

東海大學畜產與  
生物科技學系

碩士論文

乳油熱處理對HPLC鮮乳黃嘌呤氧化酶活性之影響

(105)

研究生：徐承甫  
撰

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

碩 士 論 文

**Master Thesis**

指導教授：周繼發 博士

Advisor: Chi-Fa Chow, Ph. D.

乳油熱處理對 HTST 鮮乳黃嘌呤氧化  
酶活性之影響

**Effect of Cream Heat Treatment on Xanthine**

**Oxidase Activity of HTST Fresh Milk**

研究生：徐承甫 撰

Graduate Student: Cheng-Fu Hsu

中華民國一零五年六月

June, 2016

乳油熱處理對 HTST 鮮乳黃嘌呤氧化  
酶活性之影響

**Effect of Cream Heat Treatment on Xanthine  
Oxidase Activity of HTST Fresh Milk**

碩士論文

**Master Thesis**

徐承甫

Cheng-Fu Hsu

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

中華民國一零五年六月

June, 2016

# 誌謝

本論文承蒙恩師 周繼發教授於專業領域之提點與指導，指正我思考與邏輯的方向，進入實驗室後的兩年，雖說有不少挑戰，但著實受益良多，在此致上由衷的敬意與謝忱。文稿初成，復蒙口試委員蘇和平教授以及王家宇副教授撥冗審閱，並於口試期間提供精闢之見解與寶貴之建議，使本論文能夠更臻完善，特此謹致謝忱。

在學期間，感謝系上所有師長在各領域上的教導，讓我對所學有更深入的了解。依凝學姐以及姿穎姐在課業或是研究生活中能夠給予方向與關心，宜婷學姐、笙合學長和凱婷學姊於學業上的幫助，以及昱韶與泰穎於實驗室的互助協力；感謝同學家豪、博凱、重志、冠鈺宇丞及珉瑞在課業研究上的互相砥礪；感謝好友嘉予、致文與嘉紘在課業上的協助、支持以及生活上的諸多幫助。正因為有你們的幫忙，讓我在研究所期間能快速成長，並留下許多回憶。

特別感謝我最親愛的父母與家人，於這二十餘年來養育教誨之恩與無盡的愛，給予我支持及鼓勵，方能使我順利完成研究所學業。最後，真摯的感謝所有在我有生以來給予我幫助、支持、打氣的朋友，因為有你們的出現，讓我的人生擁有璀璨的回憶。

徐承甫 謹誌

東海大學畜產與生物科技學系

# 目次

	頁次
I. 中文摘要.....	01
II. 前言.....	02
III. 文獻檢討.....	04
IV. 材料方法.....	32
V. 結果與討論.....	45
VI. 結論.....	65
VII. 參考文獻.....	67
VIII. 英文摘要.....	83
IX. 作者小傳.....	84

# 圖次

	頁次
圖 1 乳脂肪球表構造及乳脂肪球之構造示意圖.....	08
圖 2 黃嘌呤氧化還原酶結構圖.....	15
圖 3 黃嘌呤氧化還原酶之二級結構、XOR 次單元作用區、位置與相關輔因子.....	16
圖 4 黃嘌呤氧化還原酶之各輔因子間的距離.....	17
圖 5 Mo-Co 之化學結構圖.....	19
圖 6 黃嘌呤氧化還原酶之催化反應.....	21
圖 7 黃嘌呤氧化還原酶與黃嘌呤之作用機制.....	22
圖 8 黃嘌呤氧化酶催化黃嘌呤之作用機制.....	23
圖 9 氧氣對於 XOR 最終電子接受者之產物的影響...	25
圖 10 缺血再灌流傷害發生原因之作用機轉.....	30
圖 11 實驗特製不鏽鋼漿片模型.....	36
圖 12 尿酸標準曲線圖.....	39
圖 13 乳脂經 121°C, 30 min 後結塊與回溶於水之情形	42
圖 14 實驗流程圖.....	44
圖 15 成分無調整均質與未均質生乳其尿酸生成量之比較.....	48

圖 16	標準化均質與標準化未均質生乳其尿酸生成量 之比較.....	49
圖 17	未均質脫脂生乳與低階 HTST 脫脂乳之尿酸生 成量之比較.....	51
圖 18	模擬胃液中乳脂肪球之共軛焦距電子顯微鏡圖...	52
圖 19	以脫脂乳稀釋未均質含脂率 20%乳油之上浮的 情況.....	54
圖 20	未均質 20%乳油與均質 20%乳油之尿酸生成量 之比較.....	55
圖 21	生乳油、HTST 乳油與 121°C 乳油其尿酸生成量 之比較.....	57
圖 22	均質 20%乳油熱處理前後之尿酸生成量之比較	58
圖 23	乳脂肪球膜於均質前、後結構之比較.....	59
圖 24	均質與熱處理對於 20%乳油於 45 分鐘之尿酸 總生成量之比較.....	61
圖 25	低黃嘌呤氧化酶活性鮮乳製造流程示意圖.....	62
圖 26	乳油無處理標準化 HTST 鮮乳與乳油經處理再 標準化 HTST 鮮乳(乳脂率 1.5, 3.0%)之尿酸生 成量之比較.....	63

# 表次

	頁次
表 1 牛乳脂質之組成.....	06
表 2 乳脂肪球膜之組成分.....	07
表 3 乳脂肪球膜蛋白質之組成.....	09
表 4 黃嘌呤氧化酶活性於正常腦組織與腦瘤組織中 腦膜瘤及星型細胞瘤之比較.....	31
表 5 牛奶中黃嘌呤氧化酶、鹼性磷酸酶和酸性磷酸 酶組成之活性分佈.....	32
表 6 硫酸銨飽和濃度表.....	37



## I、中文摘要

牛乳中黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOase) 主要存在於牛乳之脂肪球膜(milk fat globule membrane ; MFGM)上，其活性會因不同加工過程而有所變化。本研究旨在探討自牛乳分離之乳油先經熱處理後，續進行乳脂標準化 (standardization)，均質化(homogenization)，再經 HTST (72°C, 15sec)處理後，探討全脂與低脂鮮乳中黃嘌呤氧化酶活性變化之情形。藉由硫酸銨分離純化出牛乳中黃嘌呤氧化酶，再經光電比色儀偵測單位時間內黃嘌呤被轉換為尿酸含量，以作為黃嘌呤氧化酶活性之指標。結果顯示，脫脂乳以 HTST (72°C, 15sec) 處理其黃嘌呤氧化酶活性顯著低於未殺菌處理組 ( $P<0.05$ )。生乳油均質前與均質後差異顯著 ( $P<0.05$ )，且未均質生乳油組之黃嘌呤氧化酶活性顯著高於 121°C, 15min 熱處理組，均質後亦同。乳油經均質及 121°C, 15min 熱處理後回填至脫脂生乳標準化之結果，乳油處理組黃嘌呤氧化酶活性皆顯著低於無處理組 ( $P<0.05$ )，惟全脂鮮乳 (3%)之黃嘌呤氧化酶活性與低脂鮮乳(1.5%)間則無顯著差異。綜上所述，欲降低乳中黃嘌呤氧化酶活性，宜使乳油分離後以商業滅菌處理再回填至脫脂生乳中，後再以 HTST 處理可將黃嘌呤氧化酶活性降至最低，並宜作為改善現行牛乳加工程序以製造低活性黃嘌呤氧化酶鮮乳之參考。

## II、前言

隨著全球化的發展，人類對於食品的追求也隨之提高且更為的全面，於眾多食品工業中「乳品工業」顯得格外的重要，其因於牛乳與乳製品係人類日常食品中富含各種營養素最均衡之食品，除了食品領域外更被廣泛的應用於其他領域。牛乳中之脂肪含量約為 3~5%，除為牛乳主要的風味來源，亦是牛乳中重要的營養來源，其中，乳油更是常被作為製造乳酪 (butter) 或冰淇淋之原料，以及其他乳油製品而廣被使用，惟牛乳與乳油中含有豐富的黃嘌呤氧化酶，雖然目前並無明確證據證明牛乳中含有豐富的黃嘌呤氧化酶與人類心血管疾病有直接相關，但世界衛生組織統計指出，飲用乳品數量愈高的國家，其心血管疾病發生率確實亦較一般國家來的高；且有文獻指出，飲用經均質處理過的鮮乳後，會使人體內血液中黃嘌呤氧化酶之活性從無到被偵測出有活性的程度，這顯示出均質化後黃嘌呤氧化酶伴隨微細化之乳脂肪球，經由腸道直接吸收，而於人體血液內依然具備活性且發揮作用 (Mccarthy and Long, 1976; Ho and Clifford, 1977; Clifford *et al.*, 1983; Michalski *et al.* 2006)。黃嘌呤氧化酶為一含鉬之酵素，在一般的牛乳中含量為 90-160 mg/L，其主要存在於乳脂肪球膜中 (Harrison, 2006; Singh, 2006)，而牛乳內源性之黃嘌呤氧化酶在 91°C, 15 sec. 應可完全失活，但因為脂肪球膜受到均質及加熱殺菌過程中，會吸附酪

蛋白微粒於球膜表面而受到保護 (張, 1983; Michalski *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2004a, b; Michalski and Januel, 2006; Considine *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2008; Claeys *et al.* 2014) ,故而一般殺菌溫度並無法使其完全失去活性,而於鮮乳銷售期會有部分活性恢復之性質 (張, 1983) 。現今國人對於食物安全議題的重視,縱使在牛乳加工技術日益成熟的今天,人們依然對牛乳與乳製品對人類健康之影響存有疑慮(Huth *et al.*, 2006; Jenkins and McGuire, 2006; Claeys *et al.* 2014) ,此現象啟迪吾人針對富含黃嘌呤氧化酶之牛乳脂肪球進行探討,期能在不大幅變動鮮乳生產線之前提下,可降低全脂均質鮮乳中黃嘌呤氧化酶活性之可行方法予以研究。

### III、文獻檢討

隨著全球化的發展和加工技術的成熟，富含營養價值的牛乳普遍成為人類日常飲品，其主要成分一般可區分為總固形分 (total solids) 與水份兩部分，於總固形分中又可在細分為乳脂肪與無脂乳固形分 (solid-not-fat, SNF) (林, 2008)。乳成分中之乳脂肪的處理對於牛乳整體加工流程中之乳油分離後回填之標準化、均質化及加熱殺菌等皆會影響所生產的整體乳品質，被認為係現代鮮乳生產中極重要的部分，再配合不斷改進之脫脂乳處理技術，以生產符合現代人所需求高品質之鮮乳。

#### 一、乳脂肪

牛乳脂肪以中性脂肪 (triglyceride) 為主，加上少量之磷脂質 (phospholipid) 與固醇類 (sterin or sterol) 和其他成分以微細的乳糜狀態 (emulsion) 分散於牛乳之中 (林, 1983)，其不僅與牛乳風味有關，亦為乳油 (cream)、乳酪 (butter) 等乳製品之主成分，一般佔牛乳含量的 3~5% (林, 2008)。牛乳於泌乳期中分泌出無數個大小約為 0.1~25  $\mu\text{m}$  之脂肪球，每 mL 生乳約含 3,000-4,000 萬顆。這些微細脂肪球係由一特殊的外膜所包覆，其膜是由雙層磷脂質與蛋白質所構成，因此將這些膜被定義為乳脂肪球膜 (milk fat globule membrane, MFGM) (Spitsberg, 2005; Morin *et al.*, 2007)。乳脂肪中主要成分大多

為三酸甘油酯，少數二酸甘油酯與一些脂溶性化合物，其組成分如表 1 所示。

## 二、乳脂肪球

乳脂肪在牛乳中係以乳脂肪球的型式均勻分布於牛乳之中，而乳脂肪球的平均粒徑約 4 到 5  $\mu\text{m}$ ，主要由乳脂肪球膜包覆中心的脂滴所形成，其主要成分為磷脂質與蛋白質（表 2），而其結構如圖 1 所示 (Lopez, 2011)，係由雙層磷脂包覆中心之三酸甘油脂所構成。乳脂肪球膜由脂質之核心向外解析，係分別為由磷脂質構成之內單層 (monolayer) 及由極性脂質與蛋白質所構成之外雙層 (bilayer) 所建構而成之三層膜 (trilayer) 結構 (Dewettinck *et al.*, 2008; Lopez, 2011)。乳脂肪球膜上嵌有許多一般統稱為乳脂肪球膜之蛋白質 (MFGM protein)，其主要分別包括黏蛋白 (mucin; MUC)、黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase; XO)、脂親素蛋白 (adipophilin; ADPH)、嗜乳脂蛋白 (butyrophilin; BTN)、脂肪酸結合蛋白 (fatty acid binding protein; FABP) 以及過碘酸-雪夫反應蛋白 (periodic acid schiff reaction; PAS) 等 (表 3)。其中乳脂肪球的分泌與維持球膜穩定性所需蛋白質被認為有黃嘌呤氧化酶、嗜乳脂蛋白及脂親素蛋白三者 (Ogg *et al.*, 2004; Robenek *et al.*, 2006; Le *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2010; Chong *et al.*, 2011)。與人類心血管疾病相關之黃嘌呤氧化酶主要位於內膜上，少

表 1. 牛乳脂質之組成

**Table 1. Gross composition of milk lipids**

	Content in total fat (% , w/w)	Fraction in globule core (%)	Fraction in MFGM <sup>a</sup> (%)	Fraction in skim phase (%)
Neutral glycerides				
Triacylglycerol	95.8-98.3	100		
Diacylglycerol	0.03-0.38	~90	~10	?
Mono-acylglycerol	0.10-0.44	Trace	Trace	Trace
Free fatty acids	0.10	60	~10	30
Phospholipids (incl. sphingomyelin)	0.20-01.11	-	65	35
Cerebrosides	0.1	-	70	30
Gangliosides	0.01	-	~70	~30
Sterols		80	10	10
Cholesterol	0.03-0.46			
Cholesteryl ester	≤0.02			
Carotenoids+Vitamin A	0.002	~95	~5	trace
Vitamin D	~0.0000015	-	-	-
Vitamin E	0.0024	-	-	-
Vitamin K	0.0001	-	-	-

<sup>a</sup> Native milk fat globule membrane.

(張, 1983; Michalski and Januel, 2006)

表 2. 乳脂肪球膜之組成分

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

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

+<sup>a</sup>: present, but quantity unknown.

