壓式 (Auger-type) 去骨機，其原料在進入去骨機篩網去骨前，須先將原料初步絞碎成較小顆粒，屬二段式去骨機；而壓力式 (Press-type) 去骨機，原料則不必預先絞碎，屬單段批次去骨機。另外，進行骨肉分離時，使用壓力式去骨機會使肉漿溫度上升約 3~5℃，而擠壓式去骨機則會上升約 7~10℃ (Froning, 1976; Mast 等, 1982)。

(二) 機械去骨禽肉結構特性與主要成份

結構方面，主要受到去骨機設定、形式與篩網孔徑大小之影響。Schnell 等人 (1974) 研究中使用 0.0508cm、0.1016cm 及 0.1575cm 孔徑大小篩網加工 MDPM，結果發現當使用的篩網孔徑越小時，MDPM 中肌肉纖維越易受到破壞，即肌肉纖維中的 Z-line 與 M-line 被打斷成小分子，這些結構組成上的變化，可能會影響機械去骨肉其功能與安定性之表現。

影響機械去骨肉組成因子有許多，包括原料禽肉的種類、年齡、性別、飼養方法、骨肉比例、分切部位、脂質含量、去骨機之種類與設定、蛋白質變性與否等皆會造成去骨肉漿組成改變 (Jones, 1986 ; Mast et al., 1982 ; Froning, 1976 ; Orr and Wogar, 1979)。一般而言，將去骨機設定為高產率時，MDPM 的脂質、骨質及灰份含量都會升高；但不適當的去骨機設定，卻會使去骨過程中溫度上升過高，不但會造成蛋白質變性流失到骨渣中，同時亦促進脂質的氧化。Mast 等人 (1982) 報告指出以相同的骨架為原料，採用不同的去骨機製成的 MDPM 其組成會有差異。Baker 等人 (1974) 與 Froning (1981) 的報告中亦有相似的結果。但 Mcneil 等人 (1988) 與 Orr and Wogar (1979) 卻表示不同來源骨架對機械去骨肉組成之影響遠大於選用不同去骨機所造成的差異。在 Froning (1976) 的報告中便指出 Grunden 等人 (1972) 所測得的蛋白質含量比 Froning (1970) 所測得的數值低了許多，原因在於 Grunden 等人所用之材料含有較多的頸骨，而頸骨骨髓中含有較多的脂質，去骨過程中流失到肉漿中，稀釋了蛋白質含

量並提高脂質含量。另外，利用不同去骨壓力所製成的機械去骨禽肉（Mechanically deboned poultry meat，MDPM）均比手工去骨禽肉（Hand deboned poultry meat，HDPM）含有較高的脂質、灰分、鈣、鐵含量，但水分與蛋白質含量則是 HDPM 較高（Grunden et al., 1972; Froning and Johnson, 1973; Barbut, 1989）。

（1）水分

機械去骨肉主成分是水，約佔 65%~72% 左右。水分含量不同被認為與不同骨架來源、去骨機的種類與設定有關（Ang and Hamm，1982）。

（2）脂質與蛋白質

多位學者研究報告指出機械去骨禽肉比手工去骨禽肉含有較高脂質與較低的蛋白質（Froning, 1970；Froning and Janky, 1971；Froning et al., 1971；Froning and Johnson, 1973；Goodwin, 1968；Grunden et al., 1972）。原因在於禽類骨架在經去骨處理時，骨髓中大量的脂質流入肉漿中，相對稀釋了蛋白質含量，同時使脂肪含量增加（Moerck and Ball，1973）。另外，機械去骨肉漿脂肪含量的多寡亦與禽類本身脂肪含量（Jones，1986）、皮含量（Satterlee 等人，1971）飼養年齡與方式（Essary，1979）有關。年齡較老的淘汰雞，鈣化程度較高，骨髓中脂肪含量較少，因此由骨髓流入 MDPM 中的脂肪亦隨之減少。Satterlee 等人（1971）研究報告指出，雞皮含量的增加會使 MDPM 含有較高脂質與較

低蛋白質。去骨過程中，雞皮所含脂質會流入肉漿中，稀釋了蛋白質含量，但雞皮中主要的蛋白質（膠原蛋白，Collagen），卻殘留在骨渣中，並未經過篩網而進入肉漿。因此，雞皮含量的多寡並不影響 MDPM 中 collagen 的含量。Goodwin 等人（1968）報告指出，在去骨前先將骨架上油脂去除，可使 MDPM 脂肪含量降低而蛋白質含量增加。

另外，MDCM 的脂肪中含有大量的磷脂質與膽固醇。Marion and Woodroof（1965）指出，雞隻磷脂質（Phospholipid）含有較高比例的不飽和脂肪酸。Yamauchi 等人（1982）與 Pikul 等人（1984）亦表示磷脂質含有較多的不飽和脂肪酸，因此比一般脂質易氧化酸敗。骨髓中含有 46.5% 的脂質，其中 94.5% 為三酸甘油酯（Triglyceride），磷脂質含量為總脂質含量的 1.7%（Moerck and Ball，1973），三酸甘油酯由 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ 與 $C_{18:2}$ 之脂肪酸所構成，而磷脂質則含有高比例的 $C_{20:3}$ 到 $C_{20:6}$ 之多元不飽和脂肪酸。膽固醇含量方面，蔡等人（1991）報告指出以淘汰蛋雞製成的 MDCM 中膽固醇含量為 136mg/100g。Ang and Hamm（1982）研究中指出一般雞肉中膽固醇含量為 75-98mg/100g，製成 MDCM 後膽固醇含量為 94-129mg/100g，原因在於擠壓去骨過程中，骨髓中部份膽固醇流入 MDCM 中所致。MDCM 中膽固醇含量變異性很大，一般受年齡、性別、飼養方式、去骨方式等甚至不同分析方法亦會有所影響（Kunsman 等人，1981）。

蛋白質方面，除上述雞皮含量與骨髓中脂質所造成的影響外，原料骨架肉量含量亦有相關性。附著於骨架上的肉量，與人

工取肉的誤差及機器分切的設定有關，而骨架上所附著的肉量越多，所製成 MDCM 中蛋白質含量也越高 (Froning, 1976)。不適當的去骨機設定會使去骨過程中溫度升高太多，致使蛋白質變性，流失到骨渣中 (Mast 等人, 1982)。MacNeil 等人 (1978) 對去皮頸骨與背骨所製成的 MDCM 進行分析，發現去皮頸骨所製成的 MDCM 其 PER 值較高，原因可能是因為背骨製成的 MDCM 中脂肪含量較高所致，兩者的氨基酸組成幾乎相同。Babji 等人 (1980) 研究報告指出，火雞 MDPM 其 PER 值高於肉雞 MDPM 的 PER 值，並與酪蛋白 (Casein) PER 相似。Essary and Ritchey (1968) 測定火雞 MDPM 中氨基酸組成，結果與火雞胸肉、腿肉、牛肉、豬肉、牛乳與雞蛋中組成相似。

(3) 維生素與礦物質

1982 年 Ang and Hamm 測定 MDCM 中維生素的含量。結果顯示與傳統肉雞相比，MDPM 中 thiamin 量減少一點，但 niacin、vitamin B6 及 panthothenic acid 含量低了許多。另外，選用不同部位製成的 MDPM 會造成 niacin、vitamin B6、thiamine、riboflavin 與 panthothentic acid 等含量的差異，除 panthothentic acid 含量外，帶皮頸骨所製成的 MDPM 其各種維生素含量均較低。

礦物質含量方面，除肉漿本身所具有礦物質含量外，主要就是來自於骨質中所含的礦物質了。MDPM 的使用已超過數十年，雖然在多數的研究中，並無因 MDPM 骨質中礦物質所引起的疾病，但人們還是對其仍抱有一定的懷疑，尤其 MDPM 廣泛用來

作為食品添加劑與優良蛋白質來源。因此，便針對 MDPM 礦物質的含量訂定規範並限制其使用量。美國農業部(U.S Department of Agriculture , USDA , 1969) 規定 MDPM 中骨的含量必須低於肉重的 1%。Ang and Hamm (1982) 表示相同部位的 MDPM 與 HDPM 其維生素含量並無顯著差異。

MDPM 比一般肉類具有更高量的鈣、鐵存在，這類礦物質來自於細微的骨質經過篩網而進入肉漿中 (Ang and Hamm , 1982)。從營養的觀點來看，MDPM 比 HDPM 有更多的鈣質，且其生物有效性(Bioavailability)與牛乳中的鈣相近，並沒有害處，反而可以此為鈣質的補充來源 (Walker , 1972)。另外，MDPM 中還含有大量的鐵質，其來自於去骨過程中骨髓中的鐵質移入肉漿中 (Essary , 1979)，以 hemoprotein 的形式存在，如此對婦女缺乏鐵質的現象，MDPM 將有附加的營養價值。不過正因為 MDPM 中含有大量的鐵質，而加速催化了機械去骨肉的氧化酸敗 (Lee 等人 , 1975)。Ang and Humm (1982) 與 Essary (1979) 則認為骨質中所含的礦物質並不會對人體造成危害。

(4) 骨質含量與骨渣

去骨過程中，由於壓力與剪切力的作用，使得 MDPM 中骨質含量遽增，可能會影響其功能性與造成產品的缺陷。Mast 等人(1982)指出骨含量會受去骨機的形式與設定所影響。Grunden and MacNeil(1973)表示以較成熟的禽類骨架所製成的 MDPM，其骨質含量會比年幼骨架製成的來的高，原因為成熟的禽類骨架

其鈣化程度較高所致。Froning (1981) 以肉雞頸骨與背骨混合製成的 MDPM 和淘汰蛋雞所製成的 MDPM 進行比較，結果發現除了在組成上之差異外，蛋雞 MDPM 的鈣、鐵含量較低，原因可能在於蛋雞的骨質較硬，去骨過程中較不易影響肉漿中的含量，並且蛋雞 MDPM 骨質也比肉雞 MDPM 來的大。骨含量(Bone %) 的測定可利用下列公式由鈣含量 (Ca %) 轉換而來：

$$\text{Bone \%} = (\text{Ca \%} - 0.015) \times 4.55$$

一般而言，生產者都會儘量避免 MDPM 中骨質含量過高。Froning (1979) 指出 MDPM 中骨質的硬度與大小並不會對人體造成危害。

MDPM 的骨渣經過適當的處理，可作為飼養動物時良好的蛋白質與礦物質來源 (Froning , 1976)。Young (1976) 與 MacNeil (1981) 報告中均指出，MDPM 的骨渣中仍含有大量的蛋白質，可經由簡單的鹽水處理萃取出 6% 以上的蛋白質，其中含高量的肌纖維蛋白質 (Myofibrillar protein)。大部分的骨渣被用來熬湯、添加於動物飼料中或當成肥料使用，其中所含非蛋白質部份 (如高量的鈣、鐵)，有時有更高的利用價值。Wallace and Froning (1979) 由骨渣中分離出高達 84% 的蛋白質，不過其 PER 值比酪蛋白稍低，必須氨基酸含量也比較少。

USDA 在 1982 年將 MDPM 列入廣義的食肉定義中，並規定 MDPM 必須符合以下四點：(1) 含脂率不得超過 30% ，(2) 蛋白質含量不得少於 13% ，(3) 蛋白質品質方面，PER 不得低於 2.5 ，(4) 鈣質含量不得超過 0.75%。

(三) 機械去骨禽肉機能性與應用性

經過擠壓製成的 MDPM，其質地細緻綿密，成乳化狀肉漿，(Paste-form)，廣泛應用於製備乳化產品。Froning (1970) 研究報告中指出細碎之 MDCM 在 7.2~12.8 之溫度範圍內，乳化安定性相當良好，但超過 12.8 則有開始下降之趨勢，但以相同條件處理測試 HDCM，超過 12.8 時 HDCM 仍保有良好之乳化安定性。此現象可能是因為 MDCM 乳化時所形成的脂肪顆粒比 HDCM 稍大，且在去骨過程中，溫度過度升高而導致蛋白質變性所致 (Smith , 1987)。

Schnell 等人 (1973) 與 Froning 等人 (1973) 均表示原料骨架上含皮量的增加，將顯著影響機械去骨肉漿乳化力及乳化安定性下降。原因在於含皮量增加，會使肉漿中脂肪含量增加，稀釋蛋白質含量，而雞皮中主要的膠原蛋白卻不會受雞皮含量多寡而有所變動。Maurer (1973) 研究指出，以肉雞骨架相同部位 (背骨與頸骨) 製成的 MDCM 與 HDCM，具有相似的乳化能力。

另外，Froning and Janky (1971) 研究結果顯示預拌食鹽及調整 pH 值，可明顯改善法蘭克福香腸的乳化安定性。因為加入食鹽可萃取出鹽溶性蛋白質，同時調整 pH 值 (在 pH6.0~6.5 之間，鹽溶性蛋白質乳化力最高)，因此可明顯改善乳化力。Froning and Johnson (1973) 與 Dhillon and Maurer (1975) 則利用離心分離 MDCM，使得蛋白質增加、脂質含量降低，亦使 MDCM 乳化力增加。Raphaelides 等人 (1998) 添加 30% 的 MDCM 至牛肉製成的 salami 香腸中，而不會造成產品質地 (texture) 與色澤的變化。

目前 MDCM 大都應用於乳化類製品，如：法蘭克福香腸（Frankfurter）、薩拉米臘腸（Salami）、波羅納香腸（Bologna）或其他乳化香腸中；此外，亦可當作肉類添加劑添加至其他食品中。機械去骨肉富含 myofibrillar protein，是 surimi-base food 中的優良成份（Lin 等人，1989），近年來美國即利用 MDPM 發展 surimi 類產品。

二、機械去骨禽肉潛在之問題

（一）顏色過深且容易氧化酸敗

機械去骨禽肉在經擠壓去骨處理時，由於骨髓中所含的大量脂肪與 heme 流入肉漿中，同時擠壓過程中溫度上升（Froning，1976）與混入空氣（Dawson and Gartner，1983）等因子影響，因此 MDCM 十分容易氧化酸敗，並造成不良風味與顏色，這也是 MDCM 在使用上的最大限制因素。

Moerck and Ball（1973）指出 MDCM 的氧化酸敗值顯著比 HDCM 高。主要是因為禽肉本身即富含不飽和脂肪酸，而機械去骨禽肉之不飽和脂肪酸大多來自於磷脂質（Moerck and Ball，1974）。Froning and Johnson（1973）研究 MDCM 與 HDCM 中 heme 的含量，結果發現 MDCM 所含 heme 含量是 HDCM 含量的三倍以上，且較年幼雞隻其骨髓中 heme 含量較高。蔡等人（1991）報告中亦表示 MDCM 中血色素含量為一般雞肉的六倍。Froning（1976）指出，heme 與脂質的交互作用對 MDCM 安

定性的影響很大，且 heme 中所含的鐵質會加速催化脂肪自氧化作用 (Autoxidation) (Paquette 等人，1985)。

顏色，是一般消費者在購買生鮮或醃漬肉品時最重要的考量因素，而 heme 含量的增加使得 MDCM 顏色變得更紅、更暗。Froning (1973) 研究顯示當肉雞背骨含皮量增加時，脂肪流入 MDCM 中，降低 heme 的含量，造成色澤上亮度與黃色度增加，紅色度降低。Lee 等人 (1975) 發現當 hemoprotein 被 H_2O_2 所破壞後，由 heme 催化的脂質氧化作用可降低至原來的 10% 以下，因此由 hemoprotein 中游離出來的 heme，為油脂氧化中很重要的催化物質。

為了消除此項限制因子，增加使用上的價值，許多學者致力於這方面之研究。Hernandez 等人 (1986) 用 0.04M 的 phosphate buffer (pH8.0) 水洗機械去骨火雞肉，結果可使亮度提高 51.1%，紅色度降低 64.0%。李 (1996) 選用五種溶液 (deionized water、0.1M NaCl、0.5% $NaHCO_3$ 、0.038M Sodium phosphate buffer 與 0.02M Sodium acetate buffer) 洗滌機械去骨雞肉，並測定處理後之產率、顏色、脂肪含量及其組成、乳化力等效應。實驗結果發現 $NaHCO_3$ 處理組的產率最高，同時 L 值也較其他處理組高。戴 (1994) 探討添加氯化鈉、亞硝酸鈉、植酸與異抗壞血酸對 MDPM 氧化酸敗、微生物品質、色澤與酸鹼值等影響，發現異抗壞血酸的抗氧化酸敗能力高於實驗中其他添加物。而陳 (1995) 添加三種金屬螯合劑 carnosine、N-carboxymethyl chitosan (NCCM) 與 sodium tripolyphosphate (STPP) 到 MDCM 中，以

抑制其氧化酸敗。其中 carnosine 存在於脊椎動物的骨骼肌中 (Decker , 1994) , 是一天然的抗氧化劑 , 抑制效果最佳。

(二) 微生物問題

MDCM 經過去骨加工後 , 質地綿密細緻 , 且營養豐富 , 易有微生物生長的問題。影響因子甚多 , Greenwood and Swaminathan (1981) 表示 MDCM 中微生物含量變異 , 影響因子包括去骨機設定、去骨溫度、骨架來源、儲存時間與溫度等因素。Denton and Gardner (1982) 表示 MDCM 在去骨過程中 , 顆粒變得十分細小同時溫度上升 , 使細胞破裂 , 胞液流出 , 大大增加微生物生長機會。Ostovar 等人 (1971) 研究表示 , MDCM 中起始菌數大多是低溫菌與耐低溫菌 , 如 *Pseudomonas* 即佔 51% , 而造成肉品腐敗。同時 , 比較冷藏在 3~5 °C 下 5 天的禽類骨架所製成 MDCM 與新鮮骨架立即製成 MDCM 總生菌數含量 , 結果發現經冷藏處理所製成的 MDCM 總生菌數較高 , 且冷藏期間生菌數也很高。不過 , 當溫度低於 - 10 °C 時 , 即可有效抑制微生物生長 (MacNiel and Mast , 1980) 。

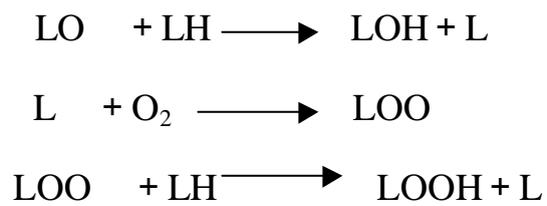
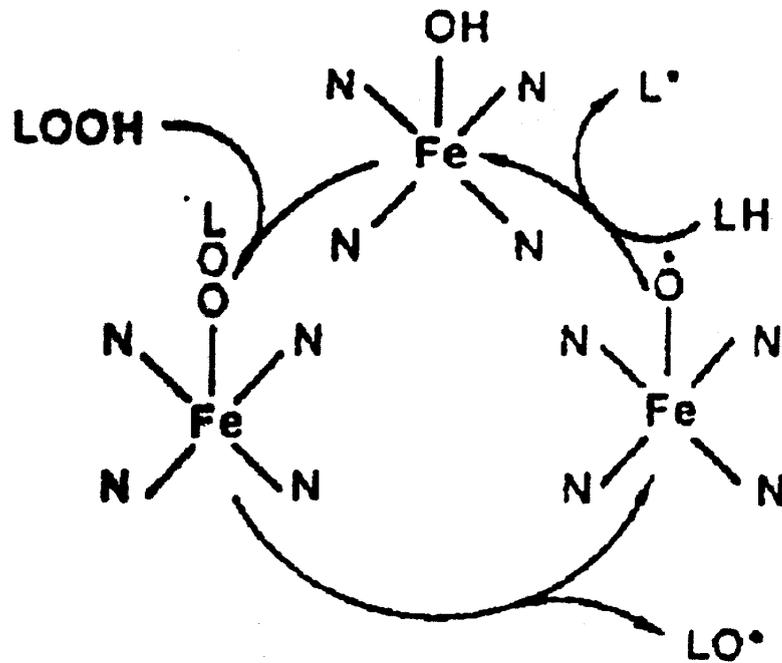
在防止微生物生長方面 , 除了選用低溫儲藏外 , 亦可使用一些添加劑。MacNeil 等人 (1973) 利用聚合磷酸鹽、Butyl-hydroxyanisole (BHA) 與迷迭香萃取物加入 MDCM 中 , 結果發現不但減緩氧化反應進行 , 同時也抑制微生物的生長。此外 , MDCM 中加入 40ppm 的亞硝酸鹽或 0.2% 己二烯酸與 0.4% 的聚合磷酸鹽 , 可有效抑制肉毒桿菌產毒 (Nelson 等人 , 1983) 。

三、 天然抗氧化劑：Carnosine 與 Anserine

早在十九世紀，人們就認為造成食品敗壞的原因，除了微生物的破壞，即是油脂的氧化。脂質氧化是導致肉品品質低劣的主要原因之一，生鮮肉及肉品通常含有多量脂肪，形成氧化酸敗，對品質（外觀、風味、組織等）具嚴重破壞作用。尤其是氧化作用導致肉品褪色，營養成份流失（如維生素 A、D、E 及葉酸），必須脂肪酸（亞麻油酸）與胺基酸分解（methionine、cystine、histidine、lysine 與 tryptophan 等），甚至產生有害物質（Pearson 等人，1983）。

Younathan and Watts (1960) 證實蒸煮肉品不良風味主要來自於瘦肉組織或肌肉細胞中存有磷脂質。同時，脂質氧化酸敗程度與肉品所含磷脂質量與脂肪種類有關，特別是亞麻仁油酸及花生油酸最容易引起氧化酸敗（Igene and Pearson, 1979）。實驗指出原血紅素複合物與脂肪接觸時，具有氧化促進物質功效（Brown 等人，1963）。Igene 等人（1979）指出添加肌肉色素萃取物至蒸煮牛肉中會加速脂質氧化速度。當過氧化氫添加至肌肉色素萃取物中會破壞原血紅素，提高氧化觸媒活性。通常新鮮肉品肌肉色素中的鐵質超過 90%，是屬於結合原血紅素鐵，蒸煮後會破壞原血紅素分子使非原血紅素鐵質含量增加，而非血紅素鐵質具觸媒作用可加速蒸煮肉品脂質氧化速率。1962 年 Tappel 提出血基質促進脂質氧化機制圖（圖一）。脂質氧化所產生之過氧化物與丙二醛（Malonaldehyde），更被認為是造成癌症的原因之一。

(Shamberger , 1978)。油脂氧化雖可藉由加工、冷藏與包裝等方法來延緩，但添加抗氧化劑仍是最直接、有效的方法。



(From : Tappel , 1962)

圖一、氧化原血紅素複合物催化多元不飽和脂肪酸氧化機制

Figure 1. The mechanism of oxidation for unsaturated polyphospholipid catalyzed by hemoglobin.

(一) 脂質氧化機制

油脂氧化可分成光氧化 (photosensitized oxidation) 與自氧化 (Autooxidation) 兩種 (圖二)。自氧化反應是一連串的自由基連鎖反應, 包括起始期 (initiation)、成長期 (propagation) 與終止期 (termination) 三個階段 (Nawar, 1985):

(1) 起始期 (Initiation stage):

在開始階段, 一不飽和氫鍵上碳氫化合物受到其他具化學活性物質 (如: 自由基、光、熱、單重態氧等) 的作用, 以移去氫原子而形成一自由基, 此步驟反應較慢, 是脂肪氧化速率的決定步驟。

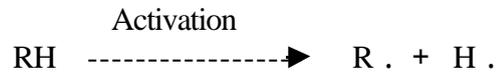
(2) 連鎖反應期 (Propagation stage):

此階段反應包含一系列氫過氧基與新的自由基生成連鎖反應。自由基與 O_2 結合形成過氧化自由基分子 (peroxide free radical), 過氧化自由基分子再與其他不飽和脂肪酸反應, 繼續產生新的自由基與氫過氧化物 (Hydroperoxide)。

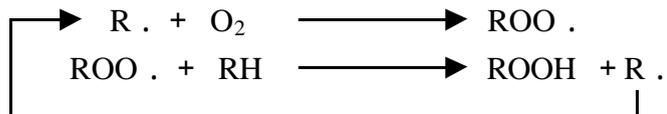
(3) 終止期 (Termination stage)

最後階段, 兩個自由基相互作用, 或與抗氧化劑結合而將整個連鎖反應終止。

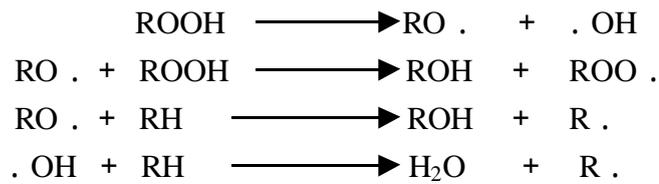
Initiation



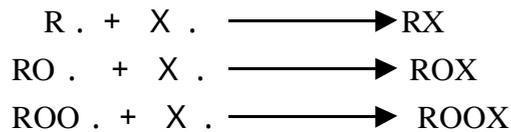
Propagation



**Chain branching
reaction**



Termination



RH : unstaturated fatty acid , ROOX : lipid peroxide

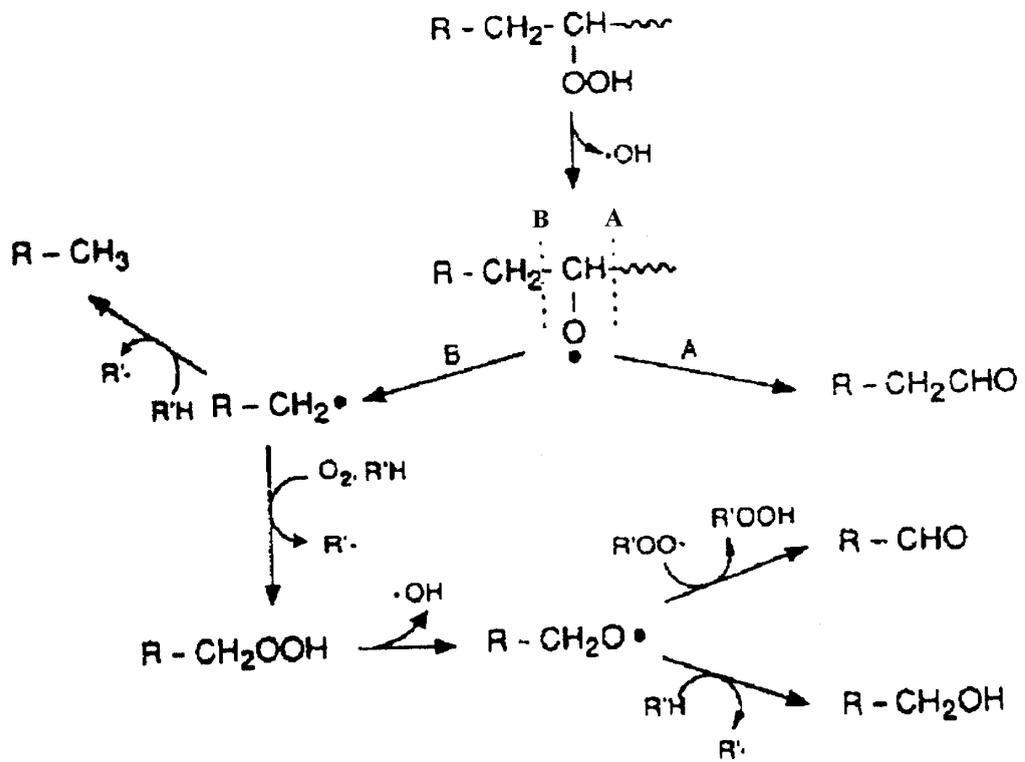
(From : Nawar , 1985)

圖二、脂質自氧化連鎖反應圖

Figure 2. Autooxidation chain reaction of lipid.

脂質氧化的初級產物是氫過氧化物，最後分解為揮發性及非揮發性之次級產物 (Mottram , 1994)，詳細圖解示於圖三。氫過氧化物起初均勻分裂為烷氧基(alkoxy radical)及氫氧基(hydroxy radical)，其次是裂解的脂肪酸接至烷氧基。氫過氧化物形成之揮發性物質依其烷鏈 (alkyl chain) 及所處位置而決定鏈的裂解進行位置 (A 或 B)。如果烷基是飽和狀態，則裂解在 A 處進行而形成醛類，若在 B 處進行則形成烷自由基(R-CH₂) 與氧結合。最終是氫過氧化物裂解產生之烷氧基形成穩定態的非自由基產物，如酒精或醛類。

未經醃漬的肉加以蒸煮後儲存，風味改變相當迅速。Tims and Watts (1958) 首先提出”Warmed-over flavor” (WOF) 現象，定義為經烹煮儲藏過的肉快速發展產生的氧化酸敗氣味。Asghar 等人 (1988) 則認為在烹煮過程中所造成脂肪細胞膜斷裂，以及由鐵或 hemoprotein 所催化的脂質氧化反應，為造成 WOF 的主要原因之一。Igene 與 Pearson (1979) 研究指出，磷脂質 (phospholipid) 在形成 WOF 中扮演重要角色，且磷脂質中不飽和脂肪酸含量越高，則氧化速率越快。加入亞硝酸鹽 (nitrite) 則可有效抑制烹煮後 WOF 的形成 (Gray and Pearson , 1984)。原因可能為亞硝酸鹽與 heme 形成穩定複合物，防止鐵離子的游離而催化脂質氧化，同時穩定脂肪細胞膜，減少絞碎或加熱過程中肉品暴露在空氣中而快速氧化等。



(From : Mottram , 1994)

圖三、簡單脂質過氧化物裂解成揮發性物質

Figure 3. Volatilized compounds generated by lipid peroxides.

(二) 抗氧化劑種類

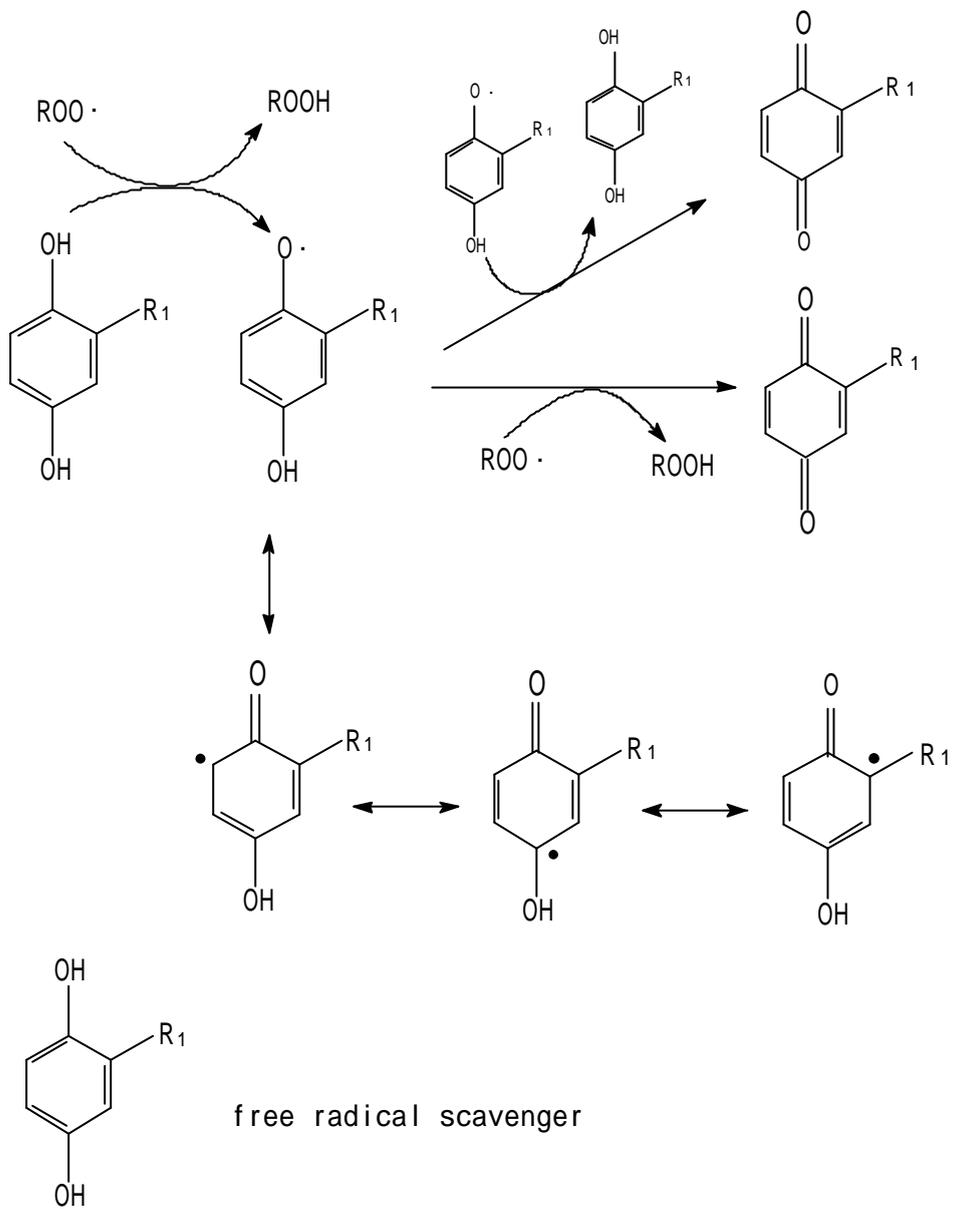
抗氧化劑功能，是貢獻出自身的氫給自由基形成穩定的氫過氧化物或將油脂還原。而抗氧化劑自身則形成抗氧化自由基分子，因穩定性高不會再參與其他反應而終止連鎖反應。依不同功能性可分為：(一) 自由基終止劑 (free radical terminator) (二) 還原劑或耗氧型 (reducing agent or "oxygen scavengers") 及 (三) 鉗合劑型 (chelating agent) 三大類。

(1) 自由基終止劑

此類抗氧化劑多具有酚環 (phenolic hydroxyl group) 的結構。當供出自身之氫給不安定的自由基分子後，本身苯環結構上的不成對電子轉移而形成共振結構 (resonating structure)，同時失去讓氧原子攻擊的適當位置，而形成穩定的抗氧化基分子，終止連鎖反應的進行 (圖四) (Sherwin , 1978)。BHA、BHT、TBHQ 與 PG 四種皆屬此型，結構如圖五所示。

A. 丁基 基甲氧苯 (Butylated hydroxyanisole , BHA) 與二丁基 基甲氧苯 (Butylated hydroxytoluene , BHT)

呈白色或微帶黃褐色之結晶性粉末，易溶於酒精、油脂之中，但難溶於水。配合冷藏則效果加倍，耐高溫，不論油煎、高溫烘焙皆不會引起色、香、味的改變。將 BHA 與 BHT、TBHQ、PG 一起使用時，產生相乘效應 (synergism)，抗氧化效果更佳。



圖四、自由基清除劑之作用機制

Figure 4. Mechanism of antioxidation for free radical scavenger

B. 第三丁基氫醌 (Tertiary butyhydroquinone , TBHQ)

白或黃褐色之結晶，溶解於甘油、乙醇，微溶於脂肪但不溶於水，與檸檬酸使用時效果更好。為用於油脂、奶油之抗氧化劑。

C. 沒食子酸丙酯 (propyl gallate , PG)

存在於茶與多種植物中，白色結晶粉末，溶解於甲醇、乙醇，丙酮、乙醚等。難溶於氯仿、苯、水。為油脂的抗氧化劑，用於食用油脂與奶油。

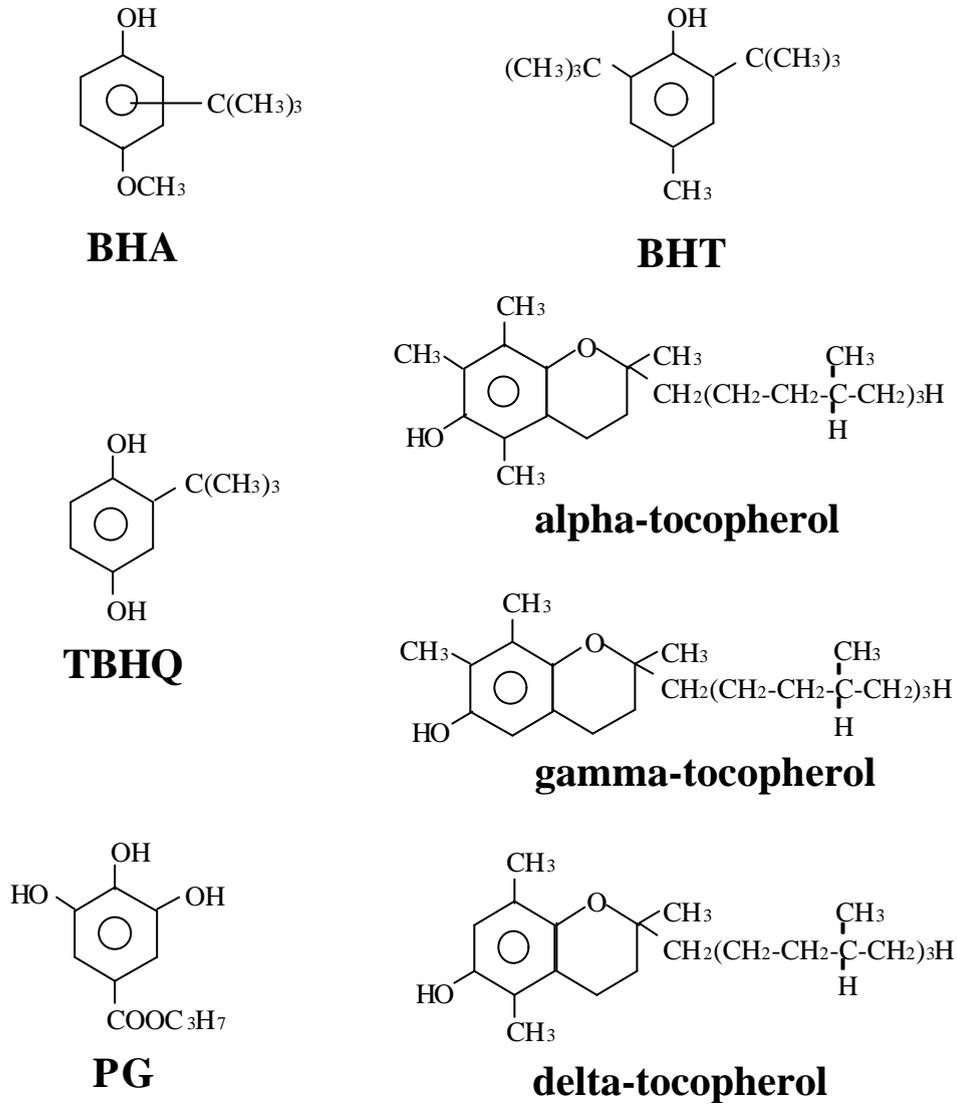
D. 生育醇 (Tocopherol)

為一種天然抗氧化劑，普遍存在於蔬菜、水果與大豆中。是大豆油脫膠過程中的副產物。自然界中以 α 、 β 、 γ 與 δ 四種形態存在，而以 α -form 的抗氧化效果最好。溶於乙醇、丙酮、乙醚、氯仿等，但不溶於水。

(2) 還原劑或耗氧型

A. 維生素 C 棕櫚酸脂 (ascorbyl palmitate)

白色或黃色的結晶狀粉末，具有柑橘的味道，使用量並沒有限制。溶於水、油脂及乙醇中，可作乳化劑使用。常與 α -tocopherol 共同使用，具有相乘效應，可提高抗氧化能力 (Dziedak , 1986)。



圖五、酚類抗氧化劑之種類與其結構

Figure 5. Types and structures of phenolic compounds.

B.亞硫酸鹽 (sulfite)

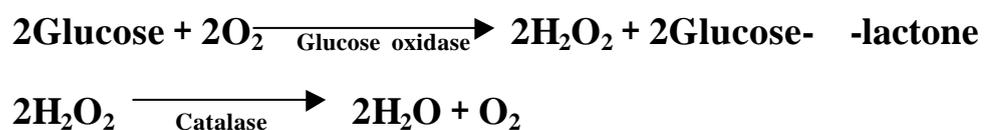
種類包括二氧化硫 (sulfur dioxide)、亞硫酸鈉 (sodium sulfite)、亞硫酸氫鈉與亞硫酸氫鉀 (sodium and potassium bisulfite) 及偏亞硫酸氫鈉 (metabisulfite)。除具抗氧化活性外，具有抑菌功能與防止褐變的效果。不過，1986 年，FDA 已禁止在新鮮蔬果中添加亞硫酸鹽，至於其他食品中之亞硫酸鹽含量則不得超過 10ppm (Dzledak , 1986)。

C.抗壞血酸 (ascorbic acid)

同時具有消耗 O₂ 的功能與還原的能力，與自由基終止型抗氧化劑共用時，可貢獻本身之氫原子給對方，令其還原而能再度使用。Peter 等人 (1990) 發現維生素 E 與維生素 C 共存時，因不停消耗維生素 C 而使維生素 E 得以循環利用。使用量並無限制，最常用於酒類、蔬菜、水果與醃肉中。

D.葡萄糖氧化 (Glucose oxidase)

與觸媒 (catalase) 一起使用，可去除罐頭內之溶氧。主要在防止褐變反應的發生，最常用於蛋粉之製造。目前已有商業化的產品，其作用方式如下所示 (Dzledak , 1986)：



(3) 鉗合劑型

本身並不具備抗氧化功能，但能與促氧化金屬（如銅、鐵等金屬）結合而達到抑制油脂自氧化反應的目的。

A. 檸檬酸 (Citric acid)

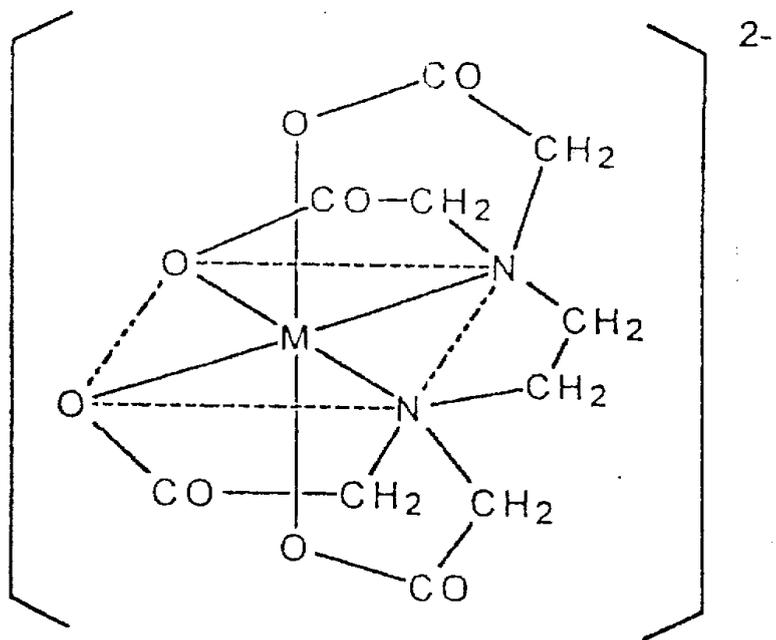
常與抗壞血酸一起使用，可抑制水產品的變色。蝦子體內之酪氨酸 (tyrosinase) 會促使酪氨酸 (tyrosine) 發生氧化而產生黑點。Porter (1984) 研究發現，檸檬酸會與 tyrosinase 結構中的 Cu 離子結合，使其失活，進而達到防止變色反應的發生。除 ascorbic acid 外，亦可與異抗壞血酸或其鈉鹽共同使用。

B. 聚合磷酸鹽 (Polyphosphate)

以短鏈磷酸鹽效果較好，特別是焦磷酸鹽與三聚磷酸鹽的鉗合效果最佳，陳 (1995) 實驗證明，添加 0.5%STPP (sodium tripolyphosphate) 至 MDCM 中，可有效螯合金屬離子降低氧化反應進行。

C. 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)

可與銅、鐵、鋁等離子鉗合，如圖六所示。



(From : Sherwin , 1978)

圖六、EDTA 與金屬離子螯合圖

Figure 6. Structure of chelating formed between EDTA and metal ion.