(Dewettinck, 2008; El-Loly, 2011)

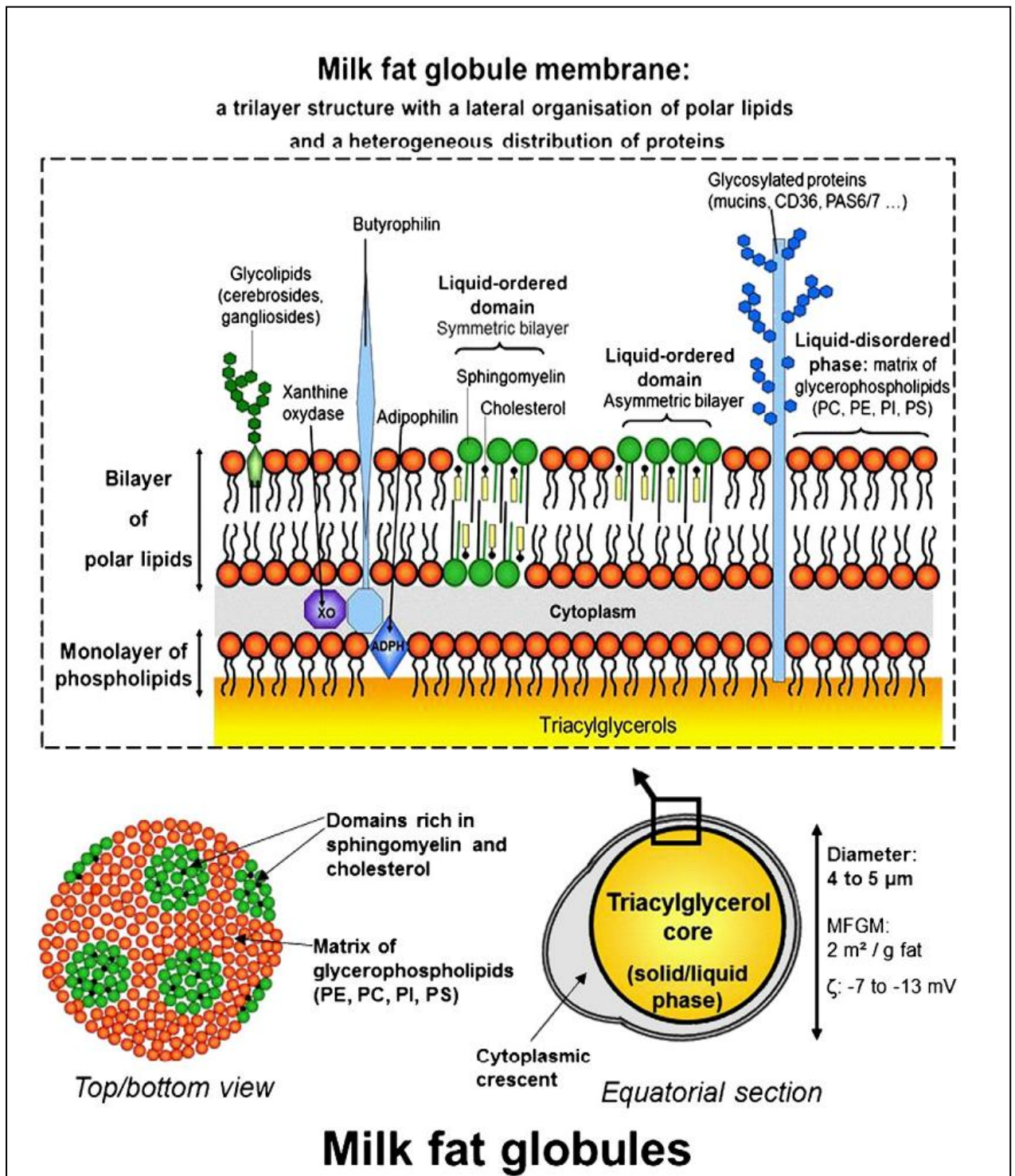


圖 1. 乳脂肪球及乳脂肪球膜之結構。

Fig. 1. Suprastructure of milk fat globules with a schematic representation of the milk fat globule membrane (MFGM).

(Lopez, 2011)



表 3. 乳脂肪球膜蛋白質之組成

**Table 3. Protein components of the milk fat globule membrane**

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

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

(Mather, 2000; Singh, 2006)

數位於外膜表面 (Heid and Keenan, 2005; Michalski and Januel, 2006; Silanikove and Shapiro, 2007)。

### 三、鮮乳之加工流程

原料生牛乳需經淨化、殺菌、冷卻、包裝等處理產製乳製品，其中標準化 (standardization)、均質化 (homogenization) 與熱處理強度為影響鮮乳品質主要之關鍵程序。

#### (一) 標準化

標準化係以調整乳製品脂肪之含量為目的，一般以乳油與脫脂乳為原料。為了合乎市售鮮乳製品之成分規格化，而應用乳油分離機 (separator) 及預備清淨、脫脂與標準化三項功能之三用清淨機 (clarifier) 對其製品之乳脂率加以調整，此即所謂標準化。在大部分的國家均有實施市售乳標準化，而一般會調整乳脂率為 3.0~3.5 % (張, 1983)。我國國家標準 (CNS) 對鮮乳之分級為高脂、全脂、中脂、低脂及脫脂，分別含乳脂率為 3.8% 以上、3.8 ~ 3.0%、3.0 ~ 1.5%、1.5 ~ 0.5% 及 0.5% 以下。

#### (二) 均質化

牛乳未均質化前，其脂肪球直徑通常介於 0.1 ~ 25  $\mu\text{m}$ ，有些甚至可高達 100  $\mu\text{m}$ ，於靜置時，脂肪球會隨靜置時間之延長而逐漸上浮，進而形成乳油層 (cream line) (張, 1983)。均質化為利用均質機

(homogenizer) 以壓力將脂肪球之粒徑均勻縮小至直徑  $1 \sim 2 \mu\text{m}$ ，經此處理後的牛乳脂肪球即不易浮起分離，並緩和風味、增加牛乳白色度，且可改善乳脂肪之消化吸收率以及防止瓶裝後乳脂肪浮起分離所引起的變化 (張, 1983)。均質壓力越大，脂肪球的粒徑將會變得更小。一般於生產線上多採用兩段式均質機 (two stage homogenizer)，於第一段高壓以  $2,000 \sim 3,000 \text{ lb/in}^2$  的壓力下，使牛乳自  $1/100 \text{ nm}$  的細孔中，以  $1/10000$  秒之高速噴出，使其粒徑降至  $1 \sim 2 \mu\text{m}$ ，再經由第二段低壓  $600 \sim 700 \text{ lb/in}^2$  將其均勻分佈於牛乳中。為了防止牛乳均質化前因均質機而造成的細菌污染及脂肪球膜破裂釋出油脂，因此需透過殺菌系統將生乳預熱至  $60^\circ\text{C}$  左右；此外，均質化易造成牛乳中解脂酶 (lipase) 之活化，進而產生脂肪分解臭 (rancid flavor)，因此提高均質溫度可降低解脂酶活性，其最適溫度多控制在  $60 \sim 65^\circ\text{C}$  為佳 (張, 1983; 林, 1993)。

### (三) 熱處理

牛乳為了食品安全與保存而實施殺菌 (pasteurization) 或滅菌 (sterilization) 處理，而牛乳之殺菌或滅菌方法，以加熱處理最為普遍。殺菌與滅菌之差異在於前者是以加熱處理來消滅病原菌，並抑制其他微生物的發育，因此是允許無害菌及乳酸菌之存在。由於病原菌中以結核菌之耐熱性最高，故其殺菌溫度及時間仍依照結核菌死滅為標準

而訂之；滅菌則為將一切微生物完全殺滅，使牛乳成為無菌狀態而可長期保存 (林, 2008) 。目前加熱處理殺菌方法種類可依照加熱溫度與時間長短不同分為以下幾種：

1. 低溫長時間殺菌法 (low temperature long time pasteurization)：簡稱 LTLT 殺菌法，為法國著名學者 Louis Pasteur (1822 ~ 1895) 確立之葡萄酒殺菌法，其作為牛乳之殺菌法曾風行一時。其熱處理條件為 61 ~ 65°C、30 分鐘以上。由於此法殺菌前、後加熱及冷卻時間較長，故處理能力較差 (林, 2008) ，故現今市售鮮乳甚少使用此法。

2. 高溫短時間殺菌法 (high temperature short time pasteurization)：簡稱為 HTST 殺菌法，為取代 LTLT 殺菌法而普及之方法。採用板式或管式熱交換機 (plate or tubular heat exchanger) 利用冷熱交換而達連續式殺菌之方法，其熱處理條件為 71.1°C、16 秒鐘以上，一般採用 70 ~ 75°C、15 ~ 16 秒鐘以上 (張, 1983; 林, 2008) ，由於操作符合節省能源又可連續進行，故為現今各國市售鮮乳最常見的殺菌方法。

3. 瓶裝滅菌法 (in bottle sterilization)：此法能將玻璃瓶及內裝之乳品中所有微生物殺死，延長保存期限，加熱條件為 121°C、12 ~ 15 分鐘，由於長時間高溫處理會使牛乳褐色化，以及乳成分易發生變化與破壞，故現今較少使用 (林, 2008)。

4. 超高溫瞬間滅菌法 (ultra high temperature sterilization)：簡稱 UHT 滅菌法，為現今市售乳中最普遍的殺菌法，其熱處理分兩階段，第一階段先將牛乳以 80 ~ 85°C、2 ~ 6 秒鐘預熱後，再進行第二階段以 130 ~ 150°C、0.5 ~ 4 秒鐘加熱方式滅菌。一般若於無菌室內配合無菌包材即可為室溫存放之保久乳 (long-life milk)，但若使用未滅菌之包材則為須冷藏販售，且具有一定保存期限之市售鮮乳 (林, 2008)。

#### 四、黃嘌呤氧化還原酶

黃嘌呤氧化還原酶 (xanthine oxidoreductase; XOR)，最早於 1902 年由 Schardinger 在牛乳中所發現之酵素。在牛乳中具有兩種可互相轉換之型態，一種是黃嘌呤脫氫酶 (xanthine dehydrogenase; XDH)，另一種則為黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase; XOase)，兩者間的差異為 XOase 只能還原氧，而 XDH 除了能還原氧之外，亦可還原  $\text{NAD}^+$ ，但是兩種型式皆能催化次黃嘌呤 (hypoxanthine) 轉化成黃嘌呤 (xanthine) 及將黃嘌呤再轉化成尿酸 (uric acid) (Schardinger, 1902; Stirpe and Della Corte, 1969; Waud and Rajagopalan, 1976; Hille and Nishino, 1995; Harrison, 2002; Berry and Hare, 2004; 陳, 2007)。

黃嘌呤氧化酶於 1955 年由 Avis *et al.* 將此酶單離、結晶純化，且此酶主要存在於牛乳之乳脂肪球膜中，於人、馬、豬乳中被發現的含量

極低 (Trotta *et al.*, 1976; 林, 1978; Spitsberg and Gorewit, 1998; Ö zer *et al.*, 1999) 。

### (一) 黃嘌呤氧化還原酶之結構

XOR 之共同作用因子主要有三個區域，分別為含鉬之蝶呤區域 (molybdopterin, Mo-Co)、雙鐵硫中心 ( $\text{Fe}_2\text{-S}_2$ )、黃素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD)，如圖 2 所示 (Amaya *et al.*, 1990; Hille and Nishino, 1995; Enroth *et al.*, 2000; Harrison, 2002; Berry and Hare, 2004)。XOR 為每一分子量約 150 KDa 之獨立催化次單元所組成之同源二聚體 (homodimer) 結構 (Berry and Hare, 2004)，每個次單元中具有張力使得整個複合體結構形成蝶形，而每個次單元由特定輔酶 (coenzyme) 所組成三個作用區域 (domains) (圖 3)。而各輔酶中，分別存在於 85 KDa 胺基酸碳端碎片 (fragment) 末端、20 KDa 胺基酸氮端碎片末端，以及 40 KDa 中間體碎片位 (Hille *et al.*, 1995)，各輔酶間的距離如圖 4 所示。其中 N 端作用區 (N-terminal domain) 是由兩個次作用區組成，每個次作用區中具有一個鐵硫中心 ( $\text{Fe}_2\text{-S}_2$ )，由四個半胱胺酸殘基 (cysteine residue) 固定，其後有兩條連接胜肽，一條狀如一有深度的口袋緊密的連接 FAD 中的黃素環與鐵硫中心，另一條則是連接 FAD 作用區與 C 端作用區 (C-terminal domain)，此區為最大的作用區，亦是 Mo-Co 結合位置 (Mendel, 1983; Enroth *ea*

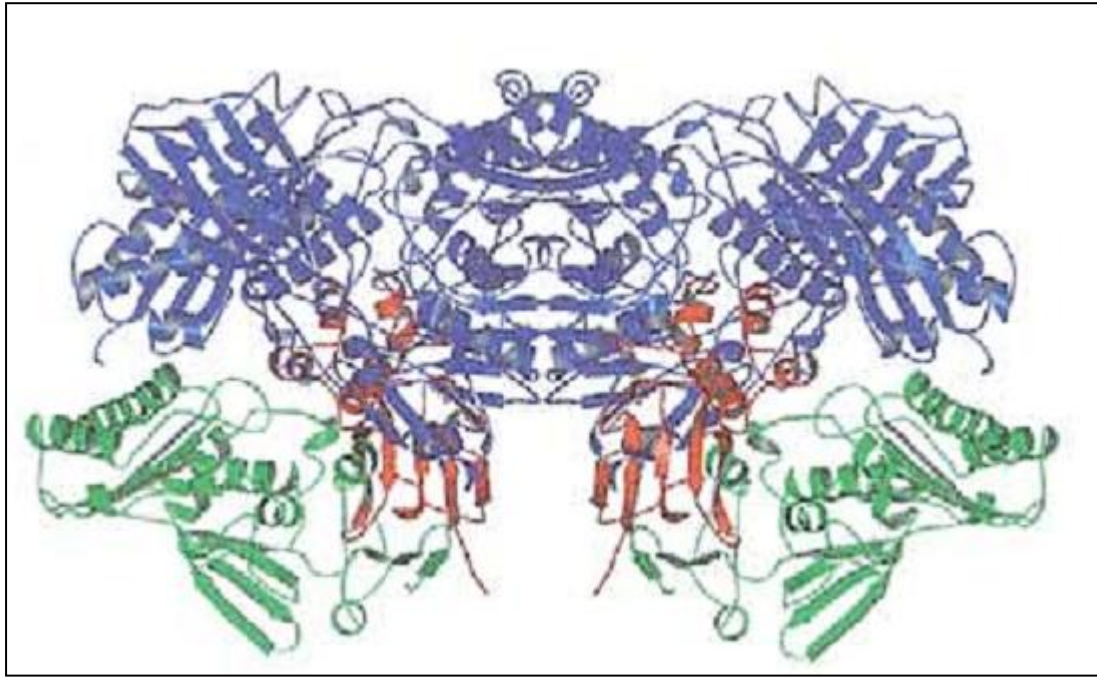


圖 2. 黃嘌呤氧化還原酶結構圖。藍色為 Mo—Co domains;  
紅色為 Fe<sub>2</sub>—S<sub>2</sub> center; 綠色為 FAD。

**Fig. 2. Structure of xanthine oxidoreductase. The Mo—Co domains,  
Fe<sub>2</sub>—S<sub>2</sub> center and FAD are shown in blue, red and green.**

(Harrison, 2002)

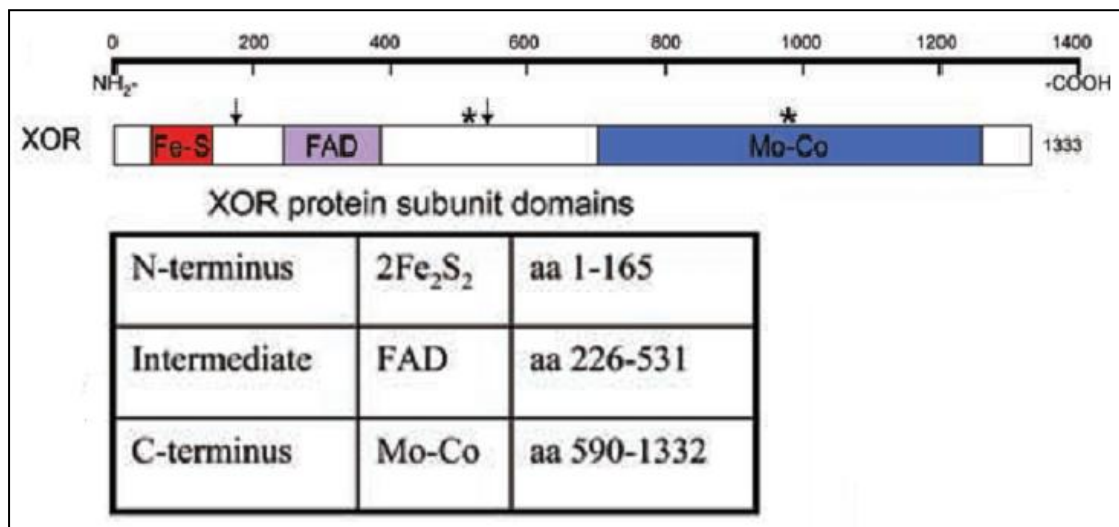


圖 3. 黃嘌呤氧化還原酶之二級結構、XOR 次單元作用區、位置與相關輔因子。

Fig. 3. Secondary structure of XOR, XOR subunit domains, their size, and their associated cofactors.