(三) 尋找天然抗氧化劑

BHA、BHT、TBHQ 這些合成的抗氧化劑雖然能成功延長食品的儲存壽命,維持食品品質,但根據 Johnson and Hewgil(1961) 與 Branen (1975) 的文獻中提及,當 BHT 食入人體後,可能會轉變成有毒物質而危害人體,因此找尋天然抗氧化劑與合宜的萃取方法是未來極需研究的目標。一般依成份來源可以分成植物與動物來源二大部分。

A.植物來源：

目前已在香辛料、茶葉、薰煙中發現各種天然抗氧化劑,另外食品中之維生素 E、C 及 β -胡蘿蔔素(β -carotene) 亦屬天然抗氧化劑。Karpinska 等人(2001) 研究指出,在加工過程中添加香辛料或鼠尾草萃取物(sage) 可延緩氧化反應的發生,且 sage 的抗氧化效果似乎比香辛料更加有效。根據 Chang 等人(1977) 實驗證實,以真空蒸餾法萃取迷迭香中之抗氧化物質,並以 0.02% 添加量添加於各種食用油脂中,具有明顯抗氧化效果。另外,綠茶中的兒茶素(catechin)、薰煙中的酚類化合物(如兒茶酚, catechol) 已被證實有抗氧化活性。維生素 E、C 與胡蘿蔔素等不但有抗氧化之功效,同時能預防疾病(高, 1998)。

B.動物來源：

如動物骨骼肌中由 β -alanine 與 histidine 所組成的天然雙
：肌 (Carnosine) 與甲肌 (Anserine)。Decker and Crum
(1991) 添加 0.5% 肌 至冷凍 (-15) 加鹽絞碎的豬肉中，具
有抑制肌紅蛋白氧化之功效，且對肉色的保護作用比維生素 E 來
的好。同時，添加 carnosine 到未蒸煮、絞碎豬肉中，可有效抑
制油脂氧化酸敗反應的進行。此外，雞蛋也是一個良好的抗氧化
劑來源。新鮮蛋黃中的卵黃磷蛋白 (phosvitin) 加上低密度脂蛋
白表現出強抗氧化性質，而卵白蛋白 (ovalbumin) 之多醣類混
合物亦具有抗氧化性質 (陳，1999)。

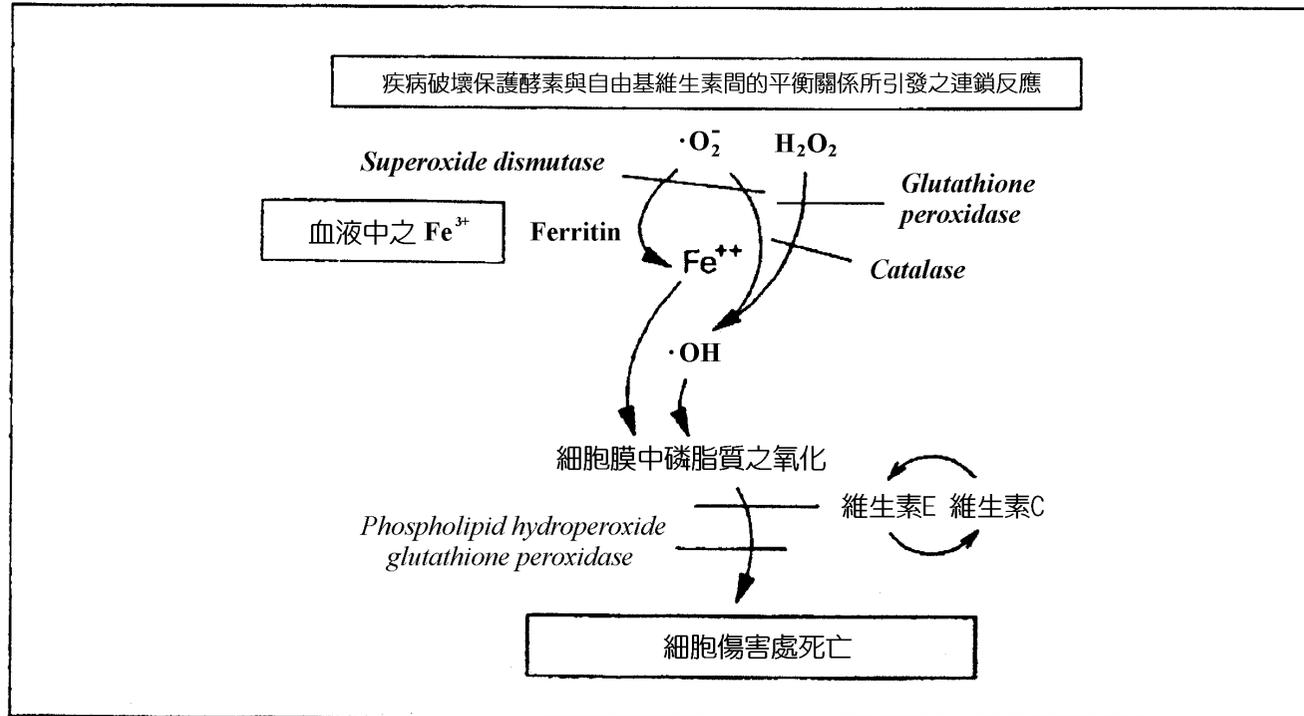
人體內的氧化反應

1931 年 Kharash 與 Mago 發現自由基可導致連鎖反應 (free radical chain reaction)，而揭露了自由基的多變性及其可能造成對人體的破壞性 (許，1999)。Babior (1978) 發現位於白血球細胞膜上之 NADPH oxidase 能自行產超氧自由基 (O_2^-)。人體處於健康狀態時，體內的自由基 (O_2^- 、 H_2O_2 與 HOCl) 與抗氧化劑 Vitamin E、C 及保護酵素 (Superoxide dismutase, SOD 及 Glutathione peroxidase, GSH) 間維持一平衡狀態，但疾病與營養不良會破壞平衡而引發疾病，如發炎、心臟血管或中樞神經系統方面等疾病。圖七的反應機制表示當人體產生病變時， O_2^- 與紅血球中之 Ferritin- Fe^{3+} 作用而轉變成 O_2 、Ferritin 與 Fe^{2+} 。 Fe^{2+} 會引發細胞膜中之磷脂質 (phospholipid) 發生一連串的氧化

反應，最後導致細胞死亡。人體中的 Vitamin E、C 能延緩磷脂質的氧化，而 SOD、GSH 等酵素則可消除 O_2^- 等自由基。

天然抗氧化劑與疾病預防

Pattern 等人 (1990) 提出合理的飲食為每人每天需攝取 3 種蔬菜與 2 種水果，以補充體內維他命 E、C 及胡蘿蔔素等抗氧化劑含量。另外，抽煙與吸二手煙者，體內維生素 C 含量更低，也須由飲食中大量補充。抗氧化劑如維生素 C、類胡蘿蔔素等在理論上能減少心血管疾病，近年來陸續有大規模相關的臨床研究。1996 年 Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS) 追蹤 2002 位經血管攝影證實有冠心病的英國男性病人長達 510 天左右。結果發現每天服用維生素 E 400 至 800 毫克，可以降低再一次產生心肌梗塞的機率達 77%，也可以降低所有主要心臟血管病變達 47%。但值得注意的是服用維他命 E 的功效要累積一年以上才出現 (趙, 1999)。但同年 5 月 Physician's Health Study 大規模研究結果發表，針對 22071 位美國男醫師長達 12 年的胡蘿蔔素添加治療後，卻發現對心血管疾病或癌症均無有益或有害之定論 (王, 1999)。很多人寧可生了病以後吃藥，也不願在事先作預防，預防與治療應是並重的，對於心血管疾病來說，吸菸、高血壓與高血脂的問題應為首要之務，如果有一天抗氧化維他命被證實有用，也應只是一種附加治療，而不是替代治療 (王, 1999)。



圖七、人體內之自由基與氧化反應、疾病生成之關係圖

(From : 高 , 1998)

Figure 7. Relationship between disease and free radical, oxidation of human body.

(四) Histidine-Containing Dipeptide :

Carnosine and Anserine

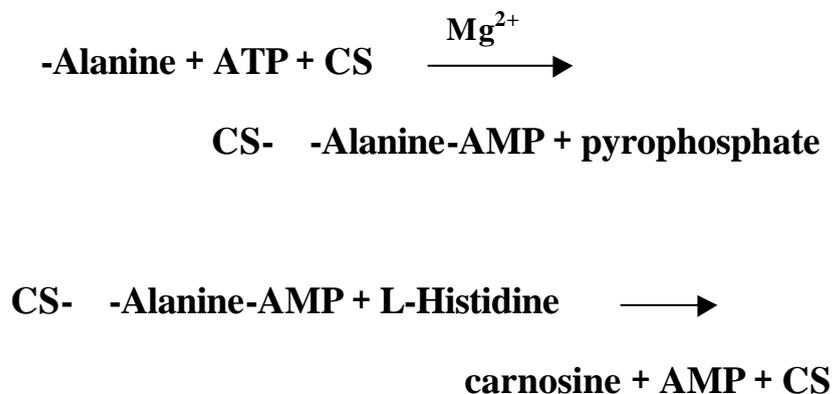
(1) 基本結構與特性

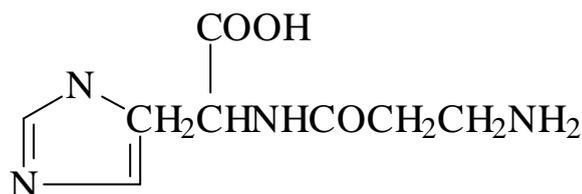
carnosine 與 anserine 為一天然雙肽，主要由 β -alanine 與 histidine 兩種氨基酸組合而成。兩者的差別在於 anserine 其 histidine 上多接上一甲基根（圖八）。

肌酸（carosine）與甲肌酸（anserine），在本世紀初期才被發現出來（Gulevitch 等人，1900）。Crush 在 1970 年代發現此種 Histidine-containing dipeptides 廣泛的存在於骨骼肌中（表一）。

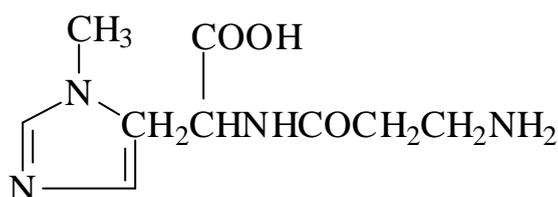
(2) 生化合成途徑

Carnosine 的合成是以 β -alanine 與 histidine 為前驅物質，再經由 carnosine synthetase (CS) 催化而來（Wood and Johnson, 1981）。其合成途徑如下所示：





Carnosine



Anserine

圖八、carnosine 與 anserine 結構式圖

Figure 8. Structure of carnosine and anserine

表二、甲肌 及肌 之特性

Table 2.Characteristics of anserine and carnosine

Characteristics	Anserine	Carnosine
Molecular formula	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₃	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃
Molecular weight	240.261	226.235
Synonym	L-form	L(S), D(R)-form
Source	Vertebrate skeletal muscle	Skeletal muscle Olfactory bulb
Use	pH buffering Antioxidation	pH buffering Antioxidation Olfactory transmission Antiinflammatory agent
Physical description	Cryst. (MEOH aq.)	Needles
Melting point()	240-242	246-250
Dissociation	pK _{a1} 2.64 ; pK _{a2} 7.04;pK _{a3} 9.49	PK _{a1} 2.62; pK _{a2} 6.83; pK _{a3} 9.24

Source: DOC on CD-ROM, 1997

表一、各種動物之骨骼肌中甲肌 和肌 含量

Table 1. Skeletal muscle anserine, carnosine concentration

(mg/100g tissues) of animals

Animal	Muscle source	Anserine	Carnosine
Beef	Topside,rump	52	333
	Shin	77.6	396
Blue whale		0	9
Buffalo	NI	64	572
Cat	Hindleg	293	228
	Gastrocnemius	243	186
Chicken	Breast	1037	400
	Leg	334	124
	Pectoral	927	271
Chum	NI	1273	0
Crab	NI	0	0
Dolphin	NI	0	200
Dog	NI	1474	746
Donkey	Rump	3.0	274
Frog	NI	0	220
	Rectus abdominis	0	226
Giant Oyster	NI	0	0
Sheep	Shoulder and leg	149	111
	Leg	252	190
Siberian salmon	NI	1020	0
Snake	NI	0	0
Sturgeon	NI	0	0
Squid	NI	0	0
Swine	Longissimus dorsi	NR	240
	Shoulder and leg	20	276
	Loin and shoulder	36.4	466
Trout	NI	51.6	0
Turkey	Pectoral	NR	528
	Leg	NR	234
Wallaby	NI	0	0

Note: NI= not identified; NR= not reported. (From : Chan and Decker , 1994)

Anserine 含量方面，Severin (1964) 利用兔子體內 carnosine-C¹⁴ 與 anserine-C¹⁴ 的比例證實 anserine 的合成是由 carnosine 甲基化而來，而且隨著時間的增加，carnosine 的含量慢慢減少，且 anserine 的含量卻慢慢增加。

(3) 吸收與代謝

Carnosine 與 anserine 在人體內的吸收，主要是經由 carnosinase 與 anserinase 等酵素水解成 α -alanine 與 histidine 而被人體所吸收 (Jackson, 1991)。Carnosinase 大多存在於血液、腎臟與肝臟中，而 anserinase 則在肝臟、脾臟、腎臟及心臟中發現。Abe (1991) 注射 carnosine 與 anserine 至鱒魚魚肉中，結果在魚腎臟中發現高量的 histidine 或 1-methyl-histidine，因此推論腎臟似乎是主要進行分解與排泄的器官。Boldyrev 等人 (2000) 則發現 carnosine 經 methylation、decarboxylation 或 acetylation 後，可以增加其對 carnosinase 水解的抵抗力，如此一來便可增加 carnosine 在組織中的壽命 (half-life)，獲得更多抗氧化效果。不過，經過 acetylation 或 methylation 作用的 carnosine 分子，則有可能造成清除自由基能力改變，或反而轉變成促氧化物 (Boldyrev 等人, 1995)。

代謝方面，histidine 與 α -alanine 就如同一般氨基酸代謝途徑最後經由尿液排出體外。不過，Perry 等人 (1967) 卻表示，若攝取大量的 carnosine，則可能將會原封不動的全部由尿液中排出。

(4) 生化特性

A. 緩衝能力 (Buffer Capacity)

由表二中可以看出 carnosine 與 anserine 分別具有 3 個 pKa 值；carnosine 依序為 pK_{a1} 2.62、 pK_{a2} 6.83、 pK_{a3} 9.24，而 anserine 為 pK_{a1} 2.64、 pK_{a2} 7.04、 pK_{a3} 9.49，所以具有極為良好的緩衝能力，能有效維持血液及肌肉中的酸鹼度。Davey (1960) 指出肌肉中的 carnosine 與 anserine 可提供約 40% 的緩衝能力，且在不同的物種（如人、狗、馬）中，其緩衝能力亦不同。

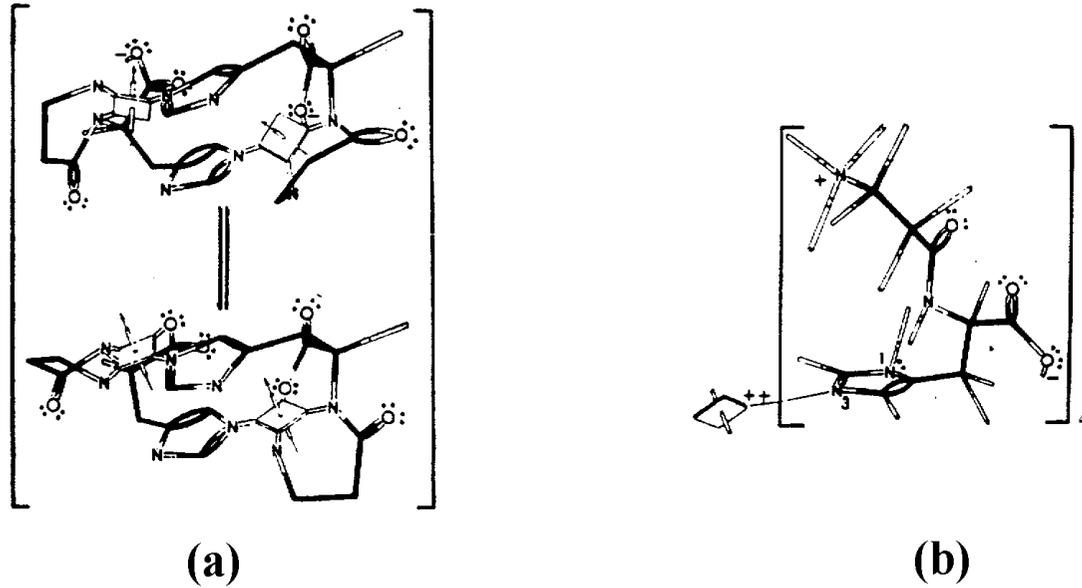
B. 抗氧化活性

Boldyrev 等人 (1987) 測定視網膜中 TBARS 的含量，發現 carnosine 具有保護細胞膜，減緩其氧化速率的功能。carnosine 可藉由抑制由鐵、被 H_2O_2 活化之 hemoglobin、單重氧 (singlet oxygen)、脂肪加氧 (lipoxygenase) 及過氧自由基 (peroxyl radical) 所造成的油脂氧化反應 (Salim-Hanna 等, 1991、Decker, 1990、Kohen 等, 1988)。Decker (1990) 指出，carnosine 的抗氧化能力要一定濃度量才顯現出來 (1–50mM)，且濃度越高，抗氧化能力越強，其主要的抗氧化機制在於螯合金屬離子與清除自由基。

(a) 螯合金屬離子

carosine 具有螯合金屬離子，減緩油脂氧化的功效，但其螯合能力會因螯合的金屬離子不同而有所差異。Decker 等 (1990) 利用 NMR 測定證實 Cu^{2+} 會與 carosine 上 imidazole ring 結合。圖九為 carosine 與銅離子在不同濃度下形成兩種複合物：(1) 當 carosine : Cu^{2+} = 1 : 1 時， Cu^{2+} 會與 carosine 結合在 imidazole ring 上的 N-1 與另一個 carosine 的 -N 位置上，形成兩分子的 carosine 會與一分子的 Cu^{2+} 結合。(2) 當 carosine : Cu^{2+} = 1000 : 1 時，4 分子的 carosine 與一分子的 Cu^{2+} 在 imidazole ring 上形成配位鍵結。Brown 等人 (1979) 亦在 carosine 與鈷 (Co^{2+}) 鍵結中發現相同的情況。

研究顯示在螯合鐵離子方面，以 NMR 測定結果證實 carosine 不會與 Fe^{2+} 形成複合物 (Decker 等人, 1992)。雖然 carosine 不與 Fe^{2+} 螯合，但 carosine 仍可藉由清除自由基的方式來抑制由鐵離子所催化的氧化反應。另一方面，鎳 (Ni^{2+}) 原本對氧與 H_2O_2 的反應性很低，一旦與 carosine 形成複合物時，卻會提高其產生自由基的能力 (Decker, 1992)。



(From : Decker , 1994)

圖九、肌 螯合銅離子形成複合物 (a) carnosine : Cu^{2+} = 1 : 1 (b) carnosine : Cu^{2+} = 1000 : 1

Figure 9. Proposed models of carnosine-copper complexes. (a) Carnosine and Cu^{2+} at equal concentrations; (b) concentration of carnosine is 100 to 1000 times that of Cu^{2+} .