(Berry and Hare, 2004)



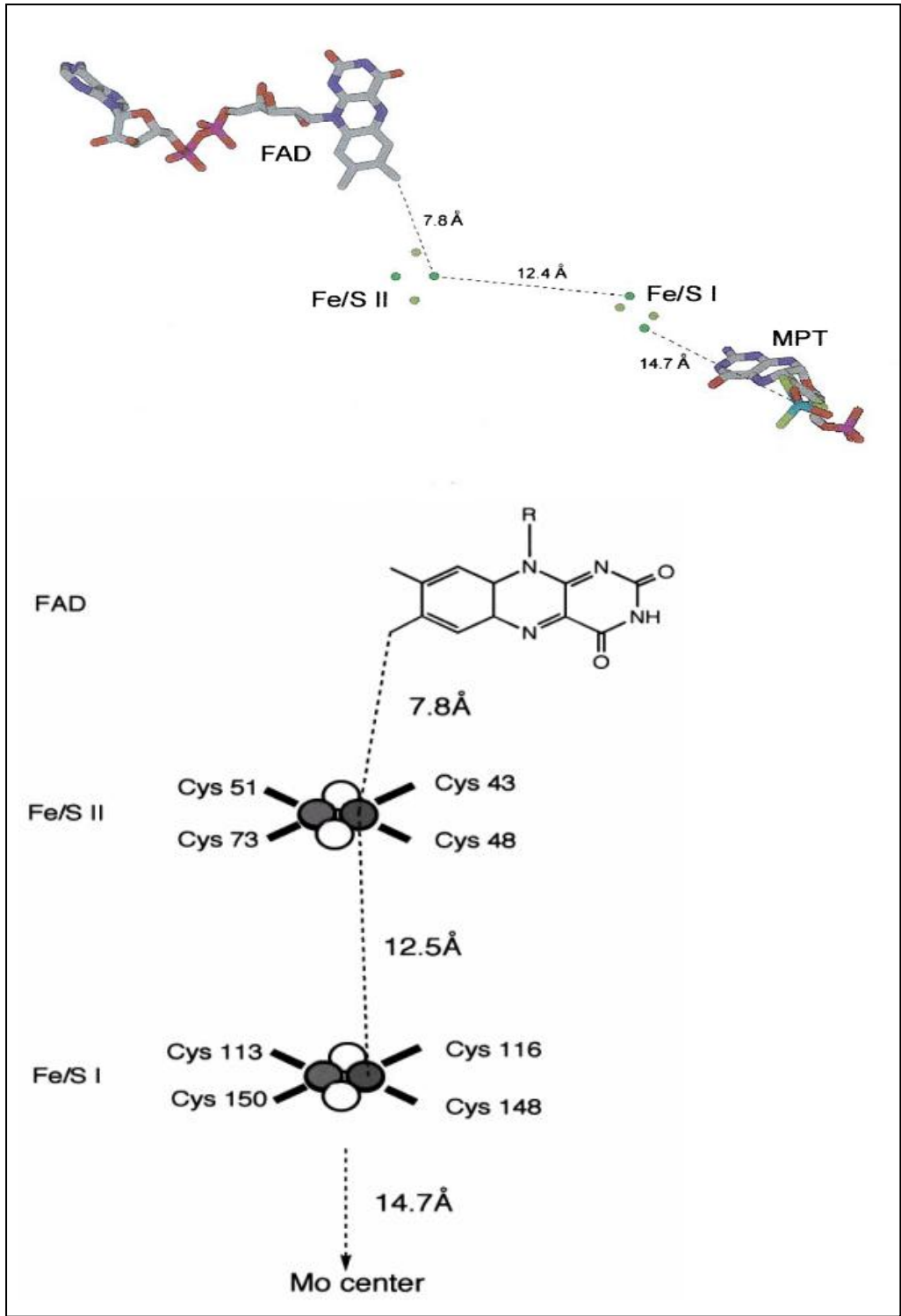


圖 4. 黃嘌呤氧化還原酶之各輔因子間的距離。

Fig. 4. The arrangement of the coenzyme in one subunit of xanthine oxidoreductase are presented.

(Nishino *et al.*, 2000; Harrison, 2002)

*al.*, 2000; Berry and Hare, 2004) 。Mo—Co 結構具有有機蝶呤衍生物 (molybdopterin)，其上含有二硫側鏈環化物 (如圖 5A)，與鉬 (Mo) 合在一起形成一個鉬原子 (Mo atom) ；而鉬本身為一個五配位體 (pentacoordinated)，具有兩個氧原子與一個硫原子，並透過蝶呤上的二硫側鏈與蝶呤鍵結 (如圖 5B)，且在整個化合物有活性 (active) 時，硫基型態會被釋出；相反的若在無活性 (inactive) 時，會去除硫基型式，即  $\text{Mo}=\text{S}$  會被取代轉變為  $\text{Mo}=\text{O}$  (Mendel, 1983; Enroth *et al.*, 2000; Nishino and Okamoto, 2000; Berry and Hare, 2004) 。

## (二) 黃嘌呤氧化還原酶之特性與催化反應機制

Nishino 團隊曾在 2000 年時，利用 X-ray 解析出牛乳中黃嘌呤氧化還原酶之結構，並證實牛乳中黃嘌呤氧化酶與老鼠及人類皆有相似的胺基酸序列 (Enroth *et al.*, 2000) 。而黃嘌呤氧化還原酶在生物體中，分子量約為 290 KDa，以均相二聚體 (homodimer) 形態存在。在各組織正常活動下，大都以黃嘌呤脫氫酶 (xanthine dehydrogenase, XDH) 型態存在，但是當進行限制蛋白分解作用 (limited proteolysis)、加熱 (37°C)、冷凍 (-20°C) 或處在無氧 (anaerobiosis) 條件下時，XDH 就會轉化成具氧化作用的黃嘌呤氧化酶 (Corte *et al.*, 1969; Stirpe and Corte, 1969; Mendel, 1983; 曹, 1997; Berry and Hare, 2004) 。

兩種型態的催化反應均牽涉到相似的受質，但其不同點在於它們有不

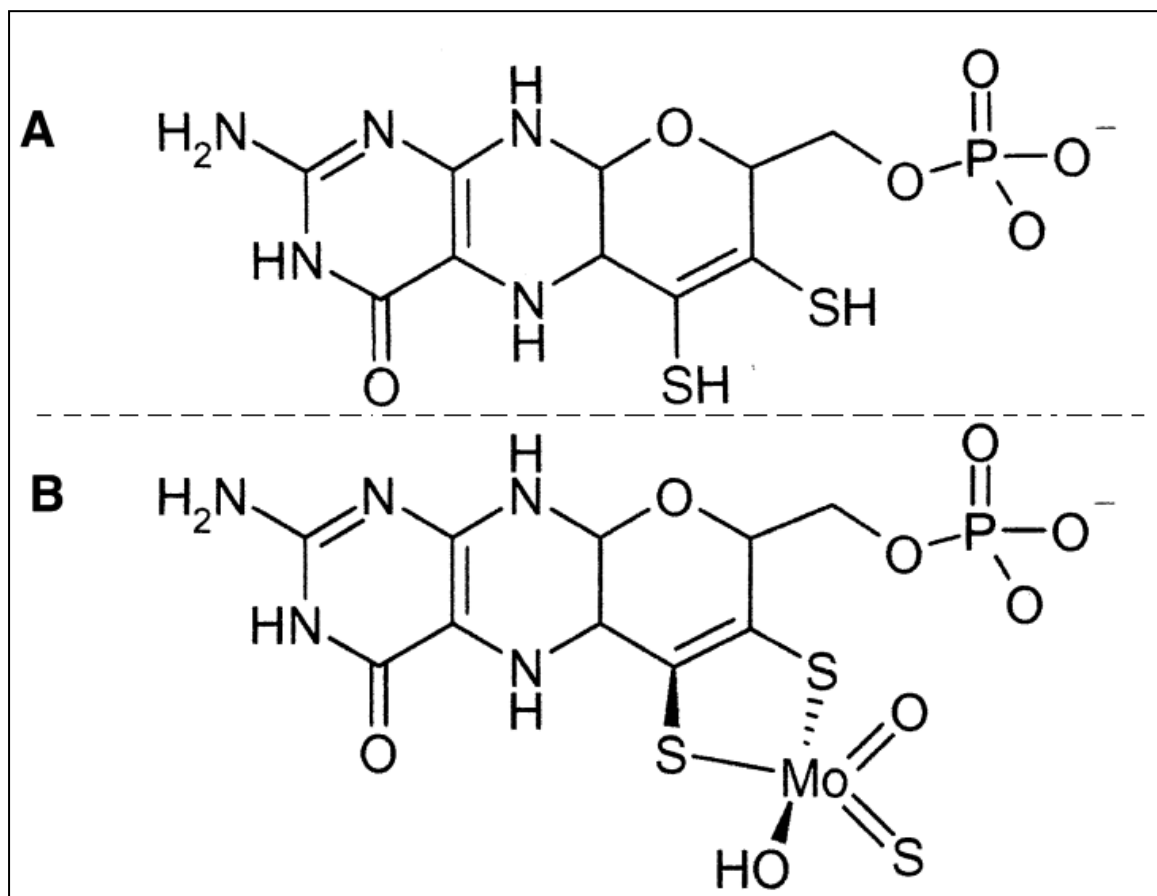


圖 5. Mo—Co 之化學結構圖； A：鉬蝶呤； B：鉬輔因子。  
 Fig. 5. Chemical structure of Mo—Co. (A) Molybdopterin (B) The molybdenum cofactor.

(Harrison, 2002)

同的電子接受者 (electron acceptor) ，黃嘌呤脫氫酶是以  $\text{NAD}^+$  作為電子接受者，黃嘌呤氧化酶則是以  $\text{O}_2$  作為電子接受者；而當兩種型態同時存在時，可以同時以  $\text{NAD}^+$  及  $\text{O}_2$  為電子接受者，如圖 6 所示 (曹, 1997; Enroth *et al.*, 2000; Harrison, 2002; Berry and Hare, 2004; Silanikove *et al.*, 2005; Boueiz and Hassoun, 2008) 。黃嘌呤氧化酶有無活性，主要取決於其結構上的金屬 Mo 原子，根據文獻顯示，在哺乳動物乳汁中，如人乳、牛乳、羊乳等，不論何種乳汁中，若其 XOase 上缺乏 Mo 元素，或是酵素中心的 Mo 上鍵結之硫原子被替換成氧原子時，則會使酵素失去活性。簡言之，XOase 上的有無 Mo 以及 Mo 上是否鍵結硫原子，皆會影響酵素本身的活性 (Benboubetra *et al.*, 2004; Egwim *et al.*, 2005; Godber *et al.*, 2000) 。如前述黃嘌呤氧化還原酶之兩種型態皆能催化次黃嘌呤轉化成黃嘌呤及黃嘌呤轉化成尿酸，其氧化與還原之半反應如圖 7 所示。氧化態的黃嘌呤氧化酶，可催化如嘌呤、嘧啶或含有醛基之受質，其藉由輔酶間的電子傳遞來催化受質中的烷基 (R-H) 氧化成醇基 (R-OH) ，其羥基化反應為 (陳, 2005) ：



圖 8 中說明黃嘌呤氧化酶進行還原反應時，其位置是發生在 Mo-Co 位置上，其氧化態的 Mo (VI) 接受了受質 xanthine 所釋出的兩

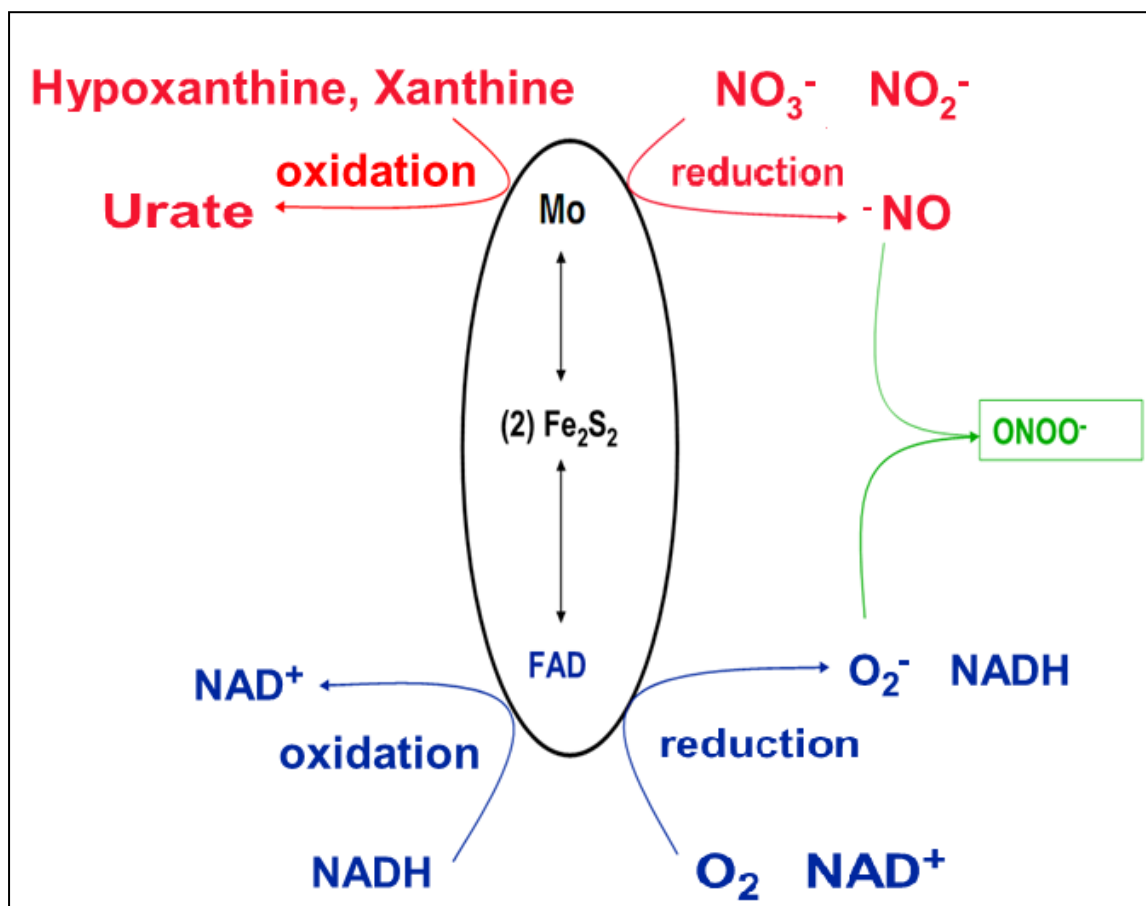


圖 6. 黃嘌呤氧化還原酶之催化反應。

Fig. 6. The reaction catalyzed by xanthine oxidoreductase.