(b) 清除自由基

Chan et al. (1994) 與 Rubtsov et al. (1991) 在 electron paramagnetic resonance (EPR) 上研究結果顯示，carnosine 可藉由提供氫原子或接受自由基等方式，抑制由鐵離子、過氧化氫與 UV 照射所形成 OH 活性，達到減少脂質自氧化反應的發生。

在抑制單重態氧 (singlet oxygen) 方面，原因可能為 carnosine 與 anserine 上 imidazole 基團的的功效。且將 His-¹-Ala-His 轉化成 His-²-Ala 時，亦不會影響其對單重態氧的抑制效果 (Dahl , 1988)。另外，carnosine 與銅離子的複合物可維持超氧歧化 (superoxide dismutase , SOD) 之活性，減少超氧陰離子含量，延長抗氧化效果。但 anserine 與銅離子的複合物卻無此功效，原因可能在於 anserine 其 imidazole ring 上的甲基，會影響妨礙與銅離子的結合，SOD 活性也就跟著降低 (Kohen 等人 , 1991)。Yoshikawa (1991) 研究指出，鋅與 carnosine 的螯合物 “ Z-103 ”，除具有清除由 Fenton reaction 產生的氫氧自由基外，同時可抑制由老鼠大腦與肝臟微粒體 (microsome) 形成的脂質過氧化物。

(5) Carnosine 與 Anserine 之應用 (天然抗氧化劑)

Carnosine 與 anserine 為一種天然雙胺，廣泛存在於動物骨骼肌中。使用上無 BHA、BHT 等合成型抗氧化劑之毒性顧慮 (Johnson and Hewgill, 1961; Branen, 1975)，同時為親水性抗氧化劑，更能使用在一般水溶性環境中，以螯合金屬離子、清除自由基，減緩氧化反應的進行 (Rubtsov 等, 1991; Decker 等, 1990)。當與脂溶性抗氧化劑 (如迷迭香萃取物、 α -tocopherol) 一起使用時，具有加乘作用 (synergism)，抗氧化效果比單一使用時更好，但與水溶性抗氧化劑 (如三聚磷酸鹽) 一起使用時卻無此效果 (Decker 等, 1991)。O' Neill 等人 (1998) 研究 carnosine 與 α -tocopherol 對雞肉脂質氧化反應之影響，結果發現 carnosine 與 α -tocopherol 都具有相當良好的抗氧化作用，且兩者一起使用時效果更好。O' Neill 等人 (1999) 則發現 carnosine 可以有效抑制在雞肉加工過程中，由 NaCl 所催化的脂質或膽固醇氧化反應。

Carnosine 同時也可以保持肉品的色澤安定 (Decker and Crum, 1991)。雖然保護色澤安定的機制尚未完全了解，但可能是因為 carnosine 藉由抗氧化效果，使 myoglobin 中 heme-iron 維持在 Fe^{2+} 狀態下，間接避免 metmyoglobin 的生成。Decker and Crum (1993) 實驗指出添加 carnosine 在蒸煮過加鹽或未加鹽的豬肉中，其抗氧化效果比 BHT 或 α -tocopherol 來的好，且 carnosine 在未蒸煮含鹽豬肉中的抗氧化活性比蒸煮過含鹽豬肉好。這可能是因為 carnosine 在加熱過程中與肌肉中其他成份產

生反應，也可能是因為加熱而導致脂質氧化加快，而使得 carnosine 不活性化。Lee 等人（1999）研究指出，carnosine 在抑制脂質過氧化反應方面比抗壞血酸更為有效，且當兩者一起使用時，可增加肉類產品的保存期限（shelf-life）與保持色澤安定。

Histidine-containing dipeptides 如同一般抗氧化劑，已被成功使用在臨床上，以減少脂質的氧化。研究證實，carnosine 可用來當作消炎劑，並幫助年老造成的白內障水晶體澄清（Boldyrev，1990）。Bogardus 等人（2000）研究指出可藉由 carnosine 與銅離子螯合或其清除自由基的能力，而使低密度脂蛋白（Low-density lipoprotein，LDL）氧化反應速率降低，Decker 等人（1992）亦表示，carnosine 螯合銅離子能力，能大大降低 Cu^{2+} 暴露在不飽和脂肪酸中。鋅與銅，在一般正常情況下，能調整神經興奮狀態，但過多時亦會造成神經毒害（neurotoxicity），並認為與阿滋海默症（Alzheimer）中風等有相關連性（Michelle，2000），而 carnosine 可以具有調節由鋅、銅離子所造成的神經興奮程度，救回所造成神經毒性中的神經元細胞，並建議 carnosine 或許可用來當作內在的神經系統保護劑（endogenous neuroprotective agent）（Boldyrev，2001）。

(6) 日糧對肌肉中 carnosine 濃度之影響

骨骼肌中 carnosine 的含量會受到日常飲食的影響 (Decker , 1994)。若飲食中 histidine 攝取量不足，將會使老鼠肌肉中 carnosine 濃度降低 65% 以上 (Tamaki 等人 , 1984)，顯示 histidine 為 carnosine 合成時的一限制因子 (limit factor)。Easte and Baker (1977) 實驗中添加 0.12% histidine 至豬隻的飲食中，卻發現 carnosine 濃度無明顯的變化，或許是因為實驗中 histidine 添加量或 α -alanine 濃度太低之緣故，而不足以增加骨骼肌中的 carnosine 濃度。然而，大量的 histidine 添加於老鼠飲食中(5%)，則可使老鼠肌肉中 carnosine 濃度提高為原來的 2.8 倍 (Tamaki 等人 , 1984)。

另外，日糧 0.09% carnosine 的添加量，無法使老鼠肌肉中 carnosine 濃度增加，但提升至 15% 時，則可有效增加氧化安定性。由以上種種研究顯示，在日常膳食中添加足夠量的 carnosine 或 histidine，的確可提高肌肉中 carnosine 的濃度，提高的原因是否為與原來的 carnosine 合併，或再度由 histidine 與 α -alanine 合成則不得而知 (Chan and Decker , 1994)。不過，由於 carnosine 的成本過高，而無法當作食品添加物使用，Mei 等人 (1998) 嘗試同時添加 histidine 與 α -alanine 至豬隻飲食中，希望能因此而使豬隻體內 carnosine 含量增高(於體內合成)，氧化安定性增加，以因應 carnosine 價格太高的問題，不過實驗結果卻發現此方法無太大之功效，不如直接添加 α -tocopherol 來的有效。

綜合以上所述，carnosine 與 anserine 實為存在於自然界中的天然抗氧化劑，除具有水溶性性質外，其抗氧化能力更是十分優良。而機械去骨雞肉為禽類加工之廢棄物，亦可說是禽類加工的二次利用，價格低廉，容易取得，因此十分適合用來進行 carnosine 與 anserine 的分取，除增加 MDCM 在加工上之利用價值外，更可分取出具高價值的 carnosine 與 anserine。

肆、材料與方法

一、材料與試藥

1. 生鮮雞胸肉與雞腿肉：購自台中市黃昏市場。
2. 生鮮豬肉（里肌肉）與牛肉（菲力）：購自台中黃昏市場。
3. 冷藏雞胸肉：購自頂好超商東海店。
4. 機械去骨雞肉：購自卜蜂股份有限公司。
5. KH_2PO_4 (Potassium dihydrogenphosphate)：購自昭和化學株式會社。
6. L-Anserine (Nitrate salt)：購自 SIGMA 公司。
7. L-Carnosine：購自 SIGMA 公司。
8. L-Histidine：購自 SIGMA 公司。
9. 1-methylhistidine：購自 SIGMA 公司。
10. Dabsyl-Cl (4-Dimethylaminoazobenzene-4-sulfonyl chloride)：購自 MERCK 公司。
11. DMF (N,N-Dimethylformamide)：購自 MERCK 公司。
12. K_2HPO_4 (Potassium monohydrogen phosphate)：購自 J.T.Baker 公司。
13. NaOH (Sodium hydroxide)：購自臺偉實業有限公司。
14. CH_3CN (Acetonitrile , HPLC Grade)：購自 MERCK 公司。
15. Acetic acid (semiconductor Grade)：購自 Olin 公司。
16. NaHCO_3 (Sodium bicarbonate)：購自 SIGMA 公司。
17. Sulphorpyl(SP) Dowex-2(chloride form)購自 SIGMA 公司。

二、實驗儀器

(一) 肉類樣品處理儀器：

1. 家庭用絞肉機
2. waring blendor
3. 三翼攪拌器 (Heidolph RZR2021)

(二) Dabsyl-Cl 衍生化法：

1. 層析管柱：LiChrospher RP-18 (250-4 , 5 μ m)
2. HPLC Gradating Pump : Kontron (325 system)
3. UV-VIS detector/S-3702 (Soma)
4. Oven : Enshine (super CO-150)
5. Chromato-Integrator : Chromatocoder 21

(三) HPLC 分析儀器：

1. 層析管柱：
 - A. Semi preparative ODS column(250×10mm Nucleosil 100-7 C18, Macherey-Nagrl)。
 - B. VYDAC-analysis (protein and peptide C18)。
2. Pump :
 - A. HPLC Pump (ALCOTT-760)。
 - B. HPLC Gradating Pump Kontron (325 system)。
3. UV-VIS detector/S-3702 (Soma)。
4. Chromato-Integrator :
 - A. Hitachid-2500。
 - B. Chromatocoder 21。

(四) 毛細管電泳分析儀器

1. 65×75 μm I.D. fused silica capillary tube (Polymicro Technologies, Phenix, AZ, U.S.A)
2. 直流電源供應器 : Positive electrode 0~30000V, (Glassman High Voltage, Inc. NJ. U.S.A , Model MJ 309400)
3. Linear 206 偵測器 (Linear Instruments Corporation, Nevada, U.S.A)
4. Chromato-Integrator : Hitachid 2500。

(五) 超過濾裝置

1. Column : Hollow fiber (Specturm , 10KD UF M21S-300-01N)
2. Peristaltic pump : Easy-load (MiniKros , Masterflex I/P , model 77601-10)

(六) 其他

1. 紫外光可見光分光光度計 (Shimadzu, UV2100)
2. 高速冷凍離心機 (HITACHI SCR20B)

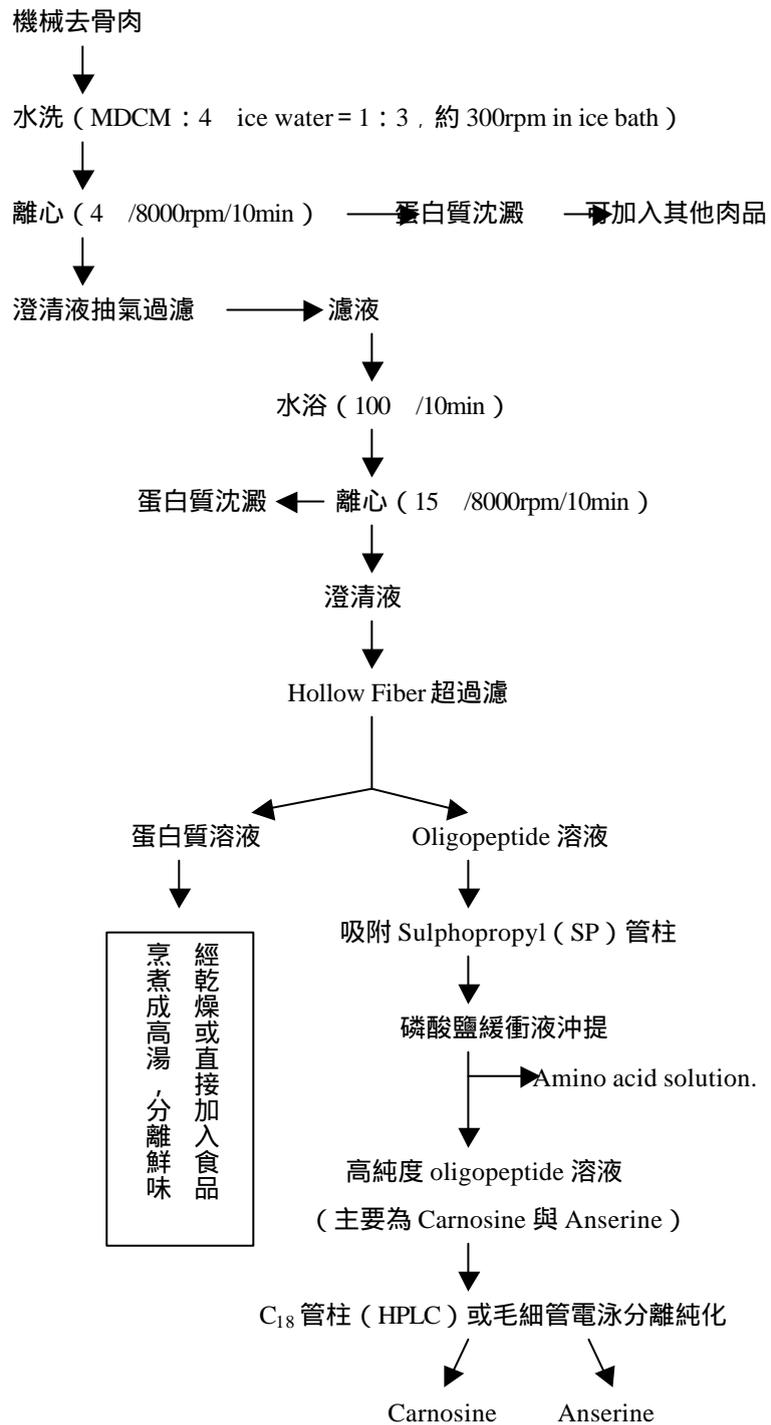
三、實驗步驟

(一) 由肉品中萃取 carnosine 與 anserine

1. 由市場及超市購買生鮮肉品，立即帶回實驗室處理，先切成肉塊後，再以絞肉機絞碎（重複兩次）。雞胸與雞腿肉須先去皮與大部分的脂肪。
2. 取約 50g 的碎肉，加入三倍體積的冰水，於 waring blender 中高速攪打 90 秒。
3. 接下來以高速冷凍離心機離心，去除大部份非水溶性蛋白質（10000rpm/30min/10 ）。
4. 取出上清液，並於 100 ℃ 水浴中加熱 10 分鐘。水浴時加入 stir stone 均勻攪拌。
5. 再以高速離心機離心，去除水溶性蛋白質（10000rpm/30min/10 ）。
6. 取出上清液，用#1 濾紙過濾並測量體積。
7. 將最後所得之萃取液進行毛細管電泳分析。

(二) 由機械去骨雞肉中分取 carnosine 與 anserine

由機械去骨雞肉中製取 carnosine 與 anserine 總流程圖如圖十所示。



圖十、由機械去骨雞肉中分取 Carnosine 與 Anserine 流程圖

Figure 10. Procedure of getting carnosine and anserine from mechanically deboned chicken meat.

1. 機械去骨雞肉前處理：

機械去骨雞肉分胸骨架及全骨架去骨雞肉，採購自卜蜂股份有限公司，以冷凍狀態採購、運送至本實驗室並保存於冷凍櫃中(-20)備用，使用前先將冷凍肉置於冷藏室(4)中解凍約 48hr，解凍後經混合採樣。

2. 水洗液之分取

選用去離子水當水洗液。並調整水洗步驟與條件：機械去骨雞肉與冰水以 1：3 比例混合並以三翼攪拌器攪拌(300rpm, 30min, 於冰浴下進行)，然後以高速離心機離心(8000rpm/10 分鐘/4)，脂質將凝固於離心管壁或浮於液面，非水溶性蛋白質則沉積於底部，此蛋白質可加入其它食品中，繼續使用。

小心傾倒出水溶液，以多層紗布移去上層脂肪，接著以 2 號濾紙過濾澄清液。移至 100 水浴加熱 10min 後，經高速離心除去大部分之水溶性蛋白質(8000rpm/10 分鐘/15)，取出上清液用 2 號濾紙抽氣過濾備用。

3. Hollow Fiber 超過濾：

將水浴後的澄清液以 Hollow Fiber (MW cut off 10000) 超過濾處理。過濾時進口壓力控制在 1 kg/cm^2 ，流量隨管柱阻塞程度而下降，得到澄清 Oligopeptide 濾液，另外經過濃縮的蛋白質溶液，可用來添加到食品中。

4. 管柱吸附濃縮及去除游離鐵質：

將經過 Hollow Fiber 超過濾所得之濾液，以 Sulphopropyl (SP) 管柱吸附濃縮，並除去鐵質。先以 pH6.0 的磷酸鹽緩衝液洗滌管柱 2~5 倍管柱體積，再通入樣品（即濾液）。以 pH6.0 磷酸鹽緩衝液沖提 2~5 倍管柱體積，再以 pH8.5 的磷酸鹽緩衝液洗滌，此時以 Fraction Collector(GILSON FC203) 收集起來，即為高純度的 oligopeptide 溶液。

5. Oligpeptide 之分離

收集之沖提液先以分光光度計 (UNICO, UV-2100 spectrophotometer) 在波長 210nm 下測其吸收值，確定 oligopeptide 溶液的吸光範圍，再以毛細管電泳或高效能液相層析進行分離純化，進而分離出 Carnosine 與 Anserine 並計算其含量。

四、分析方法

(一) MDCM 一般成分

1. 水分、灰分

水分與灰分均參考 AOAC (1984) 方法分析。

2. 粗脂肪

參考 CNS (1978) 方法再修飾之，利用 Soxhlet 回流裝置，並改用石油醚萃取 3 4 小時。

3. 粗蛋白質

以蛋白質快速測定儀 (Kjeltec system 1002 distillating unit) 測定樣品之總氮量，再依下列公式轉換成粗蛋白質含量。

$$\text{粗蛋白質含量 (\%)} = \text{總含氮量 (\%)} \times 6.25$$

4. 碳水化合物

$$\text{碳水化合物} = 1 - (\text{水分含量} + \text{灰分含量} + \text{粗蛋白質含量} + \text{粗脂肪含量})$$

(二) 以毛細管電泳與高效能液相層析法鑑定雙

由實驗中建立以毛細管電泳 (Capillary Zone Electrophoresis ; CZE) 與高效能液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) 之分離雙之最佳分離條件。毛細管電泳裝置簡圖如圖十一所示。

(三) 胺基酸分析法 (Dabsyl-Cl 衍生化法)

主要依據 Knecht (1986) 所提出之方法並修飾梯度移動相：

1. 衍生物置備方法

- A. 取 26mg Dabsyl-Cl 溶於 20ml CH₃CN(4mM Dabsyl-Cl 溶液)。
- B. 取 4.2g NaHCO₃ 溶於 450ml 去離子水中，以 1N HCl 調 pH 值到 8.3, 再定量至 500ml(100mM NaHCO₃ Buffer)。
- C. 取 3.55g Na₂HPO₄ 溶於 450ml 去離子水中，並以 1N HCl

調整 pH 到 7.0，定量至 500ml 後，取其中 100ml 溶液加入 100ml 無水酒精（99.5%）稀釋。

D. 取 25 μ l 標準品（carnosine 與 anserine）置於試管中，再加入 25 μ l 去離子水、50 μ l 的 100mM NaHCO₃ Buffer 與 200 μ l 4mM Dabsyl-Cl 試劑，混合均勻後放於 73 °C 下水浴 12 分鐘。

E. 水浴完，取出並加入 700 μ l Na₂HPO₄ 溶液均勻混合。

F. 取 20 μ l 注入高效能液相層析儀分析即可。

2. Buffer 配製與分析條件

BUFFER

Mobile phase A : 35mM 醋酸鈉緩衝液(pH6.4), 含 4% DMF。

Mobile phase B : 氰甲烷 (CH₃CN)。

分析條件

分析條件與移動相梯度 (Gradient program) 分別如表三與表四所示。

表三、Dabsyl-Cl 衍生化分析條件

Table3. Separating condition of Dabsyl-Cl precolumn method

Column	LiChrospher RP-18 (250-4)
Mobile-phase	Gradient program
Flow rate	1.0 ml/min
Detection wavelength	436nm
Chard speed	2mm/min
Oven temperature	40

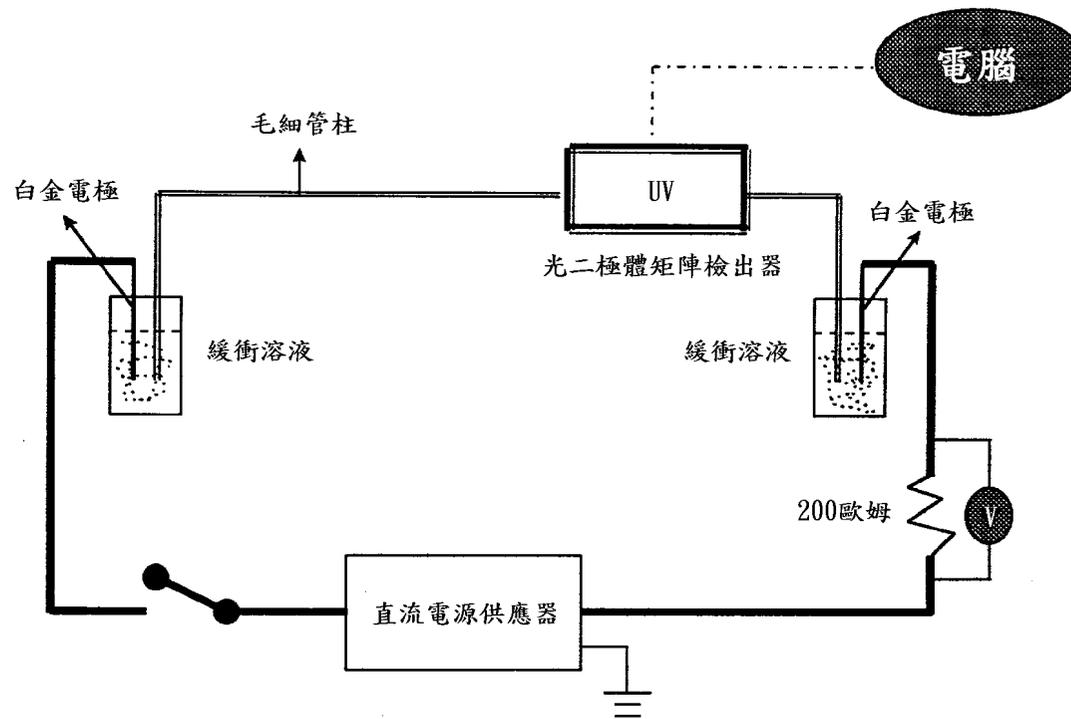
表四、Dabsyl-Cl 衍生化修飾後移動相梯度。

Table4. HPLC gradient program of Dabsyl-Cl precolumn method

Time (min)	Flow rate (ml/min)	Buffer A (%)	Buffer B (%)
0	1.0	85	15
20	1.0	60	40
32	1.0	30	70
42	1.0	30	70
44	1.0	75	15
54	1.0	85	15

Mobile phase A : 35mM CH₃COONa solution (pH6.4), 含 4% DMF。

Mobile phase B : Acetonitrile (CH₃CN)



(From : 林 , 1997)

圖十一、毛細管電泳裝置簡圖

Figure 11. Instrumental set-up of a capillary electrophoresis system.

伍、結果與討論

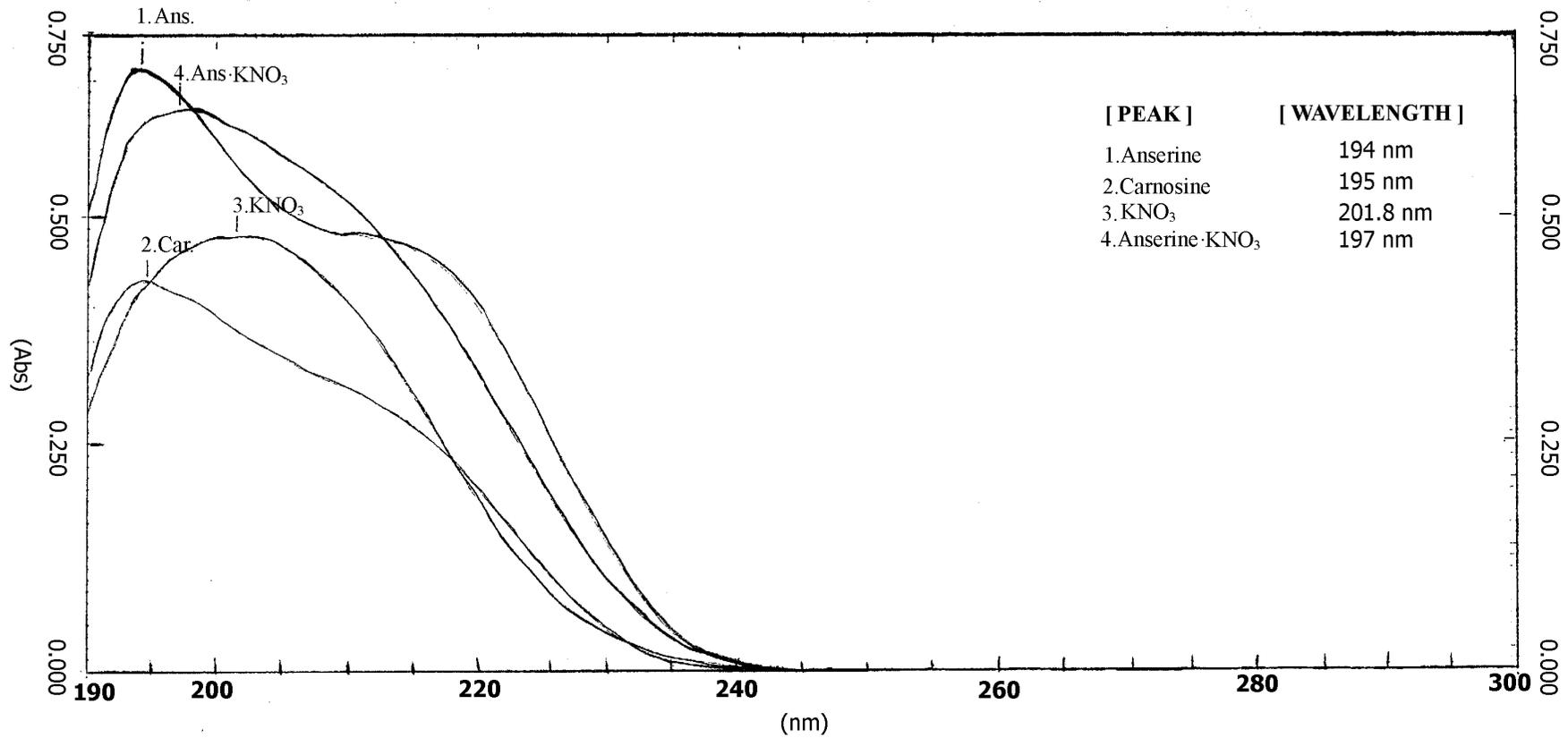
(一) 以毛細管電泳及高效能液相層析法分離鑑定雙

條件之建立

在進行分離條件的建立時，必須先進行 anserine 之純化。由 SIGMA 公司所購得之 anserine 標準品，由於含有硝酸根(NO_3^-)，且其在 201.8nm 下有最大吸光值（圖十二），因此會造成在鑑定分析 anserine 時的誤判與誤差。另外由圖中可以發現，carnosine 與 anserine 的吸光值相當接近（分別為 195nm 與 194nm），增加其在分離上之困難性。純化 anserine 標準品所選用之 Dowex-2 為強陰離子交換樹脂（Strong anion exchanger），經由 pH 2.0 去離子水沖洗後，當含有硝酸根的 anserine 通過樹脂時，可與帶有負電荷的硝酸根離子進行離子交換而達到純化之目的，然後分別將未經純化及經過純化處理之 anserine 注入高效能液相層析儀中定量（圖十三）。

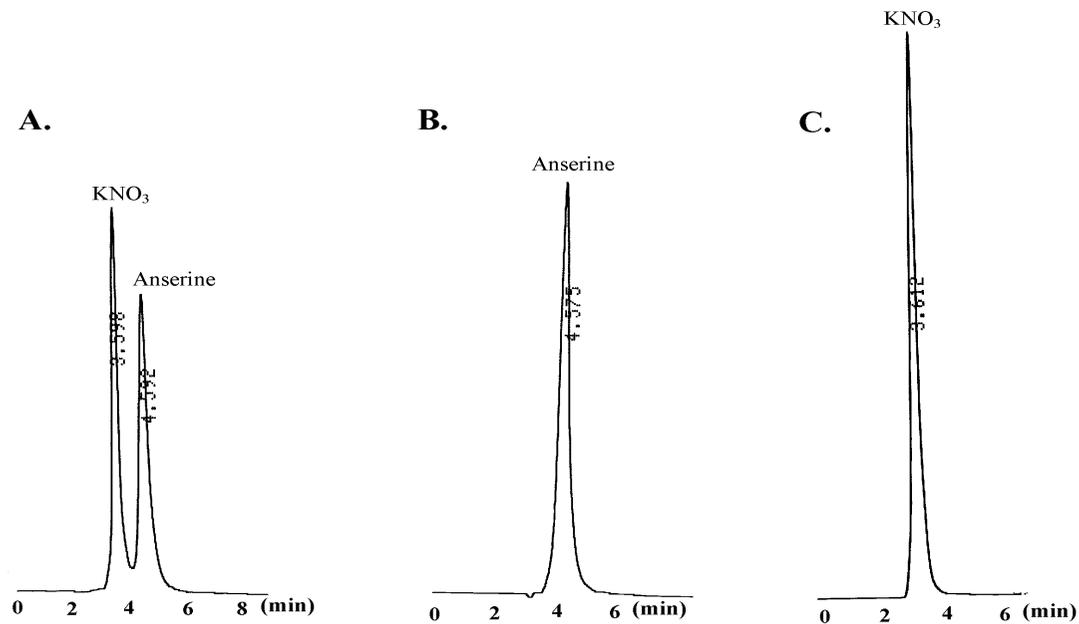
圖十四為應用分析型 ODS 管柱高效能液相層析儀分離鑑定 carnosine 與 anserine 混合層析圖。圖中應用本實驗所開發出來之最佳分離條件，可使 carnosine 與 anserine 達到基線式分離，且滯留時間（retention time）短，分離效果良好。

實驗中亦曾嘗試使用高效能液相層析經 Dabsyl-Cl 衍生化之胺基酸分析法（Dabsyl-Cl precolumn labeling/HPLC method）來分離 carnosine 與 anserine（圖十五）。此方法為根據 Knecht（1986）



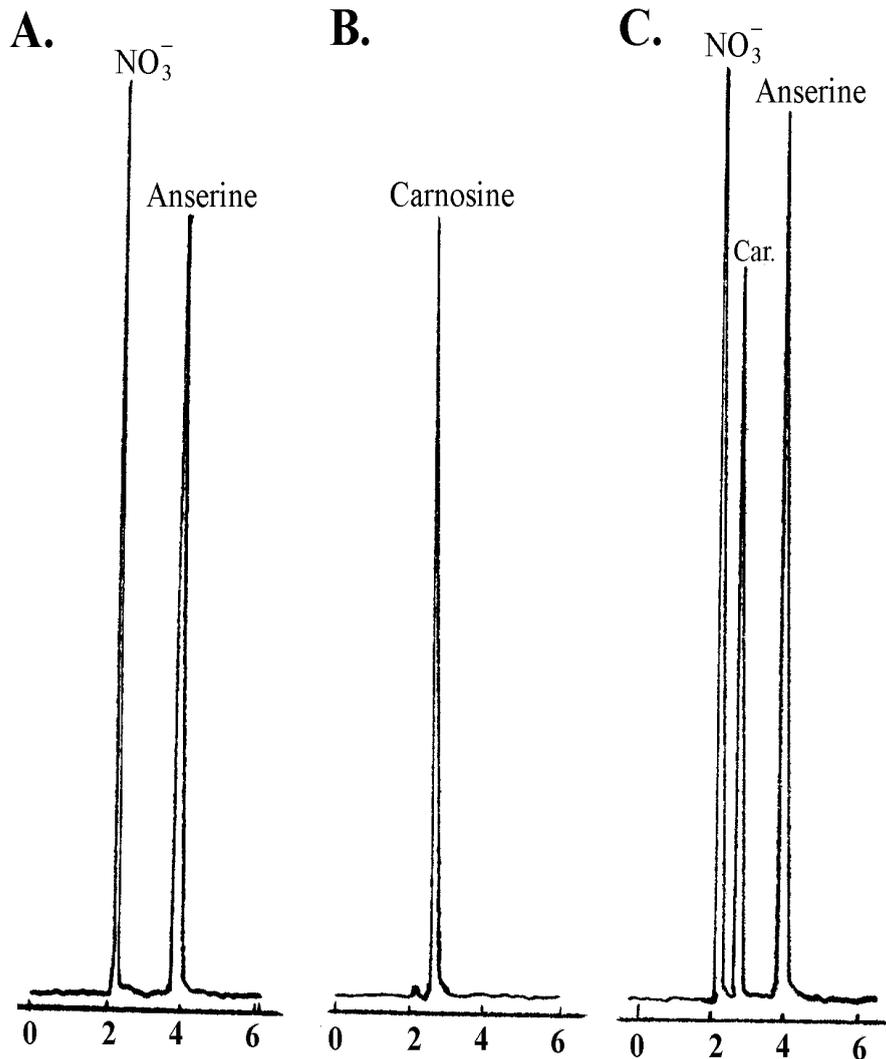
圖十二、Anserine、carnosine、KNO₃與 anserine (Nitrate salt) 之紫外光光譜掃描圖

Figure 12. UV-Visible absorption spectra of anserine, carnosine, KNO₃ and anserine . KNO₃.



圖十三、Anserine 標準品未經處理及經純化後之高效能液相層析圖 (A) 原始 anserine (B) 純化後之 anserine (C) KNO_3

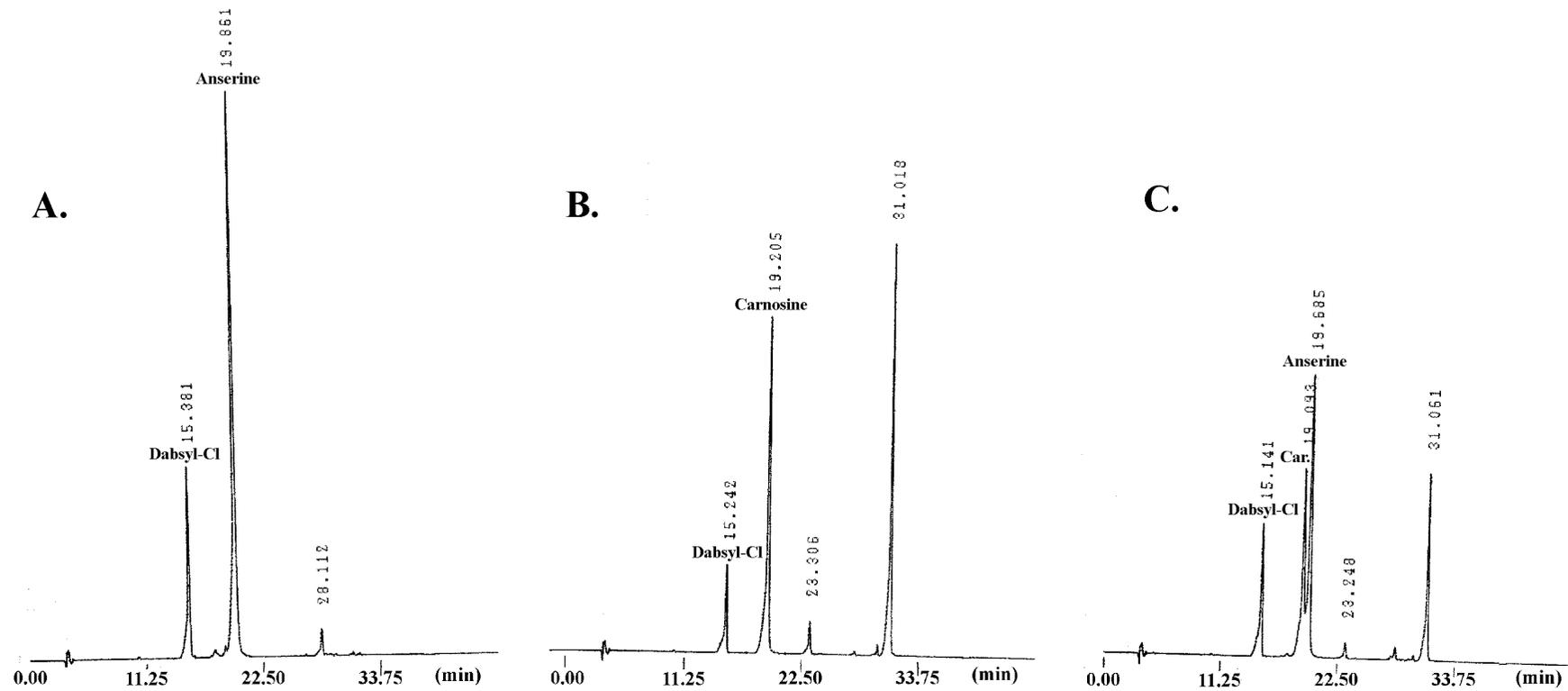
Figure 13. Chromatography of unpurify and purify anserine by HPLC with analysis column. (A) unpurify anserine (B) purify anserine (C) KNO_3 . Separating condition: Vydac RP-18 column (for protein and peptide). Mobile phase: 50mM KH_2PO_4 , pH7.0. Flow rate: 1ml/min. Detection wavelength: 200nm



圖十四、應用分析型管柱所進行之雙 高效能液相層析圖

(A) anserine 含硝酸根 (B) carnosine (C) coinjection

Figure 14. Chromatography of carnosine and anserine by HPLC with analysis column. (A) anserine with KNO_3 (B) carnosine (C) Coinjection. Separating condition: ODS column (MERCCK LiChroCART 250-4,RP-18). Mobile phase: 50mM KH_2PO_4 , pH7.5. Flow rate: 1ml/min detection wavelength: 210nm



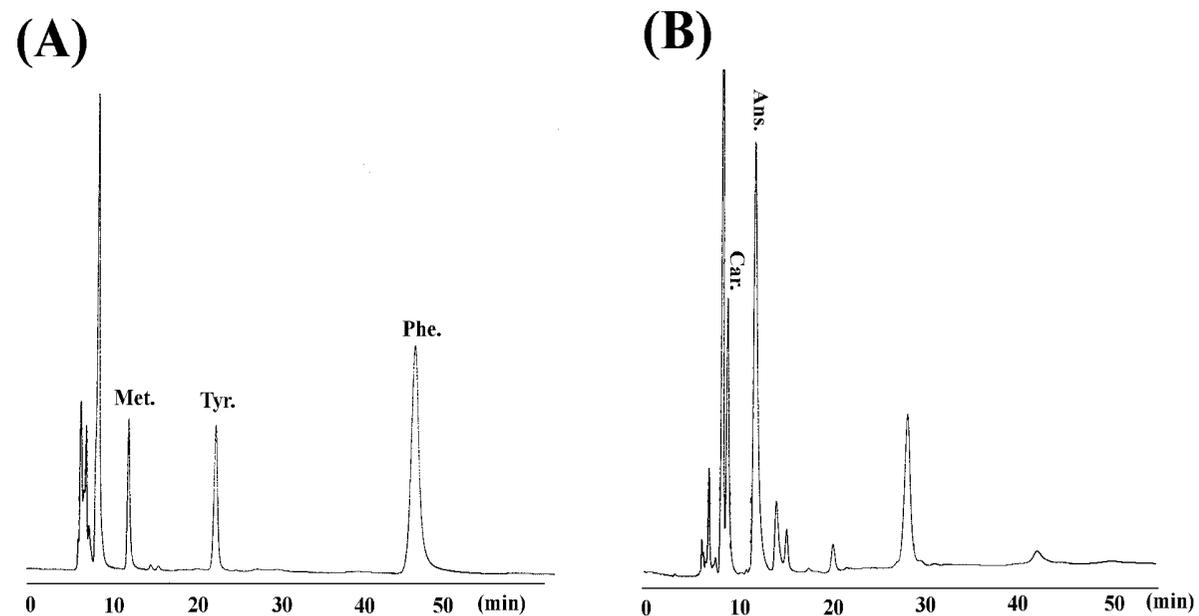
圖十五、雙 利用 Dabsyl-Cl 衍生化之高效能液相層析圖 (A) anserine (B) carnosine (C) coinjection.

Figure 15. Chromatograms of HPLC separation of DABS-dipeptide (A) anserine (B) carnosine (C) coinjection

所發表之衍生化胺基酸測定法原理，再經修飾梯度移動相後所進行之衍生化分析。衍生化胺基酸測定法具有靈敏度高（可偵測到 pico-mole）、基線平穩以及在可見光下偵測（436nm）等優點。不過缺點為衍生化試劑（Dabsyl-Cl）的含量必須為所分析的胺基酸含量四倍以上，即在進行分析時之前，必須先大約了解樣品中蛋白質及水解後胺基酸含量，且實驗中過量的鹽類（如 urea, SDS, phosphate 與 ammonium bicarbonat 等）將會改變緩衝液的 pH 值，進而影響衍生化的程度與效果（Chang, 1986）。其次，衍生化程度是否完全、衍生物的安定性，以及過多的未知 peak (ghost peak) 等因子，亦為其缺點之一。由圖中可發現除了有未知 peak 外（可能為標準品與 Dabsyl-Cl 試劑的副產物），同時 carnosine 與 anserine 之滯留時間過於接近而部份重疊在一起，分離效果不佳。

Bidlingmeyer 等人（1987）曾利用 phenylisocyanate (PTC) 試劑與胺基酸形成穩定衍生物後，再用 HPLC 來偵測微量胺基酸。但亦有衍生物的安定性與衍生化程度不均，且胺基酸之 peak 重疊而無法達到分離效果（arginine 與 carnosine 重疊，以及 1-methylhistidine 與 anserine 重疊）等問題，同時相對遲滯時間亦較長（約為 26-38 分鐘）。本實驗所使用的半製備型管柱高效能液相層析法，步驟簡單，樣品不須經過衍生化，可避免衍生化程度不均或衍生物不安定等問題，同時相對遲滯時間較短（約 10-15 分鐘），分離效果良好（圖十六）。

Charles（1966）則利用分光光度計法（spectrophotometric）偵測兔肉中 carnosine 與 anserine 含量。原理為 carnosine 與



圖十六、不同樣品之高效能液相層析圖

(A) 混合胺基酸注射圖 (B) MDCM 經超過濾後之高效能液相層析圖

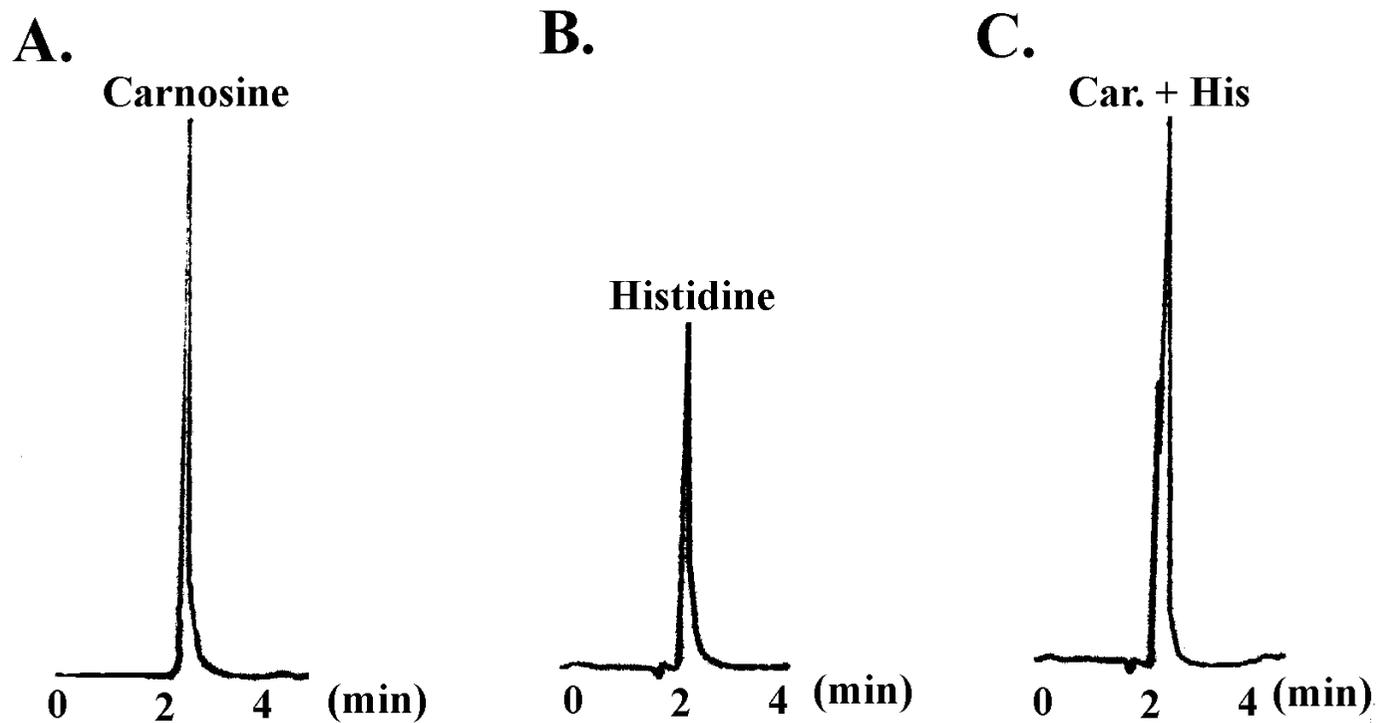
Figure 16. Analyze different samples by HPLC

(A) mixed amino acids (B) filtrate after ultrafiltration

The mixed amino acids include alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cysteine, glutamic acid, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, thryptophan, tyrosine, valine, 1-methylhistidine and -alanine. Separation condition: Semi preparative ODS column (250×10mm Nucleosil 100-7 C18, Macherey-Nagrl), Mobile phase: 50mM KH₂PO₄, pH8.0, Injection volume:20 μ l, Detection wavelength: 210nm

diazotized α -bromoaniline 作用時會產生紅色，以及 fluorodinitrobenzene(FDNB)與 carnosine 或 anserine 反應時產生黃色，再由分光光度計偵測 430nm 時的吸光值，判定 carnosine 與 anserine 在兔肉中之含量。此方法好處在於反應快速，設備簡單，不像一般傳統液相層析法需要太多的時間，但仍有其使用上之限制。缺點在於樣品中的其他物質（如 adenine nucleotides，creatine 及 creatine phosphate 等）也會與試劑作用而產生反應，影響實驗結果。另外，樣品中 carnosine 與 anserine 含量亦要足夠，才不致影響分析結果。總 carnosine 與 anserine 含量必須要比總胺基酸含量多七倍以上，否則鹼性胺基酸（如 arginine，histidine，lysine）會與 FDNB 試劑反應呈色；當 carnosine 之濃度小於 2mM 時，histidine 與 tyrosine 則會與 α -bromoaniline 試劑作用。因此，此方法只能應用在 carnosine 與 anserine 含量夠多的樣品，對一些含量少的肌肉（如蛇、魚類）而言，以上可能產生的問題則會導致實驗嚴重誤差。

實驗中亦發現，應用分析型管柱進行 carnosine 與氨基酸（Histidine）之分析時，其 peak 會重疊在一起無法分離（圖十七）。此項誤差將導致定量上之差異，不過，可利用一些簡單之分離方法，先將樣品萃取液中之 histidine 去除，如應用離子交換樹脂，如此一來將不至於影響 carnosine 與 anserine 在樣品中定量的問題。Dunnett (1997) 利用高效能液相層析法結合梯度移動相與衍生化法（ α -phthalaldehyde，OPA 呈色劑），再用螢光偵測器測定（fluorescence detection）來偵測分離馬與駱駝肌肉中的



圖十七、應用分析型管柱所進行之肌 與氨基酸高效能液相層析圖 (A) Carnosine (B) Histidine (C) Coinjection

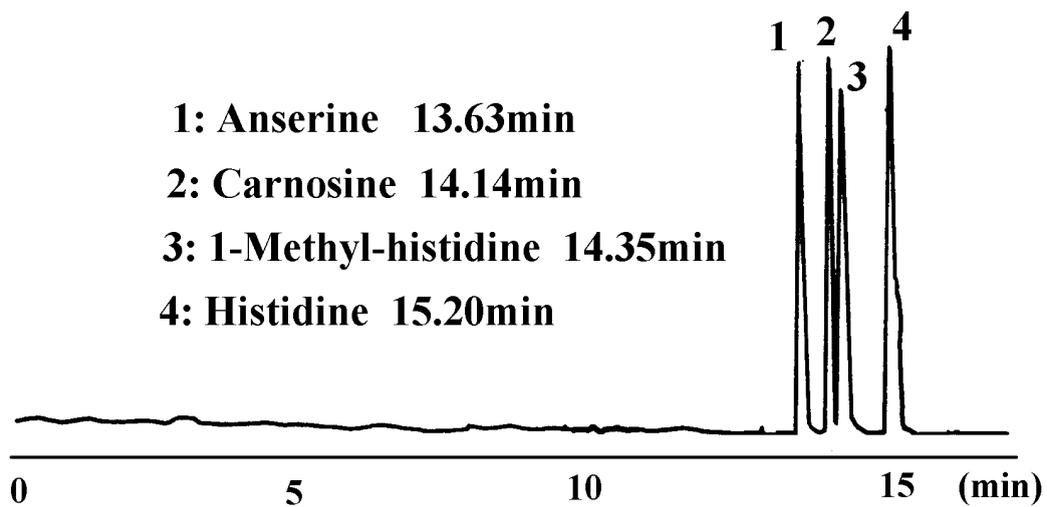
Figure 17. Chromatography of Carnosine and amino acid by HPLC with analysis column. (A) carnosine (B) histidine

(C) coinjection. Separating condition: Nucleosil analytical column. Mobile phase: 50mM KH_2PO_4 , pH7.0.