(Boueiz and Hassoun, 2008)

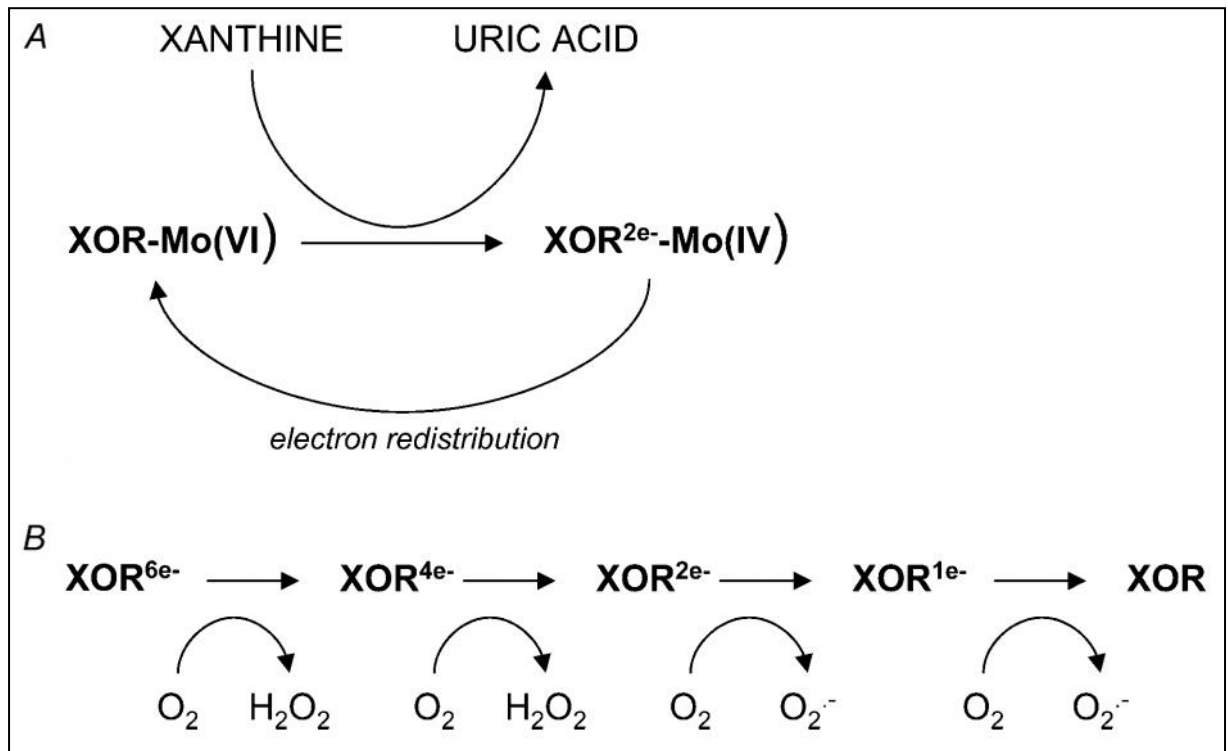


圖 7. 黃嘌呤氧化還原酶與黃嘌呤之作用機制。A.為還原半反應；  
B.為氧化半反應。

**Fig. 7. Mechanism of XOR reaction with xanthine. A, reductive half-reaction. B, oxidative half-reaction.**

(Berry and Hare, 2004)

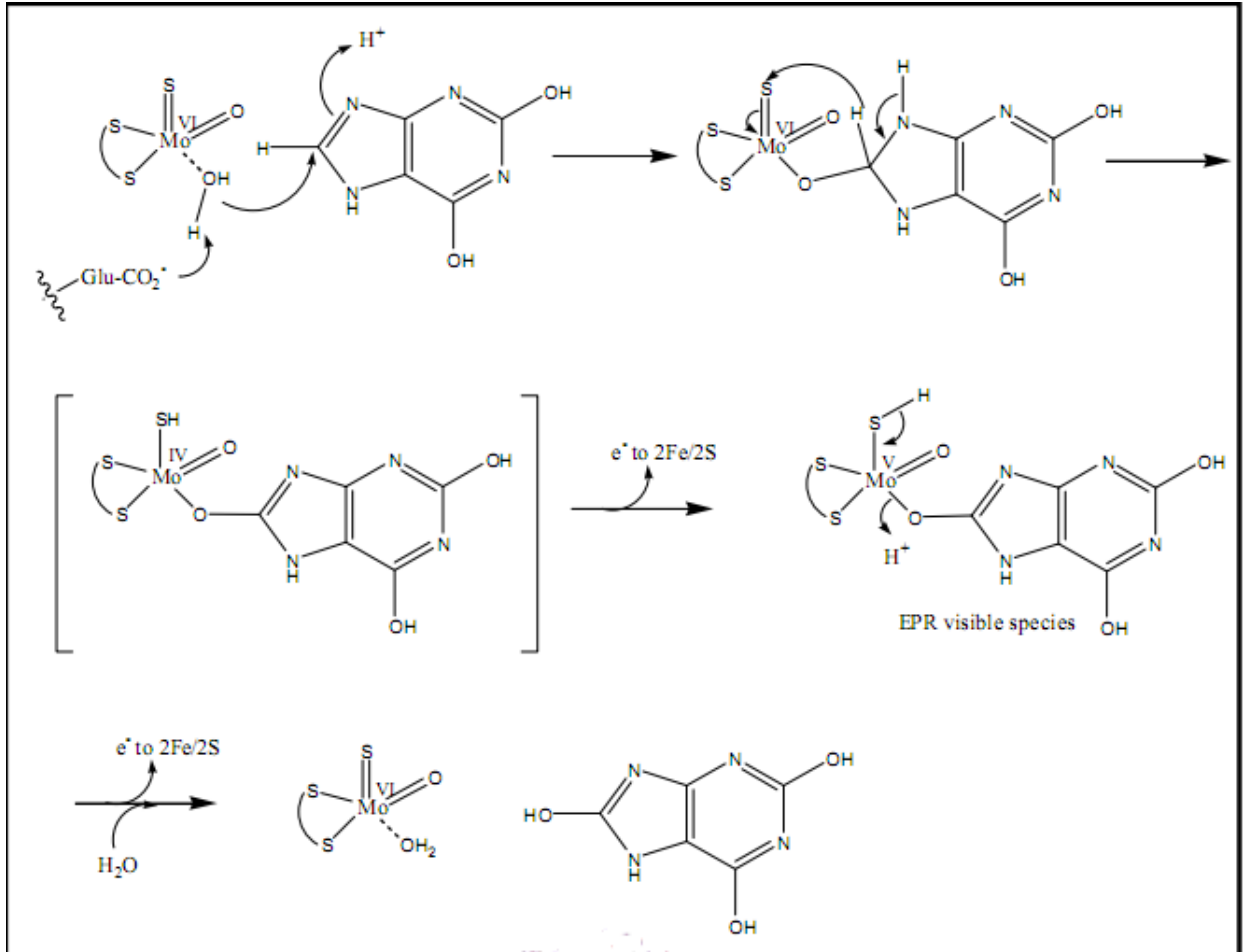


圖 8. 黃嘌呤氧化酶催化黃嘌呤之作用機制。

Fig. 8. Mechanism of Xanthine oxidase reaction with xanthine.

(Hille, 1996)

個電子形成轉變成還原型態的 Mo (IV)，而受質形成產物 uric acid 後離開，之後 XOase 經分子內的電子傳遞 (intraenzyme electron transfer)，將電子傳給  $\text{Fe}_2/\text{S}_2$  (I)，再傳到  $\text{Fe}_2/\text{S}_2$  (II)，接著傳遞至 FAD，使 FAD 生成  $\text{FADH}_2$ ，最後由氧氣接受兩個電子形成  $\text{O}_2^-$  (superoxide) 及過氧化氫 (hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 等自由基 (free radicals)，因此黃嘌呤氧化酶之催化主要是藉由氧化與還原之半反應，在 Mo-pt 進行還原半反應；在  $\text{FADH}_2$  進行氧化半反應 (Bray *et al.*, 1964; Palmer *et al.*, 1964; 黎, 2004; 陳, 2007; Boueiz and Hassoun, 2008; Kelley *et al.*, 2010)。此外，圖 9 也說明氧氣透過 XO 的催化反應而接受電子後之產物，取決於環境中氧氣濃度的多寡來決定其產物會形成  $\text{O}_2^-$  或是  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，當厭氧環境且受質嘌呤濃度達飽和的情況下，氧氣接受電子後易形成  $\text{H}_2\text{O}_2$ ；隨著環境中氧氣濃度的增加會使最終產物偏向形成  $\text{O}_2^-$  (Kelley *et al.*, 2010)，而這些自由基均將會對動物健康產生不良影響。

### (三) 黃嘌呤氧化酶之生理功能與相關疾病之關係

於人體中黃嘌呤氧化酶在肝臟及空腸 (jejunum) 含量最多，在活體組織內，主要負責的是嘌呤類物質的代謝，其將次黃嘌呤氧化成黃嘌呤，再將黃嘌呤氧化成尿酸。一般正常生理狀態下，黃嘌呤氧化酶是不會出現在人體血液之中 (黃, 2013)。當黃嘌呤被轉為尿酸之過



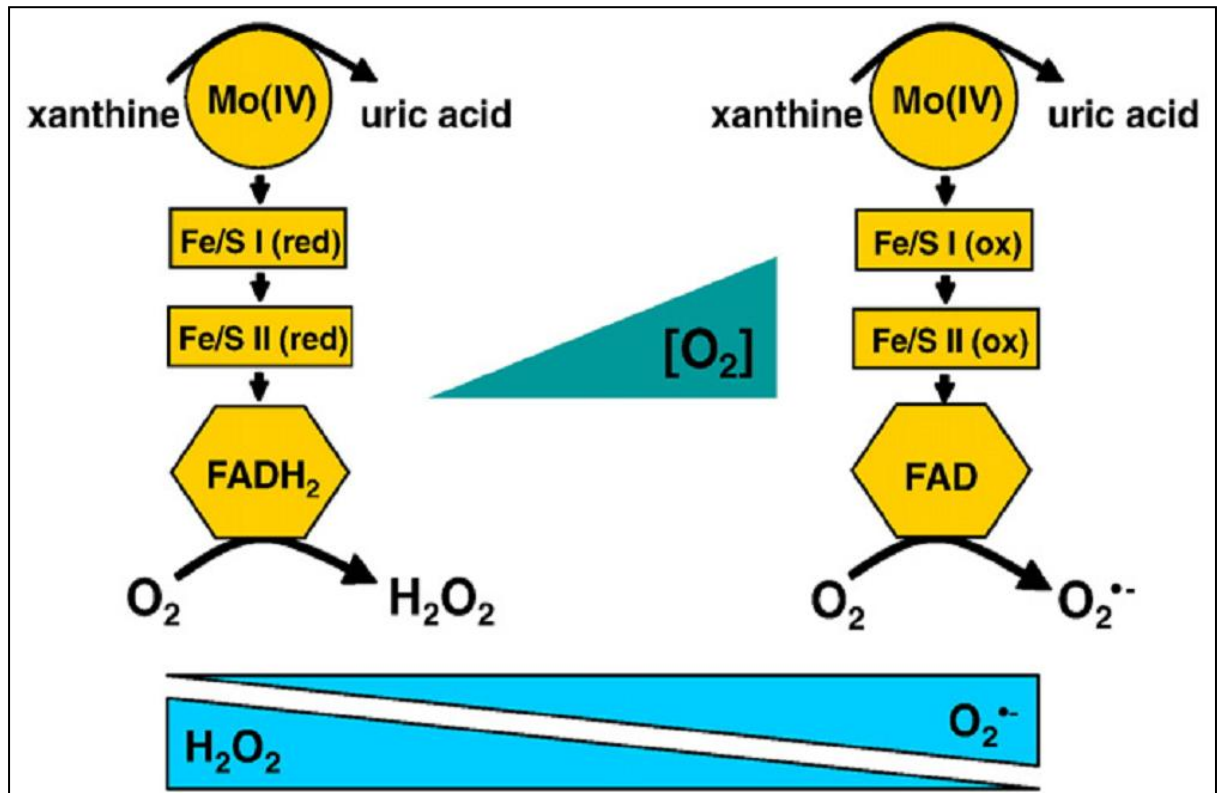


圖 9. 氧氣對於 XOR 最終電子接受者之產物的影響。

Fig. 9. Effect of O<sub>2</sub> in XOR reaction with the last electron acceptor of product.