Flow rate: 1ml/min. Detection wavelength: 210nm

imidazole dipeptides , 包括 histidine、 1-methylhistidine 與 3-methylhistidine。螢光偵測器其敏感度約為紫外光偵測器之 100 倍，因此只需其百分之一的樣品量即可進行分析，實驗中所使用的方法能有效將樣品中 imidazole dipeptides , 包括 carnosine 與 anserine , 分離開來。不過，與其他應用衍生化高效能液相層析法相同的問題在於衍生化時的安定性與完全與否須小心控制，其次，螢光偵測靈敏度器雖然比紫外光偵測器高，但價格也比紫外光偵測器貴許多，一般實驗室或工廠或許並無此預算之考量，而寧願選擇設備較便宜，方法較簡單的分析方法。

在毛細管電泳分析條件的建立方面，根據 Issaq 等人 (1992) 與蔣 (1999) 之分離條件為基礎，調整後進行毛細管電泳分析。圖十八為應用所開發最佳分離條件進行 imidazole dipeptides (包括 carnosine、 anserine、 1-methylhistidine 與 histidine) 分離之毛細管電泳圖。分析結果良好，達到基線式分離，其順序依序為 anserine、 carnosine、 1-methylhistidine 與 histidine。值得注意的是，之前應用分析型管柱進行高效能液相層析時，無法有效分離的兩種 dipeptides , carnosine 與 histidine , 在所應用的毛細管分離條件中可以達到良好的分離效果。毛細管電泳之分離原理為帶電離子在毛細管中淨移動速率的差異來達到分離效果。Histidine 其 side chain 的 pKa 值為 pH6.0 , carnosine 為 pH6.83 , 在 pH 值 7.0 的磷酸鹽緩衝液中進行電泳時，carnosine 所帶的正電荷量比 histidine 多，泳動力較大，因此 carnosine 的分析時間 (migration time) 會比 histidine 短。而 anserine 其 side chain 的 pKa 值為 7.04 ,



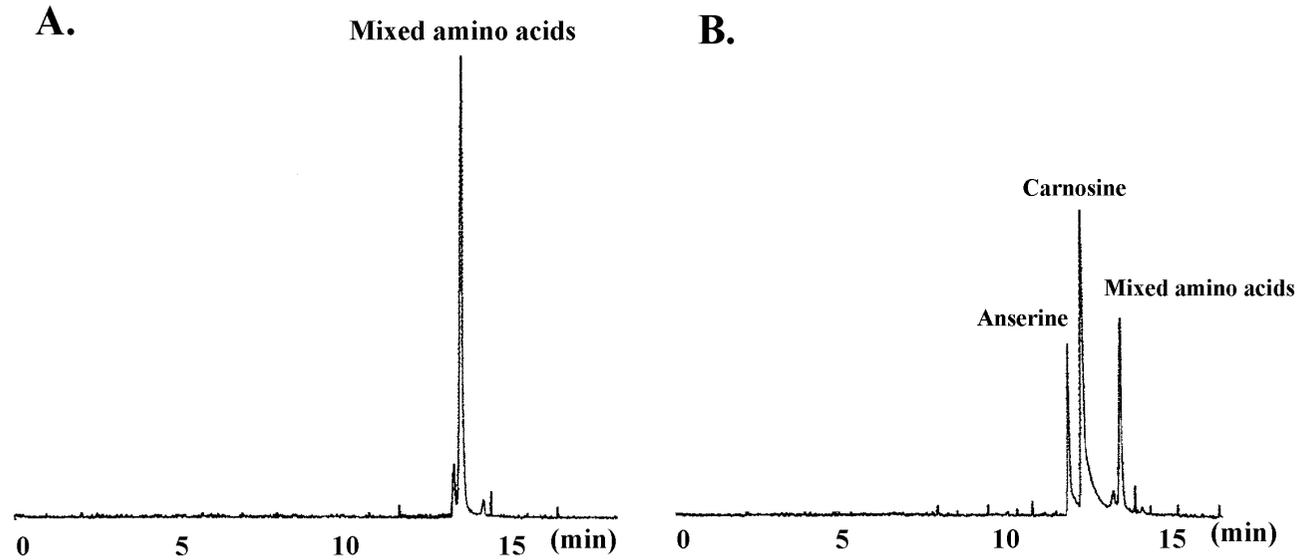
圖十八、四種標準品之毛細管電泳圖

Figure 18. Capillary electropherogram of mixed standards including anserine, carnosine, 1-methylhistidine and histidine. Separation condition: 65cm fused-silica capillary tube and window is 10cm to the end. Running buffer is 25mM KH_2PO_4 , pH 7.0. Voltage use positive electrode 9KV. Electronic injection time: 2 sec and detection wavelength at 200nm

在 pH 7.0 的緩衝液中進行分析時，所帶的正電荷量比 carnosine 多，因此能輕易分開。

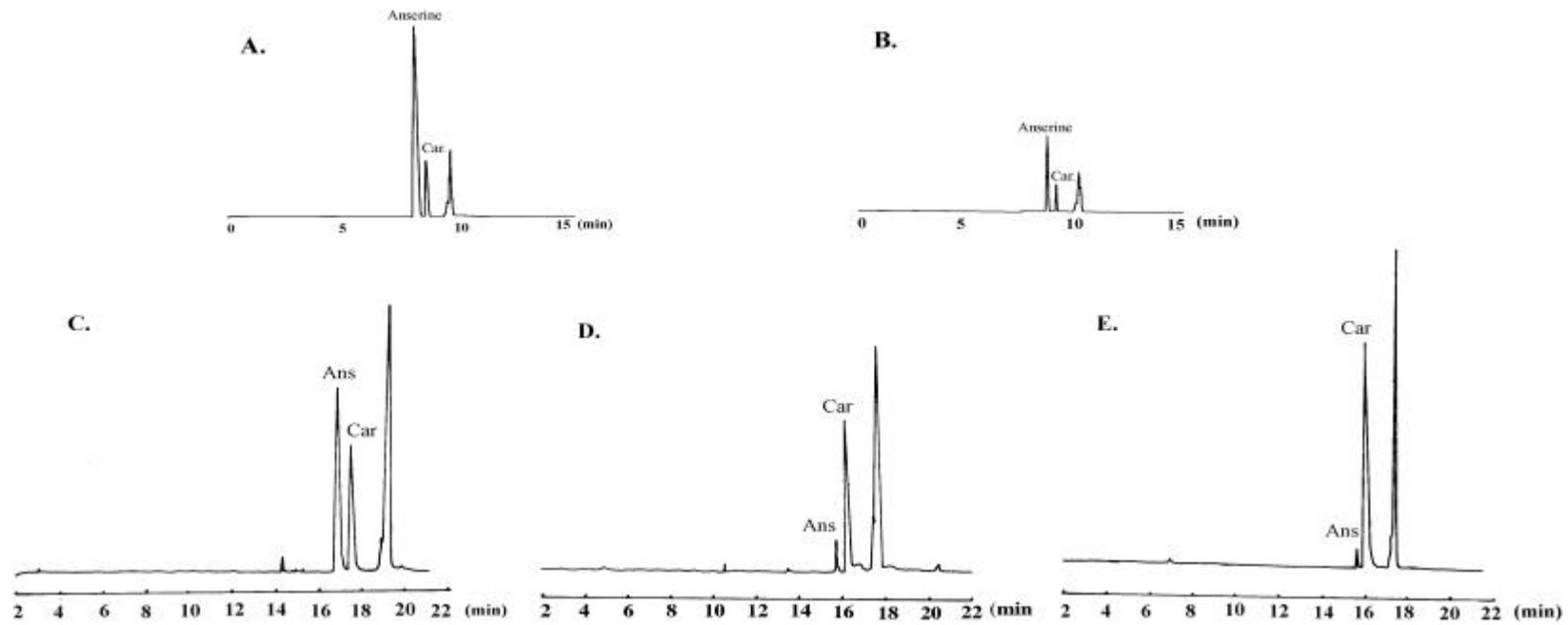
圖十九為應用上述分離條件所進行之 dipeptides 與混合氨基酸共注射毛細管電泳圖。結果顯示，毛細管電泳在 dipeptide 與 amino acid 的分離純化上，能有效的將 carnosine、anserine 與其他氨基酸分離純化出來，分析效果佳，亦不會有 peak 重疊的問題，可避免定量與定性上的誤差。

圖二十為應用毛細管電泳分離鑑定現宰雞肉、冷藏雞肉、生鮮豬肉與牛肉中 carnosine、anserine 含量。結果顯示，毛細管電泳能有效將兩者分離開來，成功的應用在鑑定肉品中 carnosine 與 anserine 的分離與定量。表五為所測定各種肉品中，其 carnosine 與 anserine 含量一覽表。其中值得注意的是，由於萃取過程中經過高速離心、100℃ 水浴加熱後再度離心等步驟，移除蛋白質沈澱物時，亦會移去其中包含的水分，部份 carnosine 與 anserine 便因此流失而未估算到。沈澱物水分中 carnosine 與 anserine 之濃度應與所測定出來的萃取液中濃度相同。在進行含量計算時，必須將此部份未測量到的雙倍含量一併納入計算，以盡量合乎實際含量。結果顯示，現宰雞胸肉、現宰雞腿肉、冷藏雞胸肉、生鮮牛肉與生鮮豬肉中 carnosine 含量 (mg/100g tissue) 分別為 153.8、38.45、423.72、359.43 與 581.04；而 anserine 含量 (mg/100g tissue) 分別為 849.37、151.33、529.28、63.24 與 40.47。此結果與 Chan and Decker (1994) 所統計各種動物骨骼肌中 carnosine 與 anserine 含量有相同之趨勢。在雞肉方面，anserine 均高於



圖十九、雙 與混合胺基酸之毛細管電泳圖 (A) 混合胺基酸 (B) Dipeptides 與胺基酸混合注射圖

Figure 19. Capillary electropherogram of dipeptide and amino acids. (A) Capillary electropherogram of mixed amino acids. (B) Coinjection of dipeptides and mixed amino acids. The mixed amino acids include alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cysteine, glutamic acid, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, thryptophan, tyrosine, valine, 1-methylhistidine and -alanine.



圖二十、不同肉品之毛細管電泳圖

(A) 現宰雞胸肉 (B) 現宰雞腿肉 (C) 冷藏雞胸肉 (D) 生鮮豬肉 (E) 生鮮牛肉

Figure 20. Capillary electropherogram of meats.

(A) Fresh chicken breast (B) Fresh chicken leg (C) Freeze chicken breast (D) Fresh pork (E) Fresh beef

Runing Buffer:A and B : 50mM KH_2PO_4 , pH 7.0 ; C, D and E : 25mM KH_2PO_4 , pH 7.0

表五、各種肉品中 carnosine 與 anserine 含量一覽表

Table 5. Concentration of carnosine and anserine from kinds of meats

	肉重 (g)	水分含量 (%)	水添加量 (ml)	萃取液 (ml)	Ans 含量 (mg/ml)	Car 含量 (mg/ml)	萃取液中 Anserine 含量 (mg/100g tissue)	萃取液中 Carnosine 含量 (mg/100g tissue)	原料肉中 Anserine 含量 (mg/100g tissue)	原料肉中 Carnosine 含量 (mg/100g tissue)
現宰 雞胸肉	50.73	77.0	152.19	136.12	2.253	0.408	604.53	109.47	849.37	153.80
現宰 雞腿肉	50.13	73.7	150.39	151.46	0.405	0.103	122.36	31.09	151.33	38.45
冷藏 雞胸肉	50.01	77.0	150.03	120.16	1.404	1.124	337.34	270.06	529.28	423.72
生鮮牛肉	50.01	72.1	150.03	152.06	0.177	0.966	51.68	293.70	63.24	359.43
生鮮豬肉	50.04	68.0	150.12	147.14	0.119	1.579	32.34	464.29	40.47	581.04

carnosine 含量數倍,且雞胸肉中 carnosine 與 anserine 含量比雞腿肉來的高。冷藏雞胸肉 anserine 含量比現宰雞胸肉來的低,原因可能為雞隻由肉品加工廠宰殺、分切、冷藏後再運送至經銷處販賣過程中,溫度的變化與滲出液的流失均有可能造成含量上的誤差,牛肉與豬肉中雙 的含量則是 carnosine 含量較高。不過,實驗中所測定各種肉品中雙 的含量,與 Chan and Decker (1994) 所統計的數值有所出入,原因可能在於所使用的樣品萃取流程、分析方法與條件、肉品品種不同所致,而飼養時的方式、飼料、環境、年齡、性別等亦會造成肉品的組成上的差異 (Monin and Ouali , 1991)。

高效毛細管電泳(High Performance Capillary Electrophoresis , HPCE) 可看作是電泳的一種儀器化方式。依照基本操作方式的不同而區分成毛細管區帶電泳(CZE) 膠束電泳色譜(MEKC) 毛細管凝膠電泳(CGE) 毛細管等電聚焦(CIEF) 與毛細管等速電泳(CITP) 等方式 (惠普 , 1993)。Alexander (1999) 研究 CGE 與 SDS PAGE 方法在偵測新鮮豬肉萃取物上之差異。結果發現,與傳統 SDS PAGE 電泳相比,CGE 具有在膠體製備上、樣品的應用性、最終蛋白質區帶的染色及定量、比傳統電泳高 10~100 倍的電場強度卻不致產生有害的焦耳熱影響等優點,另外在分析方面還具有樣品需求量少、儀器全自動化、操作簡單、分析速度快、在毛細管中即可進行偵測 (on-capillary detection) 的特性。本實驗所使用的毛細管區帶電泳(CZE), 是目前所有毛細管電泳中最簡單最普遍的一種毛細管電泳方式 (惠普 ,

1993)。在所使用的毛細管內只充入緩衝溶液，溶質以不同速率在分立的區帶內進行遷移而被分離開來(陳 ,1996 惠普 ,1993)。

由上述實驗結果證實，本實驗所開發出來的毛細管與高效能液相層析分離條件，可有效將樣品中 carnosine 與 anserine 分離開來，再配合 carnosine 與 anserine 在動物骨骼肌中含量固定，不同物種其含量比例不同且不易受烹調加熱而破壞等特性 (Carnegie 等人 , 1983)，即可進行肉品是否摻假之鑑定。例如牛肉中， $\text{carnosine} / \text{anserine} = 5.5 \sim 6.8$ ，袋鼠肉中 $\text{carnosine} / \text{anserine} = 0.14 \sim 0.26$ ，而當兩者以不同比例混合時， $\text{carnosine} / \text{anserine} = 0.96 \sim 2.3$ (Carnegie 等人 , 1985)。

英國食品標示準則 (the UK Food Labelling Regulation , 1996) 規定任何食品或食品添加物只要經過任何加工或處理後，有關於加工、如何處理的參考資料都要清楚的標明，包括方法、成份及參考資料等，只要標示錯誤或不完全，就有可能誤導消費者(Day , 2001)。此項規則被認為將應用在機械去骨雞肉上，因此許多學者開始進行辨別 MDCM 與 HDCM 的方法開發。包括測定兩者在化學成份上的組成測定、SDS PAGE 平板膠電泳、顯微鏡法與免疫學 (ELISA) 等方式 (Patterson et al. , 1995 ; Richardson et al. , 1995 ; Pickering et al. , 1995 ; Griffin et al. , 1995)。結果顯示，在化學組成分析上 MDCM 與 HDCM 並無明顯區別，SDS PAGE 電泳法分析上，則是利用不同蛋白質含量上的差異為依據進行區分，不過，當混合 MDCM 與 HDCM 後，此種分析法便失去其應用性。

顯微鏡法則是觀察 MDCM 特有的透明軟骨 (hyaline cartilage)。Hyaline cartilage 是一種生長在骨骼旁邊的軟骨，組成為膠原蛋白纖維(collagen fiber)包住 cartilage cells(chondrocytes)後，外面再環繞一層 mucopolysaccharide。當骨骼發育時，便會慢慢鈣化(ossified)而消失。在經去骨過程中，受到擠壓剪切力，骨頭破碎而流失到 MDCM 中，但 HDCM 因處理方式不同而無此構造。不過，很可惜的是此方法只能用來當作快速篩檢法 (screening method)，而無法進行定量。免疫法則是利用抗原與抗體間專一性，進行酵素連結免疫分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay , ELISA)。此方法檢測快速，但在抗血清 (antiserum) 的選擇上須十分小心，且所選用的抗體目前只能針對去骨雞肉與去骨火雞肉有較好的功能性 (反應性)，其他種類的機械去骨肉則功能性不佳，混合比例上亦要超過 50% 才會準確，應用性與普遍性仍須加強。Day and Brown (2001) 則是利用毛細管凝膠電泳進行機械去骨雞肉的測定。原理為 MDCM 在去骨過程中，骨頭破碎，骨髓中大量的 hemoglobin (Hb) 流入肉漿中，因此 MDCM 比 HDCM 具有更多的 hemoglobin 含量，再利用 hemoglobin 與 myoglobin 的含量比例之不同而區分出 MDCM 與 HDCM。同時可以偵測區分出低比例混合的 MDCM 與 HDCM (0 - 7.5%)。

任何一種分析法都有其優缺點，不過重要的是分析法的應用性與實用性。綜合以上所述，本實驗中所開發之毛細管與高效能液相層析法，能成功的應用在肌肉中雙 的分離與定量，方法

簡單快速，操作容易，分析效果好，以及溶劑使用量少（只有 KH_2PO_4 ）等為其優點，可作為學者將來研究上的參考。

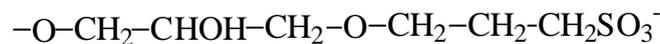
（二）由機械去骨雞肉中製取 carnosine 與 anserine

1. 一般成分

圖二十一為機械去骨雞肉一般組成分析圖。其中水分含量約為 69.4%，粗脂肪與粗蛋白含量分別為 13.66% 與 15.56%。灰分佔 0.97%，而總碳水化合物佔 0.41%。此結果與戴(1994)所測得數值接近但稍有差異（其所測得粗脂肪與粗蛋白質含量分別為 11.33% 與 16.7%），原因在於戴所使用的機械去骨雞肉為自行加工去骨製造而成，本實驗之原料則是直接向廠商購得。許多因素均會使 MDCM 成份改變，如雞隻種類、骨架部位、去骨機設定等。