(Kelley *et al.*, 2010)

程中會釋放超氧化自由基，因而被推斷與許多人類疾病的發生機制產生關聯。此外，亦有研究顯示黃嘌呤氧化酶與其另一種形式之黃嘌呤脫氫酶在小腸與肝臟中對於鐵的吸收與代謝均扮演重要之角色 (Mazur and Carleton, 1965; Dawson *et al.*, 1970; Martelin *et al.*, 2002) 。與黃嘌呤氧化酶直接有相關的疾病包含痛風 (gout)、心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD)、缺血再灌流傷害 (ischemia-reperfusion injury)、腦瘤 (brain tumor) (張, 2009) 等，茲逐一簡述如後。

## 1. 痛風

痛風一詞源自於拉丁文 Guta，係指一滴滴有害體液所造成關節受傷害，其主要是由於血液中尿酸結晶 (urate crystals) 沉積於關節之結締組織 (connective tissues) 中，嚴重時有些甚至會沉積到身體各部位，包括皮下組織、軟骨以及腎臟等，為一種急性且反覆發作之疾病且主要好發於 40 歲以上成年男子與停經後婦女。尿酸之產生主要是由細胞代謝分解的核酸和其他嘌呤類及食物中的嘌呤經黃嘌呤氧化酶轉化而來。人體中嘌呤類之代謝主要在肝臟、小腸以及腎臟中進行。尿酸結晶的產生主要是由於血液中尿酸濃度過高所導致，約有 85% 的痛風症狀是發生於大腳趾關節上。痛風在臨床上主要包含無症狀高尿酸血症、急性痛風性關節炎、慢性痛風性關節炎、痛風性腎臟病變以及尿路結石等，其中高尿酸血症在臨床上無明顯症狀 (顏, 1997;

Fang, 2000; Yu and Luo, 2003; Janssens *et al.*, 2006; Yu, 2007) ，但亦有研究指出高尿酸血症與心血管疾病死亡率呈現正相關，且亦為影響缺血性中風、糖尿病與高血壓之獨立危險因子 (黃, 2012) 。

## 2. 心血管疾病

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 係指心臟、冠狀動脈以及腦血管方面病變之總稱。主要包含心臟麻痺、心肌梗塞、出血性心臟衰竭、高血壓、腦中風、冠心症 (coronary artery disease, CAD)、缺血性心臟病 (ischemic heart disease)、高膽固醇血脂 (hypercholesterolemia)、周邊血管疾病以及動脈粥狀硬化症 (atherosclerosis) 等。根據行政院衛生署公布 100 年國人十大主要死因順序其中心血管與腦血管疾病分別佔第二與第三名，可見其防治之重要性。而造成心血管疾病之主因在於動脈病變，而動脈病變中有 70% 是由於血管阻塞形成血栓 (fibrin) 所致，另外 30% 則是因血管硬化導致心臟衰竭。一般血液中出现血栓時，血纖維蛋白溶解酶 (fibrin plasmin) 可直接將其溶解，然而如黃嘌呤氧化酶經腸道直接被吸收進入血液中時，由於血纖維蛋白溶元 (fibrin plasminogen) 會促使血纖維蛋白溶解酶之前驅物血纖維蛋白溶酶元無法合成血纖維蛋白溶解酶，即無法溶解血栓，進而導致血管壁失去平滑性，引起血管粥狀化之病變。此外，有研究指出，不論是高血壓、高膽固醇血脂、冠心病

與動脈硬化者，其內皮或血清中之黃嘌呤氧化酶活性，皆較一般正常者要高（施與范, 2001; Doehner *et al.*, 2002; Landmesser *et al.*, 2002; 蘇, 2003; Spiekermann *et al.*, 2003; Spitsberg, 2005; Chien, 2007; Doehner and Landmesser, 2011; Puddu *et al.*, 2012)。

### 3. 缺血再灌流傷害

缺血 (ischemia) 是指身體的局部因血管堵塞或其他原因所造成缺血之現象。再灌流 (reperfusion) 為短暫時間的缺血後，重新將血液導入該段血管之情形。缺血性再灌流傷害指的是通常在心肌梗塞、中風以及外科手術的過程中，均會有短暫性缺血現象發生，在缺血過程中組織無法獲得氧氣，進而細胞會快速代謝 ATP (速率為正常狀態下之 18 倍)，同時會產生大量之次黃嘌呤 (hypoxanthine)，此外黃嘌呤脫氫酶則又因缺氧而經蛋白質水解轉變成黃嘌呤氧化酶，此際黃嘌呤氧化酶以及次黃嘌呤所累積的量與活性即會隨著時間而增加，當血液重新再灌流回組織細胞中時，大量的黃嘌呤氧化酶與次黃嘌呤會快速反應，產生大量的超氧陰離子 ( $O_2^-$ ) 與  $H_2O_2$  等自由基，進而對組織造成傷害 (Granger, 1988; Friedl *et al.*, 1990)。雖然  $H_2O_2$  本身對組織傷害較小，但是細胞中同時存在許多金屬離子時， $H_2O_2$  與金屬離子會以  $Fe^{2+}$  作為催化劑產生 Fenton reaction，形成反應性極強之羥基自由基 (hydroxyl radical,  $\cdot OH$ )，會攻擊細胞膜上之不飽和脂肪

酸，造成脂質過氧化反應 (lipid peroxidation)，導致組織永久性損害，亦會衍生細胞凋亡、DNA 斷裂及基因突變並導致癌症等 (圖 10) (Granger, 1988; Friedl *et al.*, 1990; Priambodo *et al.*, 2011)。

#### 4. 腦瘤

腦瘤發生的原因主要為腦組織細胞發生不正常分裂、增殖，形成腫塊，並侵佔腦部空間與損害腦細胞組織。有文獻指出腦瘤組織中黃嘌呤氧化酶活性比正常腦組織中高出一倍以上，其中又以腦膜瘤 (meningioma) 與星形細胞瘤 (astrocytoma) 中黃嘌呤氧化酶的活性為最高 (表 4) (Kökoglu *et al.*, 1990; 曹, 1997)。

此外，亦有許多證據顯示，肝炎 (hepatitis)、糖尿病 (diabetes)、胰臟癌 (pancreatic cancer) 等病症患者，其血液中黃嘌呤氧化酶的活性均會升高 (Battelli *et al.*, 2001; Shamma'a *et al.*, 2005; Seoyoung *et al.*, 2015)。由於牛乳脂肪球含有較一般食材中更多黃嘌呤氧化酶，且當牛乳經均質後，細微之脂肪球及其類似微脂粒 (liposome) 之結構，極有可能直接透過小腸黏膜而進入血液中 (Clifford *et al.*, 1983; Michalski *et al.*, 2006)，並造成如上述之各種慢性疾病之形成，另亦有研究指出牛乳中之乳清膜顆粒 (whey membrane particles, WMP) 亦有許多黃嘌呤氧化酶存在 (如表 5) (Silanikove and Shapiro, 2007)。

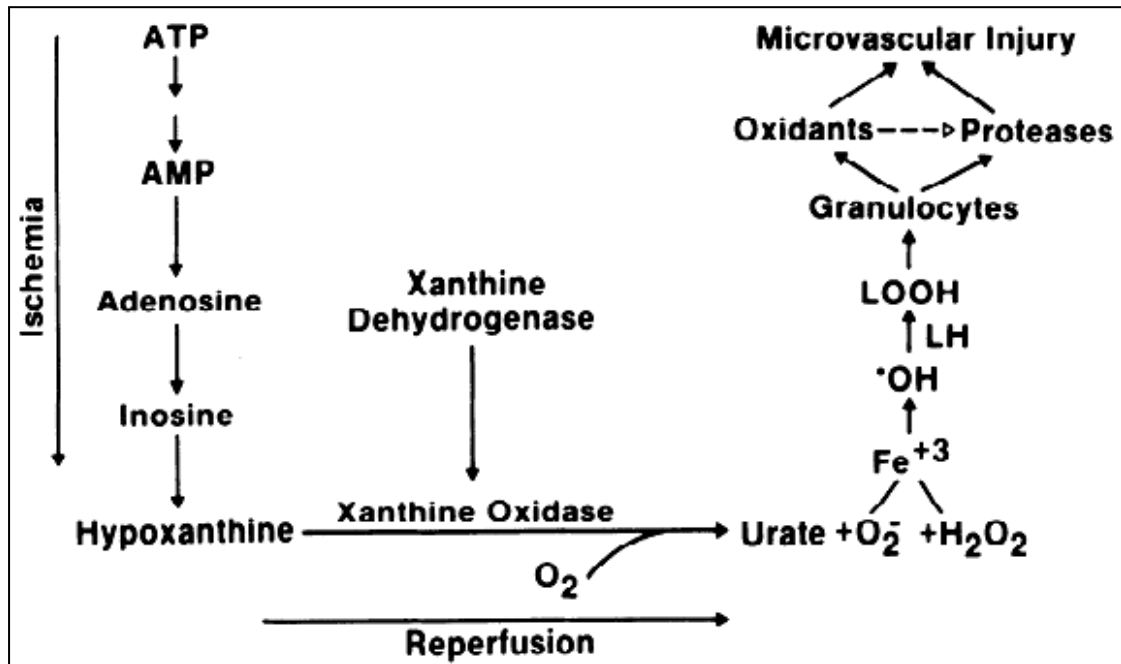


圖 10. 缺血再灌流傷害發生原因之作用機轉。

Fig. 10. The cause of mechanism of ischemia-reperfusion injury.

(Granger, 1988)

表 4. 黃嘌呤氧化酶活性於正常腦組織與腦瘤組織中腦膜瘤及星形細胞瘤之比較

**Table 4. Xanthine oxidase levels in normal and tumoral brain tissues ( $P<0.001$ ) and in meningioma and astrocytoma ( $P>0.05$ )**

Tissue	No. of samples	Xanthine oxidase activity (munits/mg protein)
Normal brain tissue	10	1.0645±0.42
Tumoral brain tissue	20	2.339±0.44
Astrocytoma	10	2.345±0.448
Meningioma	10	2.335±0.454

(Kökoglu *et al.*, 1990)

表 5. 牛奶中黃嘌呤氧化酶、鹼性磷酸酶和酸性磷酸酶組成活性分佈

**Table 5. Distribution of xanthine oxidase, alkaline phosphatase and acid phosphatase activities in milk fractions (mean±SD)<sup>a</sup>**

	Xanthine oxidase (% of total)	Alkaline phosphatase (% of total)	Acid phosphatase (% of total)
Whole milk	100±5	100±5.5	100±6.6
Fat <sup>b</sup> (MFGM)	33.0±6	45.3±6.6	47.8±6.0
Skim milk	67.0±7	54.7±6.6	52.2±6.7
Casein	3.3±1.5	0±0	0±0
WMP	20.5±5.5	38.6±6.4	34.1±6.1
Effectively soluble <sup>c</sup>	43.2±6.0	16.1±4.8	18.1±7.1

<sup>a</sup> Xanthine oxidase activity in whole milk was 50.1mUmL<sup>-1</sup> (SD=5.6), alkaline phosphatase activity was 2.5UmL<sup>-1</sup> (SD=0.5) and acid phosphatase activity was 0.75UmL<sup>-1</sup> (SD=0.1).

<sup>b</sup> It is assumed that activity in the fat fraction was concentrated on the milk fat globule membrane (MFGM).

<sup>c</sup> Effectively soluble activity refers to the activity in skim milk devoid of both casein (whey, or milk serum) and whey membrane particles (WMP).

(Silanikove and Shapiro, 2007)



有見於此，本研究之構想即擬針對富含黃嘌呤氧化酶之牛奶脂肪球進行探討，期能在不大幅變動鮮乳生產線之前提下，研究可以降低全脂、低脂均質鮮乳中黃嘌呤氧化酶活性之方法，供業界參考。

## IV、材料方法

### 一、試驗材料及藥品

(一) 乳原料：取自東海大學乳品加工廠之生乳和乳油 (cream；乳脂率為 46% 以上)。乳樣品處理如下：

1. 成分無調整 (original raw milk) 經 60°C 預熱之無均質生乳 (含脂率 3.0~3.8%)。
2. 標準化至含脂率 3.5% 經 60°C 預熱之無均質生乳。
3. 無均質生乳油。
3. 無均質脫脂生乳。
4. 無均質 HTST (72±1°C，15 sec) 鮮乳 (乳脂率 3%)。
5. 無均質強度 HTST (72±1°C，15 sec) 脫脂鮮乳。
6. 成分無調整經 60°C 預熱之均質生乳。
7. 標準化至含脂率 3.5% 經 60°C 預熱之均質生乳。
8. 滅菌釜 121°C，15 min 處理之乳油 (乳脂率 30%)。
9. 滅菌釜 (121°C，15 min) 處理之乳油回填膜過濾之脫脂生乳均質後再以 HTST(72, 15sec)之標準化鮮乳 (3% 乳脂率)。
10. 滅菌釜 (121°C，15 min) 處理之乳油回填膜過濾之脫脂生乳均質後再以 HTST(72, 15sec)之標準化鮮乳 (1.5% 乳脂率)。

率)。

(二) 乳脂率測定所需硫酸之配置 (sulfuric acid ;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  , FW = 98.08) : 購自聯工化學廠股份有限公司, 台灣。製備條件依東海大學乳品加工廠測定乳脂率之方法配置, 冬季為 500 mL 濃硫酸加入 70 mL 去離子水中; 夏季為 500 mL 濃硫酸加入 80 mL 去離子水中。

(三) 自製不鏽鋼漿片模型 (圖 11)。

(四) 甲苯 (toluene ;  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  , FW=92.13) : 購自 J. T. Baker 公司, 美國。取甲苯溶液溶於 250 mL 乳樣品中至 3%。

(五) 乙二胺四乙酸二鈉 (ethylene diamine tetracetic acid, EDTA :  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  , FW=372.24) , 購自藥理化學工業株式會社, 日本。取 EDTA 粉末 0.1861 g 溶於 250 mL 乳原料中至 2mM。

(六) 硫酸銨 (ammonium sulfate ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  , FW=132.14) : 購自百瑞克公司 (Panreac Quimica S. A. U.) , 歐盟。先將硫酸銨研磨至粉狀, 至恆溫箱 (約  $70^\circ\text{C}$ ) 內乾燥至少兩小時後, 置於血清瓶內保存備用; 38% 及 50% 飽和硫酸銨則分別測量過濾牛乳樣品的量後依飽和硫酸銨飽和濃度表 (表 6) 查表推算之。

(七) 三羥甲基氨基甲烷鹽酸鹽 (trizma hydrochloride ;



圖 11. 實驗自製不鏽鋼漿片模型。

Fig. 11. The experimental special stainless steel lodicule model .

表 6. 硫酸銨飽和濃度表

Table 6. Ammonium sulfate saturation concentration table

0°C	Final concentration of ammonium sulfate saturation percentage																
	Add 1 L solution of solid ammonium sulfate grams																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100		
The initial percentage saturation concentration of ammonium sulfate	0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	603	697	0
	20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	469	557	20
	25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	436	522	25
	30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	402	488	30
	35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	369	453	35
	40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	335	418	40
	45						0	29	59	90	123	156	190	226	302	383	45
	50							0	30	60	92	125	159	194	268	348	50
	55								0	30	61	93	127	161	235	313	55
	60									0	31	62	95	129	201	279	60
	65										0	31	63	97	168	244	65
	70											0	32	65	134	209	70
	75												0	32	101	174	75
	80													0	34	139	80
	90														0	70	90
	100															0	100

(Dennis and Dennis, 1990)

$C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ ，FW=157.60)：購自 Promega 公司，美國。

依後述之方法配置 50 mM 之 Tris-HCl。取 7.88g 溶於 900 mL 之去離子水中後，以 3N NaOH 調整 pH 值至 7.5 後，再加入去離子水至總體積 1000 mL。

(八) 黃嘌呤 (xanthine； $C_5H_4N_4O_2$ ，FW=152.11)：購自 Sigma 公司 (023k0605 EC 200-718-6)，美國。取 0.1 mM 之黃嘌呤溶液作為受質以檢測其轉換為尿酸之速率。

(九) 尿酸 (uric acid； $H_4N_4O_3$ ，FW=168.11)：購自 Sigma 公司 (114k06222 EC 200-720-7)，美國。分別製取尿酸溶液 1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、100 及 200  $\mu$ M，利用分光光度儀透過全圖譜掃描確認其最大吸光值為 285 nm 後，再於 285 nm 吸光值下測定該八種濃度樣品之吸光值，以製成標準曲線 (圖 12)。

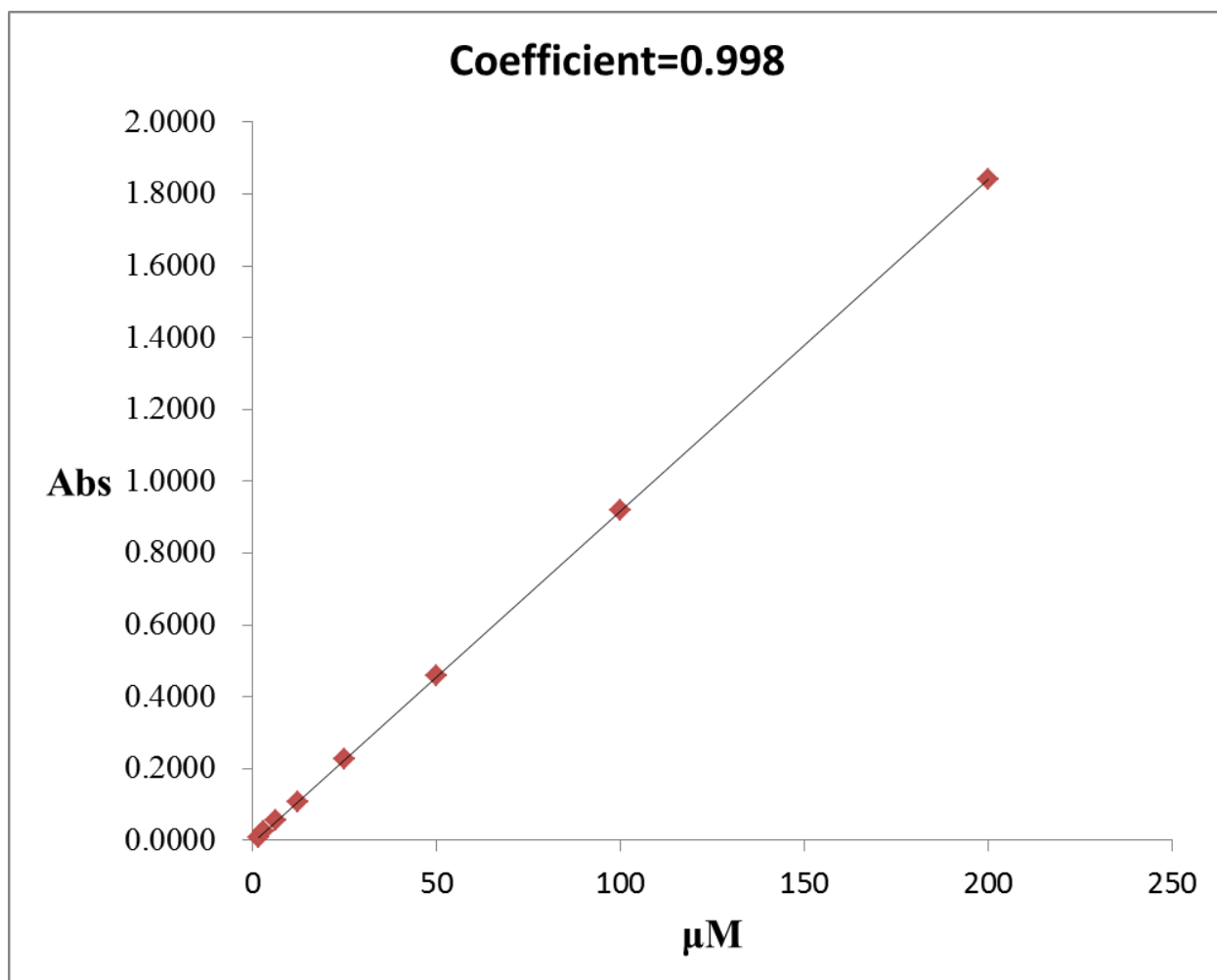


圖 12. 尿酸標準曲線圖。

Fig.. The standard curve of uric acid.

## 二、儀器設備

- (一) 恆溫振盪水浴槽：Firstek Sharking Bath，B602D，購自今日儀器公司，台灣。
- (二) 貝氏乳脂肪離心機：Garver electrifuge (dependable industrial centrifuges-bench top)，購自台陽貿易有限公司，台灣。
- (三) 貝氏乳脂肪瓶振盪器：Carter motor company (CUB5005C5)，購自台陽貿易有限公司，台灣。
- (四) 超高速離心機：Kubota 離心機，KN-70，日本。
- (五) 酸鹼值測定計：Seven Easy (S20)，購自 Ettler-Toledo 公司，瑞士。
- (六) 桌上型乳油分離機：Elecraem 3, Denmark，在約 55°C 下進行乳脂肪分離。
- (七) 恆溫箱：DENY YNG (DB-60)，購自上格科技公司，台灣。
- (八) 分光光度儀：Dynamica Halo DB-20 UV / Visible Double Beam Spectrophotometer，澳洲。高壓均質機：YUH SHING 均質機，YS-3000，購自鈺興機械工業有限公司，台灣。
- (九) 高壓均質機：YUH SHING 均質機，YS-3000，購自鈺興機械工業有限公司，台灣。

## 三、試驗方法



(一) 乳脂率測定 (CNS3444 N6060)：依據國家標準 (CNS) 乳品檢

驗法之乳脂肪含量測定之現行標準 (2007) 做測定。

1. 將水與乳油各 9 g 共 17.6 mL (or whole milk 17.6 mL) 注入 Babcock 乳脂瓶中後，緩慢加入同體積之  $H_2SO_4$ ，使其充分混合。
2. 使用 Babcock 乳脂瓶震盪器振盪 1~2 分鐘。
3. 利用 Babcock 乳脂肪離心機 (700-1,000 rpm) 離心 5 分鐘。
4. 加入  $60^{\circ}C$  以上之熱水至貝氏瓶之瓶頸。
5. 利用 Babcock 乳脂肪離心機 (700-1,000 rpm) 離心 2 分鐘。
6. 再加熱水使脂肪層上浮至瓶頸之上方刻度。
7. 利用 Babcock 乳脂肪離心機 (700-1,000 rpm) 離心 1 分鐘。
8. 判讀刻度值即為乳脂率。

(二) 熱處理乳油之標準化鮮乳試製：依照實驗的設計，將各式乳樣品進行處理：

1. 於乳品加工廠取回之生乳油依照上述測定方式進行測定，所  
得出乳脂率再使用 Pearson Square 試算，依照試算之結果將生  
乳油混合脫脂乳，將其乳脂率調整至 20%，避免因乳脂過高受  
熱後產生凝結如圖 13。

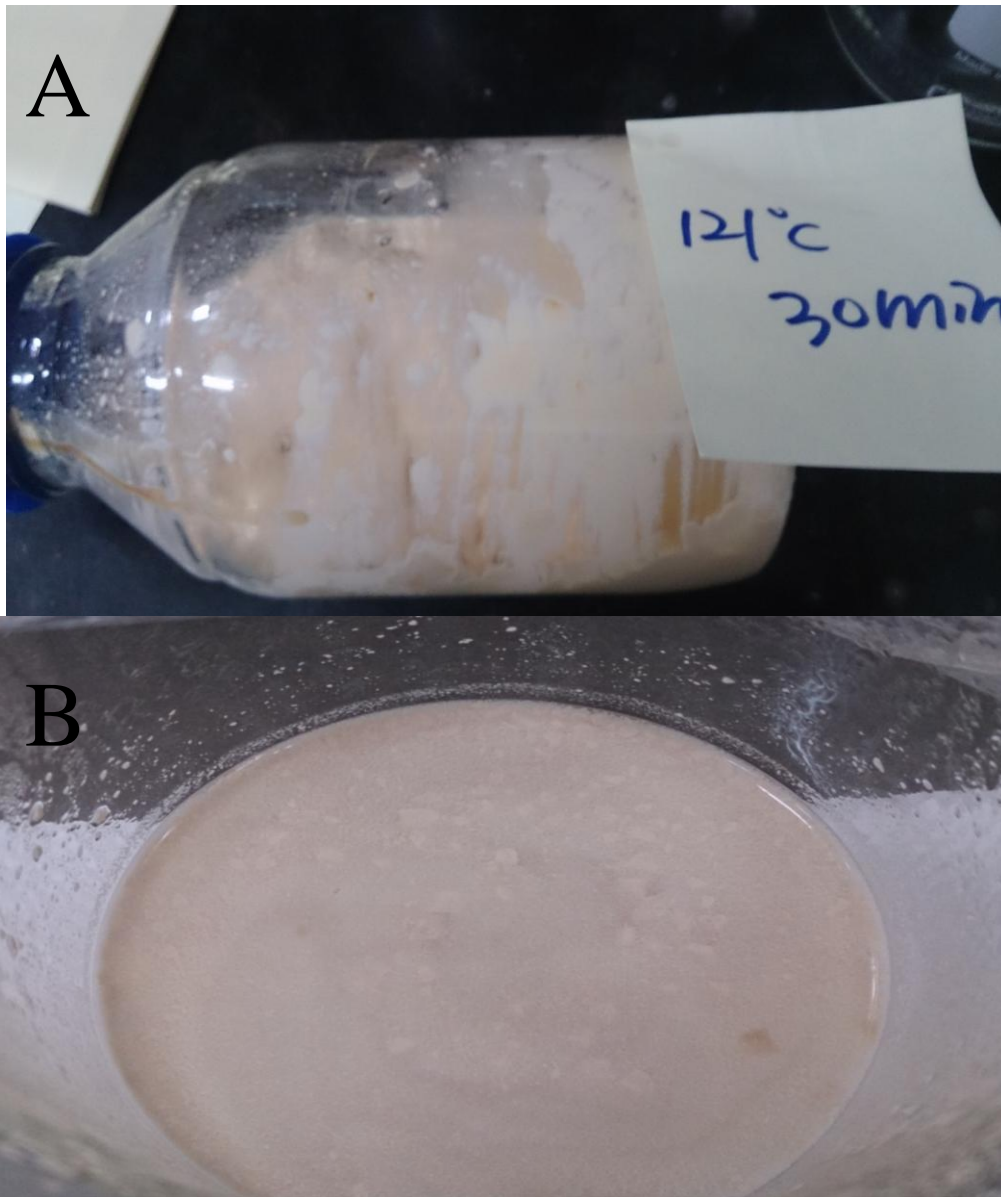


圖 13. A.乳油經 121°C, 30min.後結塊情形。B. 乳脂回溶於水之情形。

**Fig. 13. A. The agglomerated situation of cream through 121°C, 30 min. B. The situation of cream resoluble into water.**

2. 將乳脂率 20%之乳油樣品一升以上，進行均質機操作，使乳脂均勻分散。
3. 20%乳油均質，以滅菌釜進行 121°C, 15 min 的熱處理，取 250ml 備用檢測。
4. 再次利用 Pearson Square 試算，將受熱處理後之 20%乳油回填至脫脂乳中，成為 3%與 1.5%之乳樣品。
5. 乳脂率 3%與 1.5%之乳樣品則需再次進行均質處理，避免靜置乳脂上浮發生，完成均質後，再依照實驗設計以 HTST 進行熱處理，再待後續檢測。

(三) 乳樣品中黃嘌呤氧化酶之萃取與分析：依照 Özer *et al.* (1999) 、Egwim *et al.* (2005) 與 Hoffmann *et al.* (2006)所描述之方法敘述修飾如圖 14 所示。

1. 取各待測乳樣品 250 mL，置入 500 mL 之振盪錐形瓶中。
2. 於裝有乳樣品之振盪錐形瓶中加入 3% 甲苯 (7.5 mL) 及 2 mM 之 EDTA (0.1861g)。
1. 將不鏽鋼漿片攪拌棒固定於瓶口橡皮塞後蓋緊於瓶口，再以石蠟膜密封瓶口，使樣品中之甲苯無法揮發至瓶外。
2. 將乳樣品置於 30°C 水浴槽中，設定加熱至 45°C 以 125RPM 振盪 30 min 後，冰浴降溫至 4°C，將此步驟重複一次。

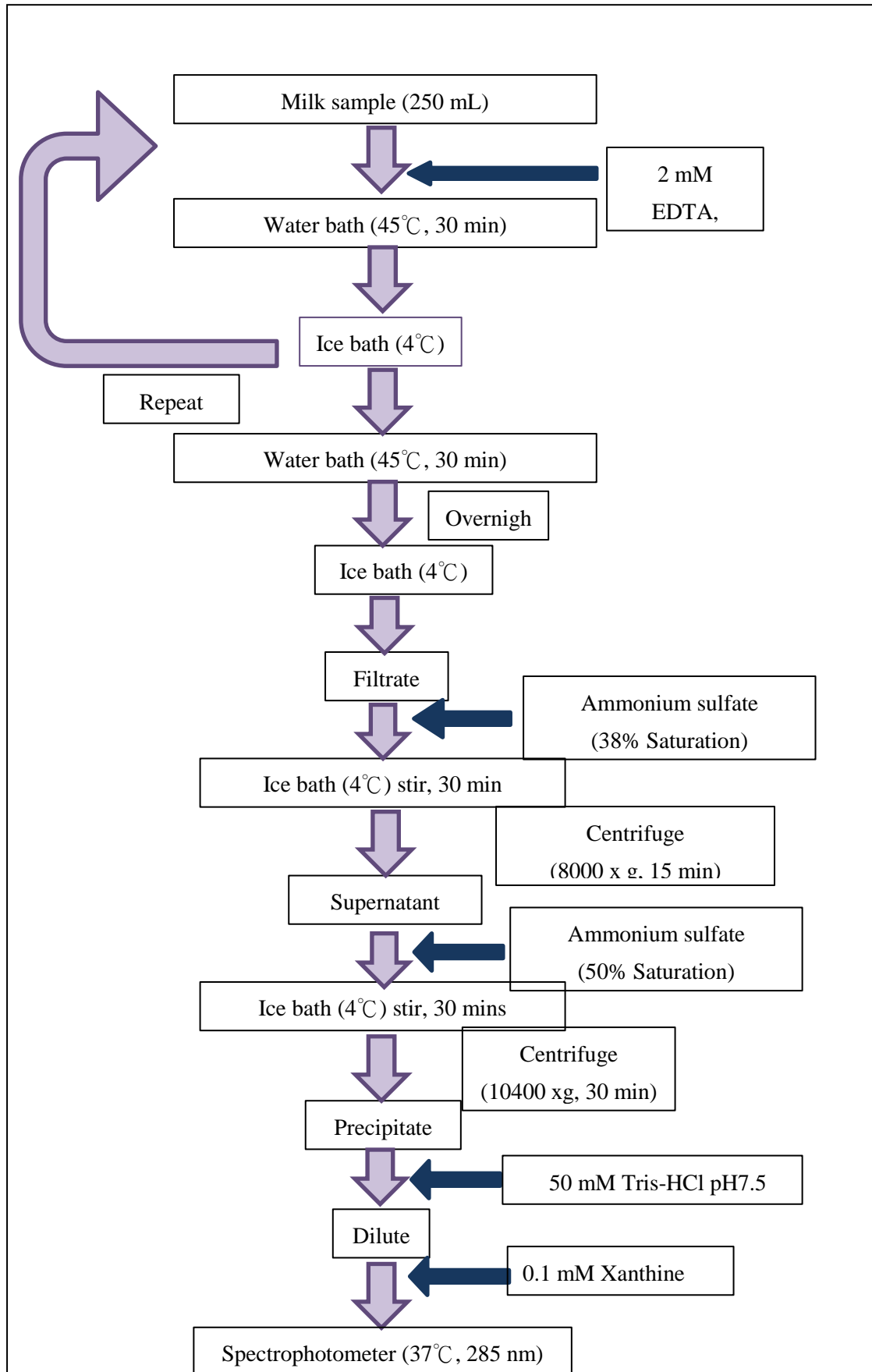


圖 14. 實驗流程圖。

Fig. 14. The experimental flow chart.