2. 管柱吸附濃縮與去除鐵質：

本實驗採用強陽離子交換樹脂：Sulphopropyl (SP) 其結構式為：

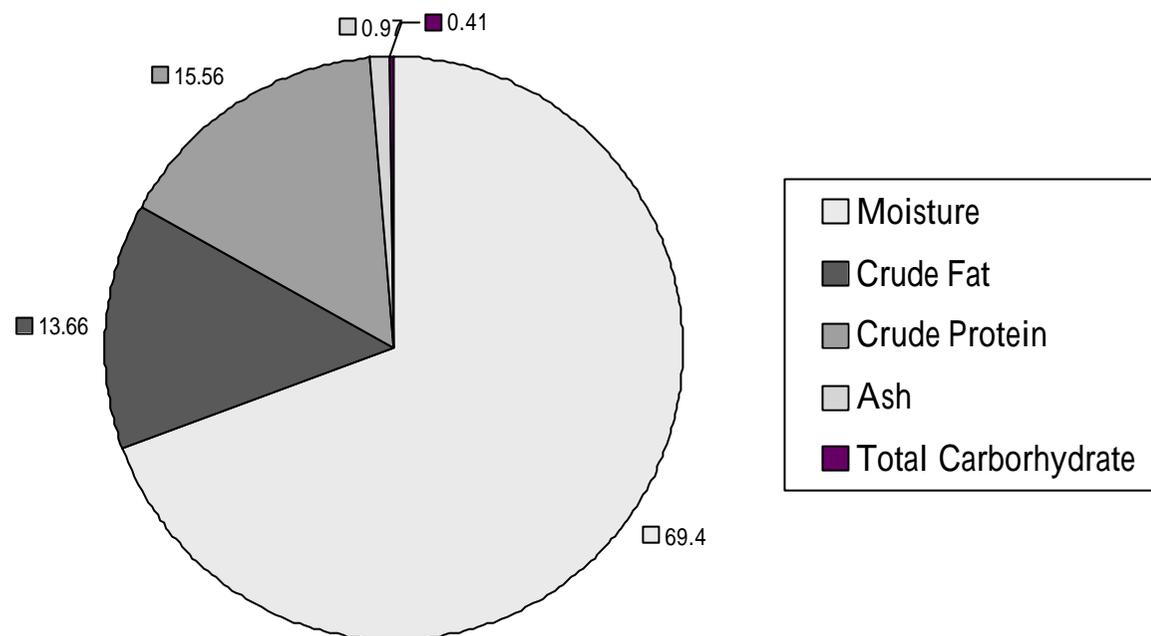


能有效的抓住帶有陽離子的 dipeptide 與 amino acid 而達到分離目的。進行管柱吸附濃縮時，先用 pH 6.0 的磷酸鹽溶液平衡管柱系統，接著通入 MDCM 之水洗滲液，此時滲液中大部分的胺基酸與 dipeptide 其官能基將會離子化，而帶負電荷或總電荷為零，因此會通過 SP column 滲出；只有一些帶正電荷的

胺基酸與 dipeptide 會吸附在 SP 管柱上 (如 histidine , lysine , arginine , carnosine 與 anserine 等) 。再用 pH6.0 的磷酸鹽溶液沖洗 SP 管柱 , 可將殘留在管柱中不帶正電荷的胺基酸完全沖洗下來 , 以免影響實驗結果。然後用 pH8.0 的磷酸鹽溶液洗滌 SP 管柱 , 此時管柱中 dipeptide (carnosine 與 anserine) 將會因 pH 值關係 , 官能基解離而不帶正電荷 , 被沖洗下來 , 再用 Fraction collector 收集即成為純化後的 dipeptide 溶液。至於其他帶正電荷的氨基酸 (histidine , arginine 與 lysine) , 仍吸附在 SP 管柱上 , 達到純化與濃縮的效果。圖二十二為 oligopeptide 溶液經 SP 管柱分離之層析圖 , 將 pH 8.0 K⁺ 溶液沖洗管柱以 Fraction collector 收集後 , 用分光光度計 (UV-2100 spectrophotometer , 偵測波長為 210nm) 測定 , 可區分出 dipeptide 溶液管數 , 達到與其他胺基酸分離的目的 , 並進一步使用毛細管電泳分析 , 可知其中 carnosine 與 anserine 的比例如圖所示。圖中有一未知的 peak , 應為 anserine 所裂解的部份 histidine , 但其含量與本實驗目的所追求的 carnosine 與 anserine 含量相比 , 不至於影響到本實驗結果。

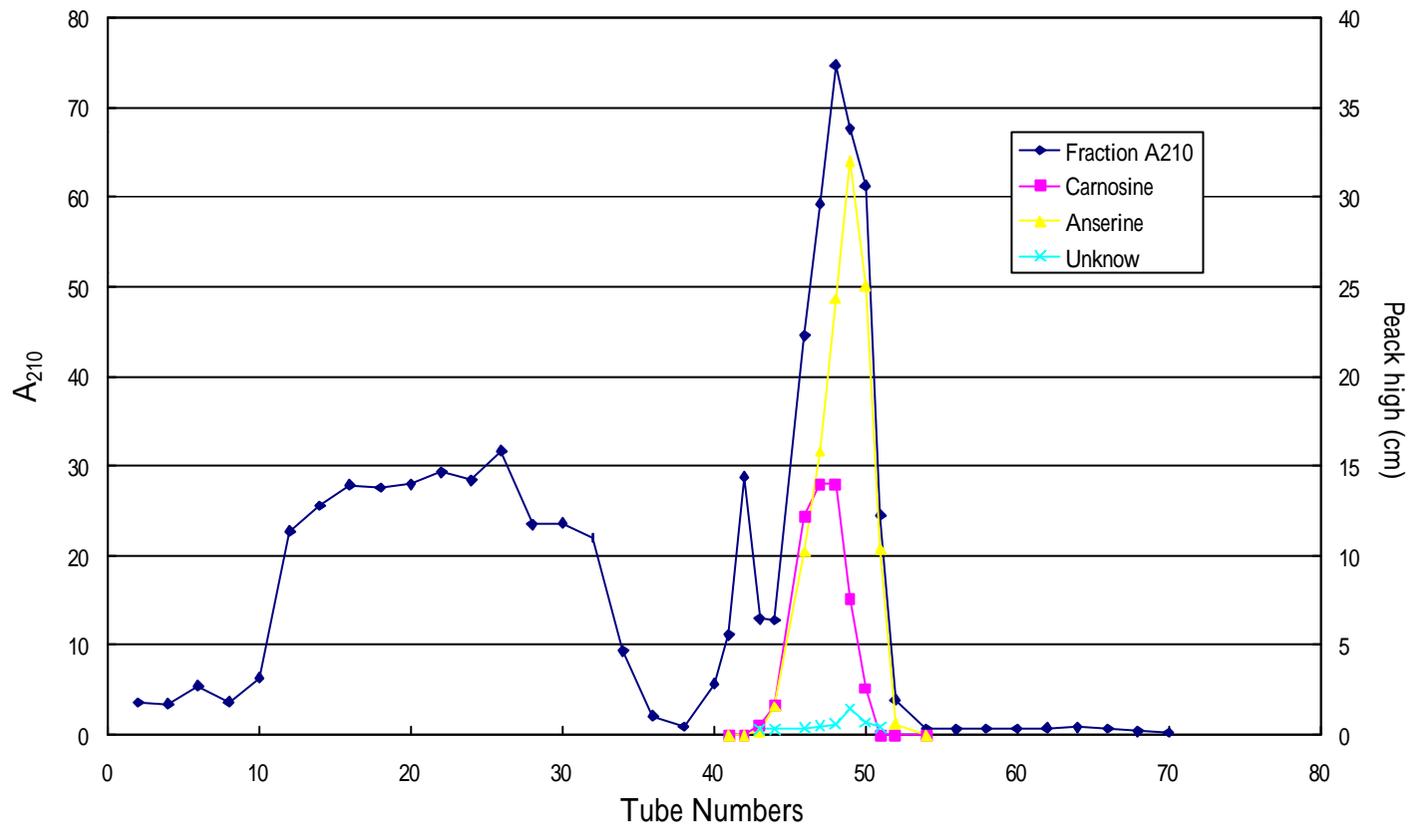
3. Oligopeptide 的分取 :

本實驗中 , 應用所開發出來的毛細管電泳與高效能液相層析法分離條件 , 進行 oligopeptide 的分離與定量。此兩種分離方法所應用的原理不同 , 除了可用來達到分離純化之目的外 , 同時也有互補與佐證的效果。



圖二十一、機械去骨雞肉組成分析圖

Figure 21. Construction of mechanically deboned chicken meat.



圖二十二、Oligopeptide 溶液經陽離子交換管柱分離之層析圖

Figure 22. Chromatography of Oligopeptide solution by Sulphorpyl (SP) column.

表六為各種處理下的 MDCM 萃取液含量，並以所建立之毛细管電泳分離條件，測定各部份雙 的含量。先測定 carnosine 與 anserine 的標準回歸曲線（分別為： $Y = 1227005.856X + 62952.06786$ 與 $Y = 1671704.605X + 5741.039001$ ）後，再定量出 MDCM 萃取過程中各步驟濾液中 carnosine 與 anserine 的含量，進而推算其回收率，分離狀況如圖二十三所示。另外，實驗中曾試驗以不同重量肉漿進行水洗步驟，視其 carnosine 與 anserine 的產量變化。當原料肉漿約為 1 公斤時，總產量(carnosine 與 anserine 總量) 約為 50.08 %（未列出），當原料肉重提高為 2 公斤時，發現提高肉漿處理量時，經過超過濾之濾出液也跟著提高許多，使回收率升至 58.14 %，若按照此趨勢（增加 1 公斤肉漿處理量，總回收率提高約 8.06 %），當肉漿處理量為 4 公斤時，carnosine 與 anserine 的總產量可達 82 % 左右。不過礙於實驗設備之限制，本實驗並未做如此大量之處理，工業上是否能應用，仍待進一步評估與研究。

根據研究指出，每天在老鼠飼料中分別提供 1.8% 與 5.0% 的 carnosine，可使老鼠肌肉中 carnosine 濃度增加 1.8 與 2.2 倍(Chan 等人，1994)，但由於成本太高，因此無法當作食品添加劑使用。另外，Gopalakrishnan 等人 (1994) 也指出應用人工合成 carnosine 當作食品添加劑時，最大的限制便是合成與成本的問題。以 MDCM 作為分取 carnosine 的來源，不但可以有效降低成本，且經水洗之肉漿也提升其使用價值。

在應用高效能液相層析分離方面，以半製備型 ODS 管柱分離，同樣也有不錯的分離效果。圖二十四為水洗液經超過濾之濾出液經過 SP 管柱分離純化後之 HPLC 層析圖，結果顯示，經過此步驟可得到一高純度的 oligopeptide 溶液，主要成份為 carnosine 與 anserine，同時亦證明本實驗所使用的 HPLC 分離條件，確實可以將二者分開。其分離條件為：semi preparative ODS column (250×10mm Nucleosil 100-7 C18, Macherey-Nagel)，mobile phase：50mM KH_2PO_4 (pH8.0)，注射量為 20 μl sample，偵測波長設在 210nm。其分離之原理乃是利用樣品的極性大小不同而分離（極性大者，滯留時間較短）；甲肌（anserine）比肌（carnosine）多一甲基根（ $-\text{CH}_3$ ），極性較小，滯留時間較長。此二種分離方法，在使用上各有其優缺點：定性方面，以毛細管電泳較為恰當，所需樣品量少、靈敏度高、分析速度快、操作容易以及分析效果好、再現性高等為其優點，但卻無法進行大量置備與萃取；利用 HPLC ODS 管柱進行純化分離時，可用於較多量的製備與分離 carnosine 與 anserine，但所需之樣品量較多與滯留時間（retention time）較久，且以分析型管柱分析時，胺基酸會部份重疊而無法完全分開，須使用半製備或製備型管柱才能達到良好分離效果。

表六、機械去骨雞肉肉漿在不同處理下 Dipeptide 含量之變化

Table 6. The change of protein and dipeptide from mechanically deboned chicken meat under difference treatments

處理肉重：2029.34g

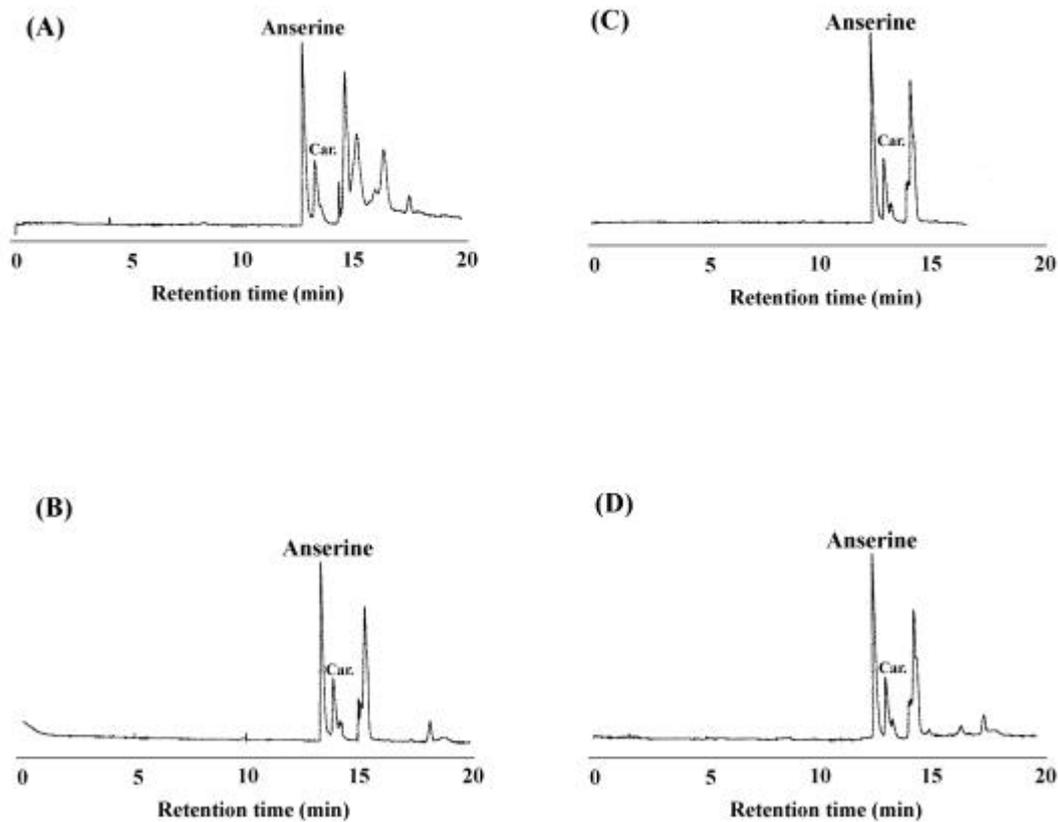
處理方式	澄清液 總體積(ml)	Canosine 含 量(mg/ml)	Anserine 含 量(mg/ml)	Carnosine 含 量(mg/100g)	Anserine 含 量(mg/100g)	Car. + Ans 含量 (mg/100g)	Total Yield (Car. + Ans.,%)	
未經水浴處理	6426.5	0.228	0.463	72.20	146.62	218.82	58.14	
經水浴加熱處理	5550.9	0.119	0.432	32.55	118.17	150.72		
經 Hollow fiber 後	濾出液	4738.0	0.121	0.424	28.25	98.99		127.24
	殘留液	812.9	0.121	0.449	4.85	17.99		22.84

PS: 以毛細管電泳定出回歸曲線方程式：

Carnosine 之回歸曲線方程式； $Y=1227005.856X+62952.06786$

Anserine 之回歸曲線方程式： $Y=1671704.605X+5741.039001$

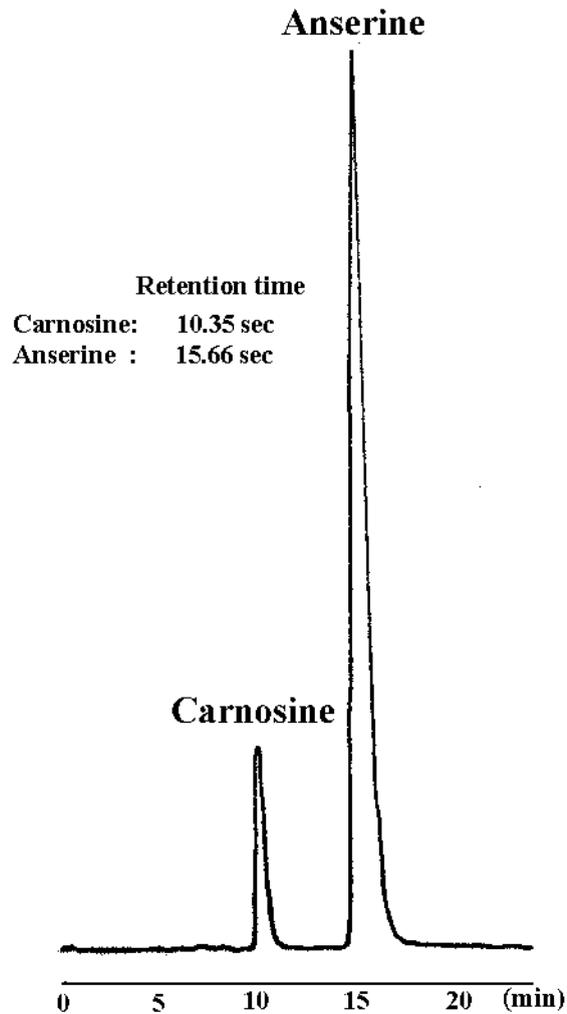
Total Yield (%) = 濾出液的 car. 與 ans. 總含量 ÷ 未經水浴處理之 car. 與 ans. 總含量



圖二十三、經不同處理後機械去骨雞肉樣品之毛細管電泳圖

(A) 未經水浴之 MDCM 水洗液 (B) 經水浴之 MDCM 水洗液 (C) MDCM 水洗液經超過濾之濾出液 (D) MDCM 水洗液經超過濾之殘留液。

Figure 23. Capillary electropherogram of MDCM under different treatments. (A) treatment with nothing (B) treatment with water bath (C) filtrate of ultra-filtration (D) concentrate of ultra-filtration Separation condition: 65cm fused-silica capillary tube and window is 10cm to the end. Running buffer is 50mM KH_2PO_4 , pH 7.0. Voltage 9KV and detection wavelength at 200nm



圖二十四、萃取液經超過濾與陽離子交換管柱處理後之 HPLC 層析圖

Figure 24. Chromatography of filtrate treatment with ultra-filtration and cation exchanger by HPLC. HPLC condition: column: Semi preparative ODS column (250×10mm Nucleosil 100-7 C18, Macherey-Nagrl), mobile phase: 50mM KH_2PO_4 , pH8.0, injection volume: 20 μl sample, detection wavelength: 210nm

陸、結論

1. 實驗中所測得機械去骨雞肉基本成份為水分含量佔 69.4%，粗脂肪與粗蛋白含量分別為 13.66% 與 15.56%，灰分佔 0.97%，而總碳水化合物佔 0.41%。
2. 實驗建立出以高效能液相層析 ODS 管柱與毛細管電泳分離 carnosine 與 anserine 之最佳條件。HPLC 分離條件為 Semi preparative or analytical ODS column，mobile phase 為 50mM KH_2PO_4 buffer (pH7.5)，流速 1ml/min，偵測波長設為 210nm 或 200nm 均可。毛細管電泳最佳分離條件為 65cm fused-silica capillary tube (window 距底端 10cm)，running buffer 為 25mM KH_2PO_4 (pH 7.0)，9000 伏特正電壓，電動進樣 2 秒，偵測波長為 200nm。
3. 使用分析型 ODS 管柱進行高效能液相層析時，雖可將 carnosine 與 anserine 分開，但也有使用上的風險 (carnosine 與 histidine 重疊)，而半製備型 ODS 管柱則無此顧慮。
4. 針對分離肌肉中 carnosine 與 anserine 而言，實驗所建立之分離條件具有分析效果佳、快速分析、操作容易且可節省溶劑使用量等優點。

5. 使用強陽離子交換樹脂：Sulphopropyl (SP)可有效濃縮 oligopeptide 溶液，並去除其他胺基酸達到純化的效果。

6. 配合一系列萃取流程分取水洗液中 dipeptides，再應用高效能液相層析或毛細管電泳定量，可由機械去骨肉中分取出 carnosine 與 anserine，約為原料肉（約 2 公斤）中 carnosine 與 anserine 總含量的 58.04%，且有隨處理量增加而增加總產量之可能。



柒、參考文獻

- 惠普 (1993) 高效毛細管電泳-導論, 惠普公司出版物序號 125091-6199E, pp : 38-39
- 陳介武 (1996) 食品添加物-抗氧化劑 Antioxidants, 食品資訊, 122 : 46-52
- 徐士喬 (2000) 淺談抗氧化劑, 生物資源生物技術, 2 (1) 40-42
- 王潤倫、林少琳 (1999) 抗氧化劑與新血管疾病的關係, 臨床醫學, 44 : 132-135
- 趙崇舜、趙崇良 (1999) 抗氧化劑在治療冠狀動脈心臟病的角色, 當代醫學, 26 : 494-496
- 陳文賢 (1999) 抗氧化劑對肉品氧化穩定性之影響, 科學農業, 47(3,4): 126-130
- 高馥君、李敏雄 (1998) 食品保存與抗氧化劑, 食品工業月刊, 30 (12) 17-23
- 許元勳 (1999) 微生物來源天然抗氧化劑之篩選研究 (上), 生物產業, 10 (1) 12-18
- 許元勳 (1999) 微生物來源天然抗氧化劑之篩選研究 (下), 生物產業, 10 (2) 105-112
- 王潤倫、林少琳 (1999) 抗氧化劑與心血管疾病的關係, 臨床醫學, 44 : 132-135
- 郭悅雄 (1995) 自由基、活性氧與抗氧化劑, 臺灣科學, 48 (2) 164-177
- 王瑩玉 (1997) 氧自由基及抗氧化劑, 醫藥漫談, 31-46
- 蔡正宗、洪素琴、張國揚、郭俊欽 (1991) 淘汰蛋雞機械去骨肉之組成分析與氧化酸敗之研究, 食品科學, 18 (1) : 46
- 黃素卿 (1998) 禽肉甲肌 及肌 之萃取及其抗氧化性, 東海大學碩士論文。
- 賴穎珍 (1997) 禽肉肌 之萃取及其抗氧化性, 東海大學碩士論文。
- 林欣助 (1997) 茄子花色素 之鑑定與應用毛細管電泳在分離及鑑定花色素及花色素 之研究, 東海大學碩士論文。
- 李桂雲 (1996) 肉品品質改善之研究 : 、不同洗滌溶液對機械去骨雞肉回收率及其性質之影響 、貢丸回溫味之研究, 東海大學碩士論文。
- 陳韻旨 (1995) 肉品品質之研究 : 、抗氧化劑、加工處理以降低中式香腸及臘肉中亞硝酸含量 、螯合劑對機械去骨雞肉儲藏其品質變化之影響, 東海大學碩士論文。
- 戴仁智 (1994) 以反應曲面法探討添加氯化鈉、亞硝酸鈉及抗壞血酸對機械去骨禽肉於冷凍期間其品質之影響, 東海大學碩士論文。
- 蔣健興 : 以毛細管電泳分離肌肉中三種含有 Histidine 及其衍生物的 Dipeptides (Anserine、Carnosine 與 Balenine) 八十八年度大專學生參與專題研究計畫研究報告, 計畫編號 : 88-2815-C029-007-B。