5. 重複步驟 4 的步驟後，再將已降溫至 4°C 之乳樣品重新放回預熱 30°C 水浴槽中，設定加熱至 45°C 振盪 12 小時以上 (overnight) 後再冰浴降溫至 4°C。
6. 取市售藥膳袋 (9×11.5 cm) 重疊套三層做初步過濾 (去除乳酪粒)。
7. 以 38% 硫酸銨進行鹽析，攪拌至少 30 min。
8. 置於 50mL 離心管中，以超高速離心機 (8,000 ×g) 離心 15min。
9. 取上清液後，再以 50% 硫酸銨進行鹽析，攪拌至少 30min。
10. 置於超高速離心管中，以超高速離心機 (10,400 ×g) 離心 30 min。
11. 取沉澱物以 250mL 之 50mM 之 Tris-HCl (pH 7.5) 稀釋溶液至透明態。
12. 取上述 9 mL 沉澱物溶液加入 1mL 之 1mM 之黃嘌呤溶液 (使其黃嘌呤濃度為 0.1 mM)。
13. 置於 37°C 水浴槽中振盪，每經 5 min 採樣一次，直到 45 min 為止。
14. 利用分光光度儀 (Dynamica Halo DB-20，澳洲)，於 285 nm 之波長下測定樣品每 5 min 之反應吸光值。

15. 利用分光光度儀中吸光值計算出尿酸每 5 min 的濃度變化

進而推算出 xanthine oxidase 每五分鐘的酵素活性變化。

#### (四) 統計分析

本實驗每種樣品重複兩次，每次分析取三重複，並以 Statistical analysis system (SAS) 統計套裝軟體分析。將實驗數據分別採用變異數分析 (Analysis of variance; ANOVA) 與一般線性模式 (General Linear Model's Procedure; GLM) 進行 t - test 統計分析比較各乳樣品平均值之差異。

## V、結果與討論

### 一、均質對生乳中黃嘌呤氧化酶活性之影響

以成分無調整生乳而言，無均質與經均質處理之生乳於蛋白質粗萃取後，進行黃嘌呤氧化酶活性之分析，於 37°C 下將受質反應物黃嘌呤 100 $\mu$ M 加入 pH 7.5 含酵素萃取物之 Tris-buffer 溶液中，持續 45 min 的反應，同時於期間每 5 min 測定一次尿酸總生成量。結果顯示 (圖 15)，尿酸生成量會隨著反應時間的延長，有濃度增加出現延緩的趨勢。在無調整無均質生乳，反應 45 min 時平均尿酸生成量為 85.2908 $\mu$ M，略低於無調整經均質處理生乳之 87.3401 $\mu$ M，均質處理主要影響乳脂肪球，於成分無調整情況下似並不足以造成黃嘌呤氧化酶之活性有顯著差異 ( $P>0.05$ )。此外仿市售鮮乳生產程序，將生乳進行乳油分離後再標準化至含脂率 3.5% 之乳樣品 (圖 16)，則顯示均質標準化生乳於反應 45 min 時平均尿酸生成量為 107.2419 $\mu$ M，顯著高於無均質組的標準化生乳之 87.51 $\mu$ M ( $P<0.05$ )。此結果顯示成分無調整生乳均質與否並未顯著影響黃嘌呤氧化酶之活性，但當生乳受到擾流效應 (運輸、脫脂、標準化) 後，再受到均質處理，使乳中酵素受到氧氣的活化，造成均質鮮乳黃嘌呤氧化酶活性較高的情況。由於熱處理會對黃嘌呤氧化酶活性產生影響，Demott and Praepanitchai (1978) 及 Ye *et al.* (2002) 均指出生乳通過熱處理後，溫度與受熱時間長短皆

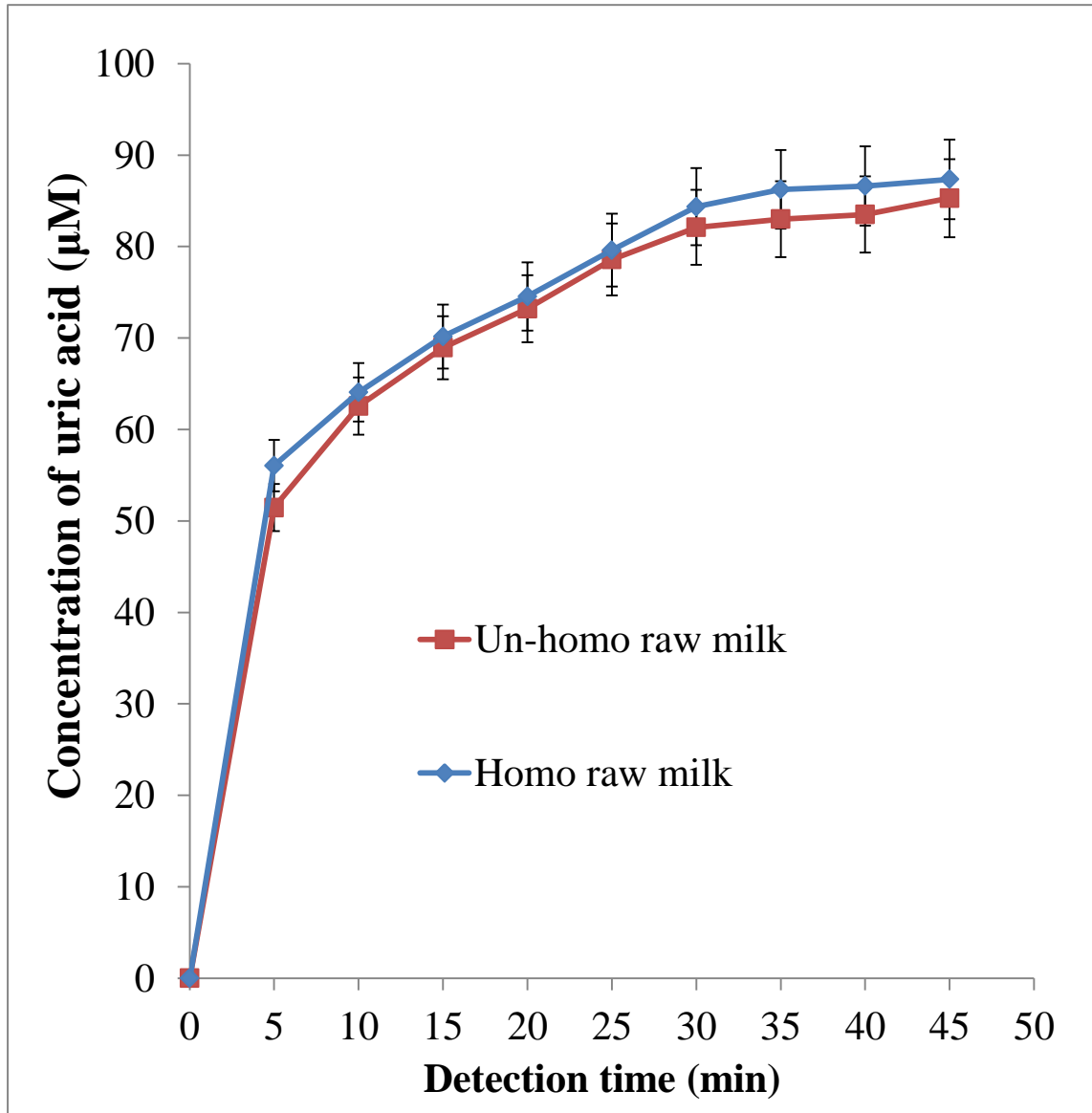


圖 15. 成分無調整均質與未均質生乳其尿酸生成量之比較。  
 Fig.15. The comparison of uric acid production from homogenized raw milk and un-homogenized in original raw milk.



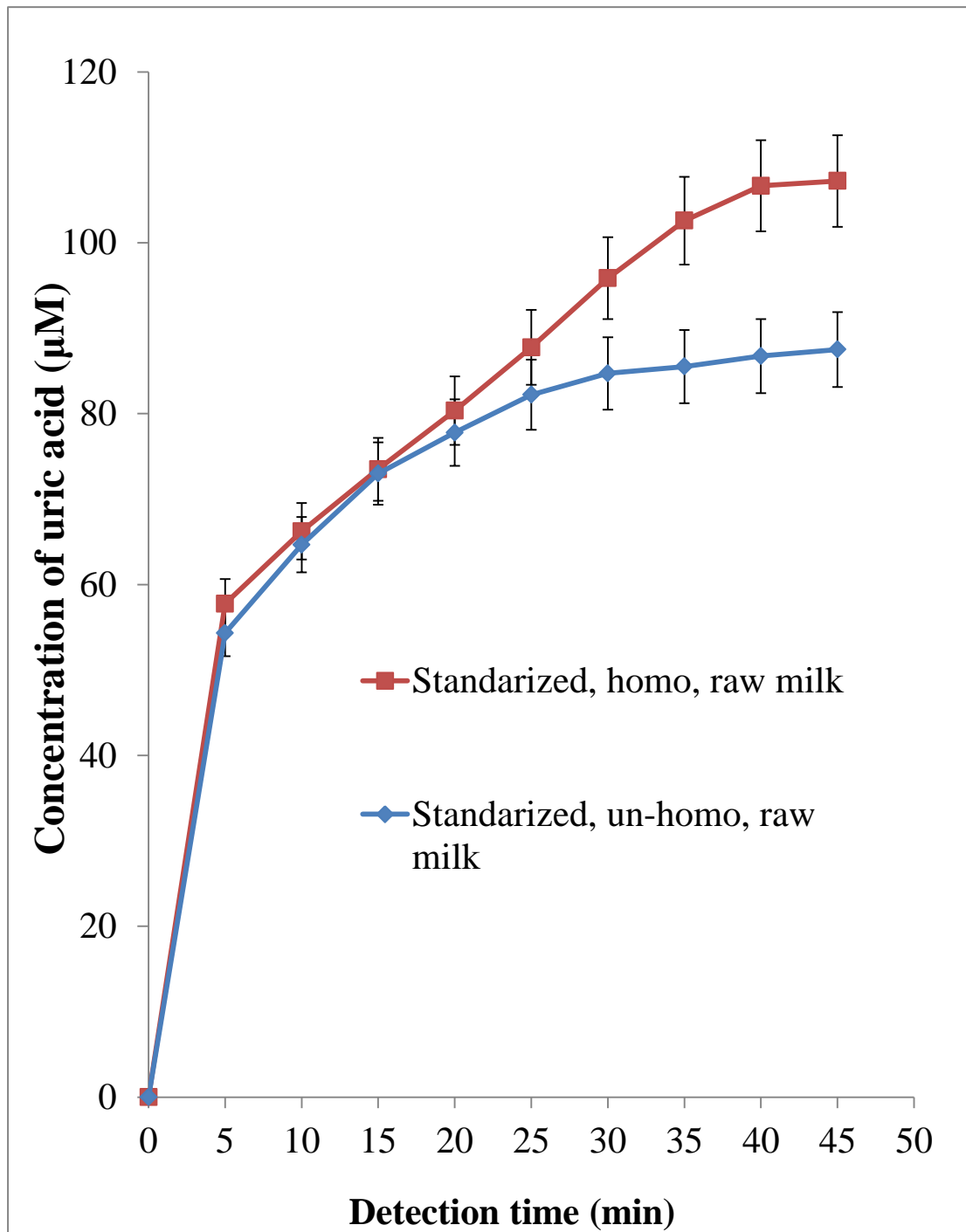


圖 16. 標準化生乳與標準化未均質生乳其尿酸生成量之比較。  
**Fig.16. The comparison of uric acid production from standarized, homogenized raw milk and standarized, un-homogenized raw milk.**

會造成黃嘌呤氧化酶活性之部分失活現象；黃等人 (2013) 之研究亦指出不同加熱強度會影響黃嘌呤氧化酶之作用強度，故進一步設計以下分項熱處理之實驗。

## 二、 熱處理對於脫脂乳中黃嘌呤氧化酶活性之影響

Silanikove and Shapiro (2007) 之研究指出牛乳中之黃嘌呤氧化酶，除了位於脂肪球膜外亦存在於乳清膜顆粒 (whey membrane particles; WMP) 中，因此本實驗先對脫脂生乳進行熱處理，比較黃嘌呤氧化酶之活性。圖 17 為未均質脫脂生乳與 HTST (72°C) 脫脂乳之比較，反應 45 min 後未均質脫脂生乳與 HTST 脫脂乳之尿酸生成量分別為 61.1604 $\mu$ M 與 42.5257 $\mu$ M，兩者間差異顯著 ( $P < 0.05$ )，顯示脫脂生乳經 HTST 處理可降低黃嘌呤氧化酶之活性，但仍無法使黃嘌呤氧化酶完全失活，亦無法防止人體因食用脫脂乳導致攝入過多黃嘌呤氧化酶之風險。Zikakis *et al.* (1976) 與 Ye *et al.* (2011) 研究發現，牛乳於含有胃蛋白酶之模擬胃液中，胃蛋白酶可有效降解脂肪球膜上的蛋白質，但不會造成乳脂肪球被瓦解如圖 18。另外，脫脂乳中乳清球膜顆粒(WMP)中黃嘌呤氧化酶活性，在進入腸胃道消化系統中因胃蛋白酶降解而活性喪失，故而並不會直接被消化道吸收引起相關疾病。然而黃嘌呤氧化酶主要位於乳脂肪球膜之內膜中，且鄒等人 (2012) 研究指出生乳脂肪球膜相較均質後脂肪球膜更堅韌，不容易