- Ang,C.Y.W. and Hamm,D. (1982) Proximate analysis, selected vitamins and minerals and cholesterol content of mechanically deboned and hand-deboned broiler parts. *J. Food Sci.* 39: 1147
- AOAC. (1984) "Official Methods of Analysis" 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Aristoy,M.C. and Toldra,F. (1998) Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Sci.* 50(3) 327-332
- Asghar,A., Gray,D.J., Buckley,D.J., Pearson,A.M. and Booren,A.M. (1988) Perspectives on warmed-over flavor. *Food Technol.* 46(6) 102
- Babior,B.M. (1978) Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New Eng. Med.* 298: 659-668 and 721-725
- Baker,R.C., Darfer,J.M. and Angel,S. (1974) Frankfurters made from mechanically deboned poultry meat (MDPM). *Poultry Sci.* 53: 156
- Barbut,S., Draper,H.H. and Cole,P.D. (1989) Effect of mechanical deboner head pressure on lipid oxidation in poultry meat. *J. Food Prot.* 52: 55-58
- Babji,A.S., Froning,G.W. and Satterlee,L.D. (1980) Protein nutritional quality of mechanically deboned poultry meat as predicted by the C-PER assay. *J. Food Sci.* 45: 41-443
- Bidilingmeyer,B.A., Cohen,S.A., Tarvin,T.L. and Frost,B. (1987) A new, rapid, high sensitivity analysis of amino acids in food type samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70(2) 241-247
- Branen,A.L. (1975) Toxicology and biochemistry of BHA and BHT. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52: 59
- Brown,C.E. and Antholine,W.E. (1979) Multiple forms of the cobalt ()-carnosine complex. *Biochem. Biophys Res. Comm.* 88(2) 529
- Brown et al. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* 101: 14-20
- Bogardus,S.L. and Boissonneault,G.A. (2000) Carnosine inhibition in vitro low-density lipoprotein oxidation. *Nutrition Research.* 20(7): 967-976
- Boldyrev,A. (2001) Carnosine as a modulator of endogenous Zn²⁺ effects. *TRENDS in Pharmacological Sciences.* 22(3) 112-113
- Boldyrev,A., Abe,H. Stvolinsky,S. and Tyulina,O. (1995) Effects of carnosine and related compounds on generation of free oxygen species: a comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B(3) 481-485
- Boidyrev,A.A., Dupin,A.M., Bunin,A.Y., Babizhaev,M.A. and Severin,S.E. (1987) The antioxidative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. *Biochem. Int.* 15(6) 1105

- Boldyrev,A.A. and Severin,S. (1990) The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv. Enzyme Regul.*30: 175
- Chan,W.K.M., Decker,E.A., Lee,J.B. and Butterfield,D.A. EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging ability of carnosine and related dipeptides. *J. Agric. Food Chem.*, submitted.
- Chan,W.K.M., Decker,E.A., Chow,C.K. and Biossonneault,G.A. (1994) Effect of dietary carnosine on endogenous antioxidant concentrations and oxidative stability of rat skeletal muscle. *Lipids.* 29: 461-466
- Chan,K.M. and Decker,E.A. (1994) Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34(4): 403-426
- Chan,K.M., Decker,E.A. and Means,W.J. (1993) Extraction activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J. Food Sci.* 58(1)1-4
- Chang,S., Ostric-Matijasevic,B., Hsieh,O.A.J. and Huang,C.(1977) Natural antioxidants from rosemary and sage. *J. Food Sci.* 42: 1102-1106
- Charles,J. and Parker,Jr. (1966) Spectrophotometric determination of carnosine and anserine in muscle. *Analytical chemistry.* pp:1359-1362
- Cornet,M. and Bousset,J. (1999) Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. *Meat Sci.* 51: 215-219
- Crosland,A.R., Patterson,R.L.S. and Higman,R.C. (1995) Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - :chemical composition. 40: 289-302
- Crush,K.G. (1970) Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 34: 3
- Day,L. and Brown,H. (2001) Detection of mechanically recovered chicken meat using capillary gel electrophoresis. *Meat Sci.* 57: 31-37
- Davey,J.A., Sevanian,A., Muakkassah-Kelly,S.F., and Hochstein,P. (1986) Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of antioxidant functions of uric acid. *Biochem. J.* 235: 747
- Dahl,T.A., Midden,W.R. and Hartman,P.E. (1988) Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. *Photochem. Photobiol.* 47: 357
- Dawson,L.E. and Gartner,R. (1983) Lipid oxidation in mechanically deboned poultry. *Food Technol.* 37: 112-116
- Decker,E.A. and Faraji,H. (1990) Inhibition of lipid oxidation by carnosine. *JAOCS.* 67(1) 650
- Decker,E.A. and Crum,A.D. (1991) Inhibition of oxidative rancidity in salted ground pork by carnosine. *J. Food Sci.*56: 1179-1181

- Decker,E.A., Crum,A.D. and Calvert, J.T. (1992) Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J. Agric. Food Chem.* 40: 756
- Decker,E.A. and Crum,A.D. (1993) Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. *Meat Sci.* 34: 245-253
- Denton,J.H. and Gargner,F.A. (1982) Effect of further processing systems on selected microbiological attributes of turket meat products. *J. Foos Sci.* 47: 214-217
- Dhillion,A.S. and Maurer,A.J. (1975) Stability of comminuted poultry meats in frozen storage. *Poultry Sci.* 54: 1263
- Dunnett,M. and Harris,R.C. (1997) High performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in equine and camel muscle and individual muscle fibres. *J. Chromatogr. B.* 688: 47-55
- Dzlezak,J.D. (1986) Antioxidants: the ultimate answer to oxidation. *Food Technol.* 40 (9): 94-102
- Easte,R.A. and Baker,D.H. (1977) Nitrogen metabolism, tissue carnosine concentration and blood chemistry of gravid swine fed graded levels of histidine. *J. Nutr.* 107: 120-125
- Essary,E.O. (1979) Moisture, fat, protein and mineral content of mechanically deboned poultry meat. *J. Food Sci.* 44: 1070
- Essary,E.O. and Ritchey,S.J. (1968) Amino acid composition of meat removed from boned turkey carcass by use of commercial boing machine. *Poultry Sci.* 47: 1953-1955
- Fonkwe,L.G. and Singh,R.K. (1996) Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. *Process Biochemistry.* 31(6) 605-616
- Froning,G.W. (1976) Mechanically deboned poultry meat. *Food Technol.* 30(9): 50
- Froning,G.W. (1970) Poultry meat sources and their emulsifying characteristics as related to processing variables. *Poultry Sci.* 49: 6
- Froning,G.W. and Johnson,F. (1973) Improving the quality of mechanically deboned fowl meat by centrifugation. *J. Food Sci.* 38: 279
- Froning,G.W. and Janky,F. (1971) Effect of pH and salt preblending on emulsifying characteristics of mechanically deboned turkey frame meat. *Poultry Sci.* 50: 1206
- Froning,G.W. (1981) Mechanical deboning of poultry and fish. In advance in food research. 27: 104-147
- Froning,G.W., Arnold,R.G., Mondigo,R.W., Neth,C.E. and Hartung,T.E. (1971) Quality and storage stability of frankfurters containing 15% mechanically deboned turkey meat. *J. Food Sci.* 36: 974

- Froning,G.W. (1979) Characteristics of bone particles from various poultry meat products. Poultry Sci. 58: 1000-1003
- Giese,B. (1996) Antioxidant: tools for preventing lipid oxidation. Food Technol. 50 (11): 73-81
- Goodwin,T.L., Webb,J.E., Trent,C.M. and Reames,C.E. (1968) Chemical composition of mechanically deboned meat. Poultry Sci. 47: 1674
- Gopalakrishnan,J., Decker,E.A. and Means,W.J. (1999) Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts. Meat Sci. 52: 101-110
- Gray,J.I. and Pearson,A.W. (1984) Cured meat flavor. Adv. Food Res. 29: 1
- Greenwood,D.E. and Swaminathan,B. (1981) Rapid detection of *salmonella* in mechanically deboned poultry meat. Poultry Sci. 60: 2253-2257
- Gruden,L.P., MacNeil,J.H., and Dimick,P.S. (1972) Poultry product quality: chemical and physical characteristics of mechanically deboned poultry meat. J. Food Sci. 37: 247
- Gruden,L.P. and MacNeil,J.H. (1973) Examination of bone content in mechanically deboned poultry meat by EDTA and atomic absorption spectrophotometric methods. J. Food Sci. 38: 712-713
- Hernandez,A., Baker,R.C. and Hotchkiss,J.H. (1986) Extraction of pigments from mechanically deboned turkey meat. J. Food Sci. 51(4) 865-872
- Horning,M.S., Blakemore,L.J. and Trombley,P.Q. (2000) Endogenous mechanisms of neuroprotection: role of zinc, copper, and carnosine. Brain Research. 852: 56-61
- Hsu,L.C., Constable,D.J.C., Orvos,D.R. and Hannah,R.E. (1995) Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis in penciclovir biodegradation kinetic studies. J. Chromatogr. B. 669: 85-92
- Igene,J.O., King,J.A., Pearson,A.M. and Gray,J.I. (1979) Influence of heme pigments, nitrite, and non-heme on development of warmed-over flavor (WOF) in cooked meats. J. Agric. Food Chem. 27(4) 838-842
- Igene,J.O. and Pearson,A.M. (1979) Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over flavor (WOF) in cooked meat. J. Food Sci. 44: 1285-1290
- Issaq,H.J., Janini,G.M., Atamna,I.Z., Muschik,G.M. and Lukszo,J. (1992) Capillary Electrophoresis Separation of small Peptides: Effect of pH, Buffer Additives, and Temperature. J. Liq. Chromatogr. 15: 1129-1142
- Jones,J.M. (1986) Review: Application of science and technology to poultry meat process. J. Food Technol. 21: 663-681
- Janky,D.M. and Groning,G.W. (1975) Factors affecting chemical properties of heme and lipid components in mechanically deboned turkey meat. Poultry Sci.54: 1378-1387

- Johnson,A.R. and Hewgill,F.R. (1961) The effect of the antioxidants, BHT, BHA and PG on growth, Liver and serum lipids and serum sodium level of the rat. *Australian Exp. Biol. & Med. Sci.* 39: 353
- Karpinska,M., Borowski,J. and Danowska-Oziewicz,M. (2001) The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chem.* 72: 5-9
- Knecht,R. and Chang,J.Y. (1986) Liquid chromatographic determination of amino acids after gas-phase hydrolysis and derivatization with (Dimethylamino) azobenzenesulfonyl chloride. *Anal. Chem.* 58: 2375-2379
- Kohen,R., Misgav,R. and Ginsburg,I. (1991) The SOD like activity of copper: carnosine, copper:anserine and copper:homocarnosine complexes. *Free Rad. Res. Comm.*12-13: 179
- Kohen,R., Yamamoto,Y., Cundu,K.C and Ames,B. (1988) Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 3175
- Krol,B., Huyts,P.E.P. and Calame,H.J.F (1975) The application of mechanically deboned poultry meat in meat products. *Proceedings of the 2nd European Symposium on Poultry Meat Quality, Oosterbeek, The Netherlands, May 12-15, P.52*
- Kunzman,J.E., Collins,M.A., Field,R.A. and Millar,G.J. (1981) Cholesterol content of beef bone marrow and mechanically deboned meats. *J. Food Sci.* 46: 1758-1788
- Lee,B.J., Hendricks,D.G. and Cornforth,D.P. (1999) A comparison of carnosine and ascorbic acid on color and lipid stability in a ground beef patty model system. *Meat Sci.* 51: 245-253
- Lee,Y.B., Hargus,G.L., Kirkpatrick,J.A., Bener,D.L. and Forsythe,R.N. (1975) Mechanism of lipid oxidation in mechanically deboned chicken meat. *J. Food Sci.* 40: 964
- Lin,S.W. and Chen,T.C. (1989) Yields, color and composition of washed, kneaded and heated mechanically deboned poultry meat. *J. Food Sci.* 54: 561
- Marion,J.E. and Woodford,J.G. (1965) Lipid fractions of chicken broiler tissues and their fatty acid composition. *J. Food Sci.* 30: 38-43
- Mast,M.G., Th.G.Uijttenboogaart., Gerrits,A.R. and de Vries,A.W. (1982) Effect of auger- and press- type mechanical deboning machines on selected characteristics of mechanically deboned poultry. *J.Food Sci.* 47: 1757-1755
- Maurer,A.J. (1973) Emulsifying characteristics of mechanically and hand deboned poultry meat mixtures. *Poultry Sci.* 52: 2061
- Mei,L., Cromwell,G.L., Crum,A.D. and Decker,E.A. (1998) Influence of dietary -alanine and histidine on the oxidative stability of pork. *Meat Sci.* 49(1) 55-64

- MecNeil, J.H., Kakuda, Y. and Frindlay, C. (1988) Influence of carcass parts and food additives on the oxidative stability of frozen mechanically separated and hand deboned chicken meat. *Poultry Sci.* 67: 270-274
- MecNeill, J.H., Mast, M.G. and Leach, R.M. (1978) Protein efficiency ratio and levels of selected nutrients in mechanically deboned poultry meat. *J. Food Sci.* 43: 864-869
- MecNeill, J.H. (1981) Sources of animal proteins for processed meats Proceedings of the 5th European Symposium Quality of Poultry Meat, Apeldoorn, the Netherlands. Pp.57-66
- MecNeill, J.H. and Mast, M.G. (1980) Quality and sensory characteristics of mechanically deboned spent layer meat chilled with liquid nitrogen and carbon dioxide "snow". *J. Food Sci.* 45: 645
- MecNeill, J.H., Dimick, P.S. and Mast, M.G. (1973) Use of chemical compounds and a rosemary spice extract in quality maintenance of deboned poultry meat. *J. Food Sci.* 38: 1080-1081
- Moerck, K.E. and Ball, H.R. Jr. (1973) Lipids and fatty acid of chicken bone marrow. *J. Food Sci.* 38: 978
- Moerck, K.E. and Ball, H.R. Jr. (1974) Lipid autoxidation in mechanically deboned chicken meat. *J. Food Sci.* 39: 876-879
- Mottram (1994) Flavor of Meat and Meat Products, ed. F. Shahidi Blackie Academic and Professional, Glasgow. P.210-230
- Nawar, W.W. (1985) Lipids. Ch 4. In food Chemical. O.R. Fennema (Ed.), p.175-205. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Nelson, K.A., Busta, F.F., Sofas, J.N. and Wagner, M.K. (1983) Effect of polyphosphates in combination with nitrite-sorbate or sorbate on *clostridium botulinum* growth and toxin production in chicken Frankfurter emulsions. *J. Food Sci.* 846-850
- Ngapo, T.M. and Alexander, M. (1999) Capillary gel electrophoresis versus SDS PAGE of exudates from fresh pork. *Meat Sci.* 53: 145-148
- O' Neill, L.M., Galvin, K., Morrissey, P.A. and Buckley, D.J. (1999) Effect of carnosine, salt and dietary vitamin E on the oxidative stability of chicken meat. *Meat Sci.* 52: 89-94
- O' Neill, L.M., Galvin, K., Morrissey, P.A. and Buckley, D.J. (1998) Inhibition of lipid oxidation in chicken by carnosine and dietary α -tocopherol supplementation and its determination by derivative spectrophotometry. *Meat Sci.* 50(4) 479-488
- Orr, H.L. and Woger, W.G. (1979) Emulsifying characteristics and composition of mechanically deboned chicken necks and backs from different source. *Poultry Sci.* 58: 577-579

- Ostovar,K., MacNeil,J.H. and O' Donnell,K. (1971) Poultry product. 5. microbiological evaluation of mechanically deboned poultry meat. *J. Food Sci.* 36: 1005-1007
- Paquette,G., Kupranycz,D.B. and ven de Voort,F.R. (1985) The mechanisms of lipid autoxidation.1.Primary oxidation products. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 18: 112-118
- Patterson,B.H., Block,G., Rosenberger,W.F., Pee,D. and Kahle,L.L. (1990) Fruit and vegetables in the American diet: data from the NHANES survey. *Am. J. Pub. Health* 80: 1443-1449
- Pegova,A., Abe,H. and Boldyrev,A. (2000) Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases. *Comparative Biochemistry and physiology, Part B* 127: 443-446
- Perry,T.L., Hansen,S., Tishler,B., Bunting,R. and Berry,K. (1967) Carnosinemia, *N. Engl. J. Med.*277: 23
- Peter (1990) Natural antioxidants exploited commercially; Hudson,B.J.F., Ed; *Food antioxidants*, p.99. Elsevierscience Publishing Co. New York.
- Pickering,K., Griffin,M., Smethurst,P., Hargin,K.D. and Stewart,C.A. (1995) Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - :Immunology. 40: 327-336
- Pickering,K., Ecan,C.L., Hargin,K.D. and Stewart,C.A. (1995) Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - :microscopy. 40: 319-326
- Pikul,J., Leszczynski,D.E., Bechtel,P.J. and Kummerow,F.A. (1984) Effect of frozen storage and cooking on lipid oxidation in chicken meat. *J. Food Sci.* 49: 838
- Peason et al. (1983) *Food Technol.* 37: 121-129
- Peason et al. (1977) *Adv. Food Res.* 23: 1-5
- Porter,A.F. (1984) The use of citric acid in the seafood industry. *Biotech Pro. Div., Miles Labs., Inc., Elkhart, Ind.*
- Ririe,D.G., Roberts,P.R., Shouse,M.N. and Zaloga,G.P. (2000) Vasodilatory actions of the dietary peptide carnosine. *Nutrition.* 16: 168-172
- Raphaelides,S.N., Grigoropoulou,S. and Petridis,D. (1998) Quality attributes of pariza salami as influenced by the addition of mechanically deboned chicken meat. *Food Quality and Preference.* 9(4)237-242
- Rubtsov,A.M., Schara, M., Sentiurc, M. and Boldyrev, A.A. (1991) Hydroxyl radical –scavenging activity of carnosine: a spin trapping study. *Acta Pharm. Jugosl.* 41: 401
- Satterlee,L.D., Fronning,G.W. and Janky,D.M. (1971) influence of skin content on composition of mechanically deboned poultry meat. *J. Food Sci.* 36: 979-981

- Salim-Hanna,M., Lissi,E. and Videla,L. (1991) Freeradical scavenging activity of carnosine. *Free Rad. Res. Comm.*14(4) 263
- Savage, A.W.J., Richardson,R.I., Jolley,P.D., Hargin,K.D. and Stewart,C.A. (1995) Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - :gel electrophoresis. *40: 303-317*
- Schnell,P.G., Vadehra,D.V., Hood,L.R. and Backer,R.C. (1974) Ultrastructure of mechanically deboned poultry meat. *Poultry Sci.* 53: 46
- Schnell,P.G., Nath,K.R., Darfler,J.M., Vadehra,D.V. and Baker,R.C. (1973) Physical and functional properties of mechanically deboned poultry meat as use in the manufacture of Frankfurters. *Poultry Sci.* 52: 1363-1369
- Shamberger,R.J. (1978) On your risk of stomach cancer from untreated beef. *Executive Health XIV.*, No. 12 sept. p.1
- Sherwin,E.R. (1978) Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *J. Food Sci.* 47: 740-743
- Smith,D.M. (1987) Functional and biochemical changes in deboned turkey due to frozen storage and lipid oxidation. *J. Food Sci.* 52: 22-27
- Tamaki,N., Funatsuka,A., Fujimotot,S. and Hama,T. (1984) The utilization of carnosine in rats fed on a histidine-free diet and its effect on the levels of tissue histidine and carnosine. *J. Nutr. Sci. Vita.*30: 541-551
- Tappel,A.L. (1962) Heme compounds and lipoxidase as biocatalysts. In "Symposium on Foods: Lipids and Their Oxidation,"ed. H.W. Schultz,E.A. Day, and R.O. Sinnhuber, p.122 A Pub. Westport,Conn.
- Tims,M.J. and Watts,B.M. (1958) Protection of cooked meats with phosphates. *Food Technol.* 12: 40-42
- Trout,G.R. and Dale,S. (1990) Prevention of warmed-over flavor in cooked beef: effect of phosphate type, phosphate concentration, a lemon juice/phosphate blend, and beef extract. *J. Agric. Food Chem.* 38: 665-669
- Walker, A.R.P. (1972) The human requirement of calcium: Should low intakes be supplemented? *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 518
- Wood,M.R.G. and Johnson,P. (1981) Purification of carnosine synthetase from avian muscle by affinity chromatography and determination of its subunit structure. *Biochem. Biophys. Acta.* 662: 138
- Yamauchi,K., Nagai,Y. and Chashi,T. (1982) Quantitative relationship between alpha tocopherol and polyunsaturated fatty acids and its connection to oxidative rancidity in chicken skeletal muscle. *Agric. Biol. Chem.* 46: 2719
- Young,L.L. (1976) Composition and properties of an animal protein isolate prepared from bone residue. *J. Food Sci.* 41: 606

- Yoshikawa,T., Naito,Y., Tanigawa,T., Yoneta,T., Yasuda,M., Ueda,S., Oyamada,H.
and Kondo,M. (1991) Effect of zinc-carnosine chelate compound(Z-103), a novel
antioxidant, on acute gastric mucosal injury induced by ischemiareperfusion in
rats. Proc. Rad. Res. Comm. 14(4) 289
- Younathan and Watts. (1960) Food Res. 25: 538-543
- Chapman and Hall. (1997) From DOC on CD-ROM, release 5:1

八、附錄

附圖一、不同處理下之萃取液

(A) 原始水洗液 (B) 經離心後之澄清液 (C) 經水浴、離心之澄清液 (D) 經超過濾之濾出液 (E) 經超過濾之濃縮液

Appendix Fig.1 Extracts of different treatments.

(A) Original extracts (B) treatment with centrifugation (C) treatment with water bath (D) filtrate of ultra-filtration (E) concentrate of ultra-filtration

附圖二、Hollow Fiber 超過濾裝置圖

Appendix Fig.2 Instrument of Hollow fiber ultra-filtration.