瓦解；此外

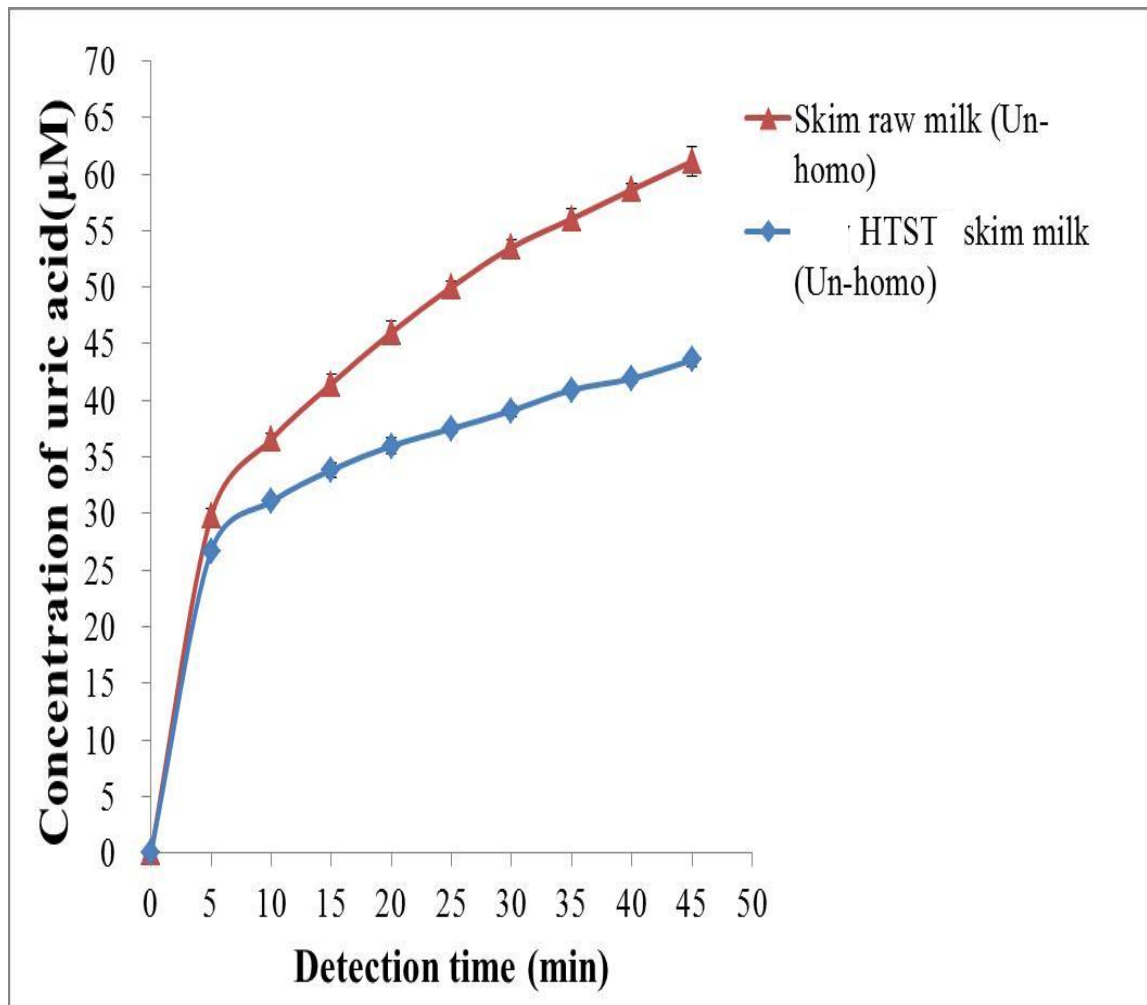


圖 17. 未均質脫脂生乳與 HTST 脫脂乳之尿酸生成量之比較。

Fig. 17. The comparison of uric acid production from un-homogenized skim raw milk and HTST skim milk.

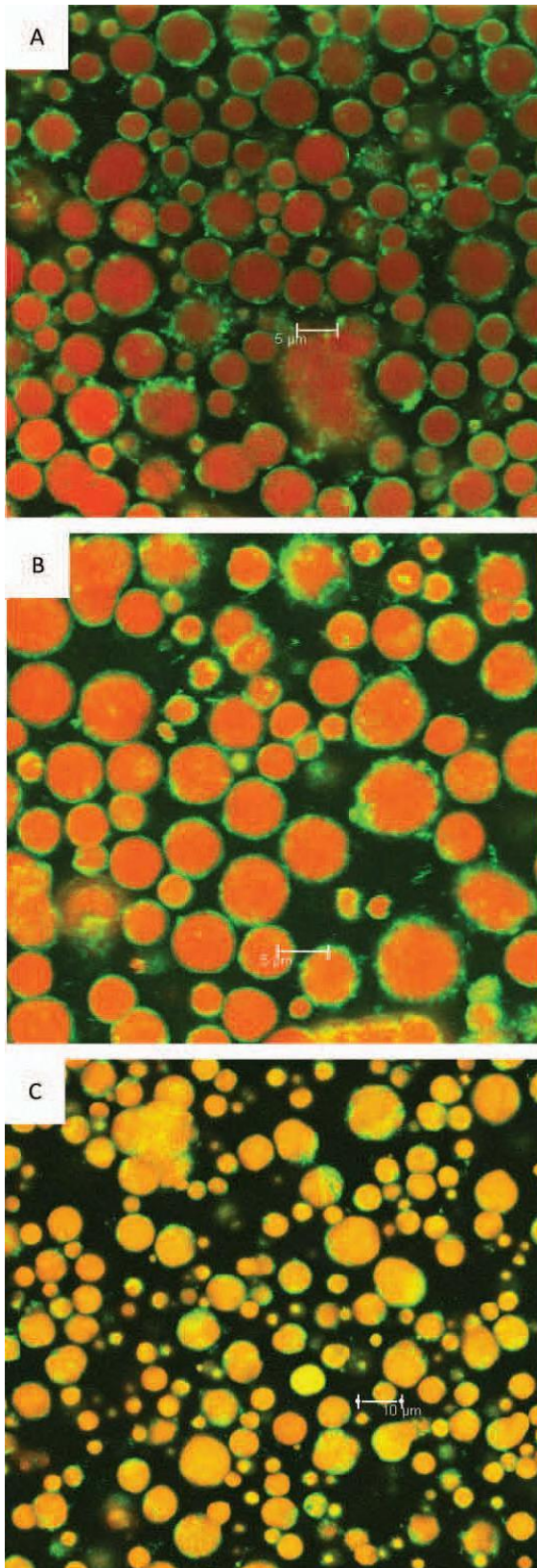


圖 18. 模擬胃液中乳脂肪球之共軛焦距電子顯微鏡圖。  
**Fig. 18. Confocal micrographs of the fat globules in cream samples: dispersed in water (A), in simulated gastric fluid (SGF) at pH 1.6 (B) and after incubation in SGF containing pepsin at 1.6 mg/mL for 10 min (C). Red or orange (gray) color represents fat; green (black) color represents protein (white pieces on the surface of fat globules are membrane proteins).**

(Ye *et al.*, 2011)

Singh and Waungana (2001) 、Ye, *et al.* (2004) 以及 Ye (2010) 也指出，隨著加熱強度之增加，牛乳於胃部消化產生凝乳強度隨之降低，其通過胃部消化之時間也愈短。因此鮮乳中乳脂肪之加熱處理對於黃嘌呤氧化酶活性之影響顯得更為重要，故更進一步設計探討乳油的不同處理，期使乳脂肪球膜中黃嘌呤氧化酶活性能降至最低且必須維持乳脂肪球膜之完整性，方可回填並標準化。

### 三、均質對乳油中黃嘌呤氧化酶之影響

黃等人 (2013)研究指出，HTST 處理乳油其乳脂肪球膜中黃嘌呤氧化酶活性顯著降低，惟 HTST 牛乳無法耐久藏，故為達降低黃嘌呤氧化酶活性又可耐久藏而進行以下之處理。於預備試驗發現，以熱處理 (121°C, 30 min) 對乳脂率 50%之乳油進行滅菌，乳油呈現無法回溶之結塊狀，故於後續實驗選擇將脫脂乳回填於乳油，稀釋其乳脂率至 20%。乳油回填後靜置有呈現上浮的現象 (圖 19)，故回填後須進行均質處理，使乳油被均勻分散。當比較 20%乳油均質與否對黃嘌呤氧化酶活性之差異，反應 45min 後未均質與經均質處理後之 20%乳油，其尿酸生成量平均為 76.6743 $\mu$ M 與 91.6491 $\mu$ M，呈現顯著差異 ( $P<0.05$ )，顯示均質處理確實會使乳油之黃嘌呤氧化酶活性增加 (圖 20)。黃等人 (2013) 研究發現牛乳經過均質化過程，因細化乳脂肪球，使脂肪球變小增加其總表面積，進而促進乳中黃嘌呤氧化酶之活



圖 19. 以脫脂乳稀釋未均質含脂率 20%乳油之上浮的情況。

**Fig. 19. Cream float on top when diluted fat content to 20% with skim milk without homogenization.**

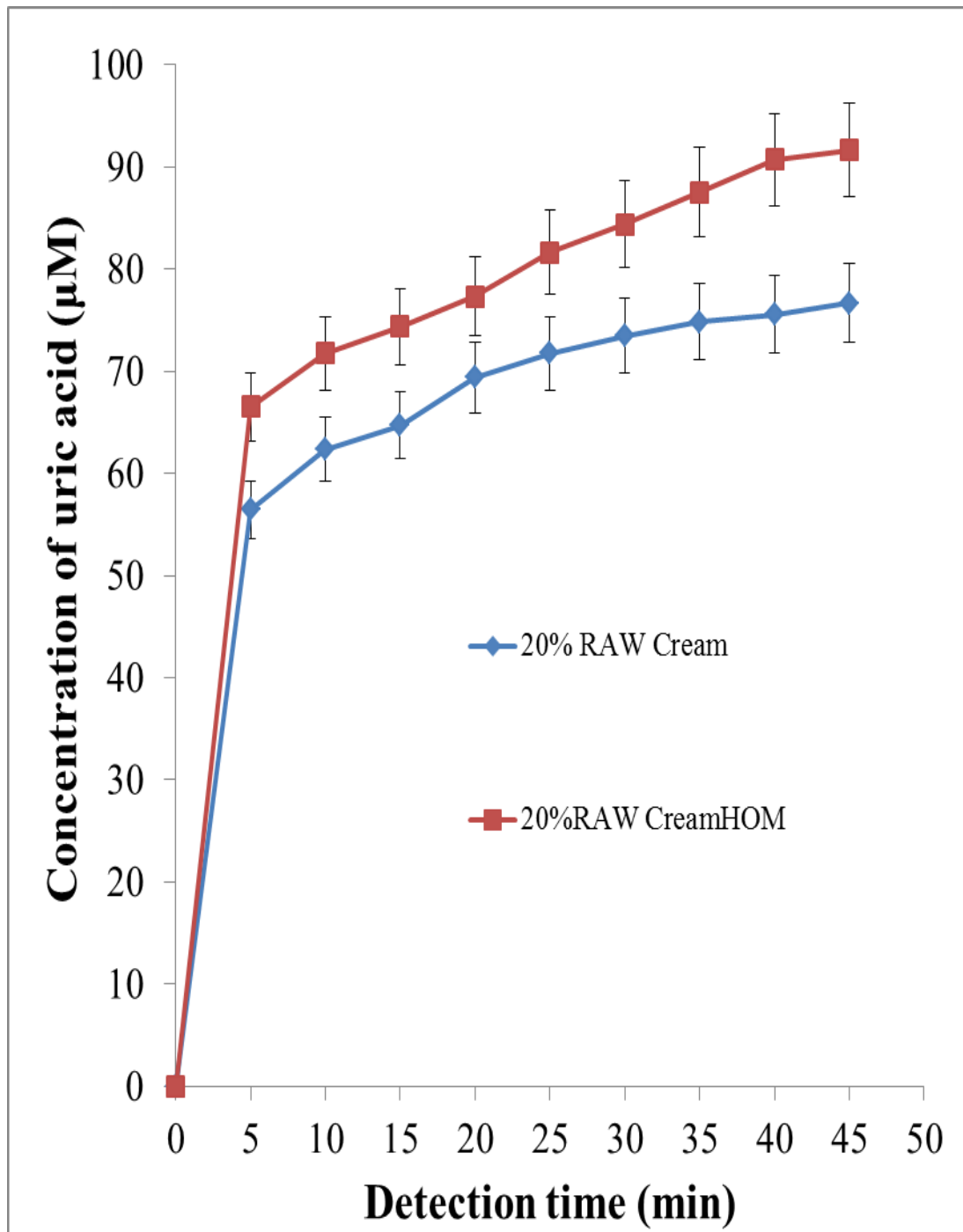


圖 20. 未均質 20%乳油與均質 20%乳油之尿酸生成量之比較。  
Fig. 20. The comparison of uric acid production between un-homogenized 20% cream and homogenized 20% cream.

性上升，且牛乳中乳脂肪含量愈高，亦會促使酵素活性增加。

#### 四、熱處理對乳油中黃嘌呤氧化酶之影響

黃等人 (2013) 之研究指出 HTST 處理效果較 121°C 為佳，因此欲降低乳油中黃嘌呤氧化酶的活性宜以低階 HTST 處理即可。惟 HTST 乳油無法耐久藏，除非即刻使用，否則為達降低黃嘌呤氧化酶活性又可耐久藏應係仍應以 UHT 處理為宜。故將經均質後與未均質之 20% 乳油進行熱處理 (121°C, 15 min) 後，檢測黃嘌呤氧化酶之活性。由圖 21 中所示，在未經均質處理之 20% 乳油其於反應 45min 後，測得尿酸生成量平均為 76.6743 $\mu$ M，則在經熱處理後其反應 45min 後之尿酸生成量平均下降為 53.4981 $\mu$ M，兩者具顯著差異 ( $P < 0.05$ )。而經均質處理後之 20% 乳油，於熱處理 (121°C, 15 min) 前後之尿酸生成量如圖 22，反應 45min 後分別為 91.6491 $\mu$ M 與 60.0251 $\mu$ M，兩者差異顯著 ( $P < 0.05$ )。可以發現無論乳油是否通過均質，熱處理 (121°C, 15 min) 皆可有效使黃嘌呤氧化酶的活性下降，促使尿酸生成量下降。Michalski and Januel (2006) 亦指出，牛乳均質後，其酪蛋白與乳清蛋白會與乳脂肪球膜結合，成為脂肪球膜構成物，產生各種不同型態之乳脂肪球(圖 23)，因此可進一步證實均質後的牛乳其乳脂肪球膜型態改變，使得原本就存在於乳脂肪球膜中的黃嘌呤氧化酶被結合至球膜上的酪蛋白與乳清蛋白包覆而保護得更好，再經



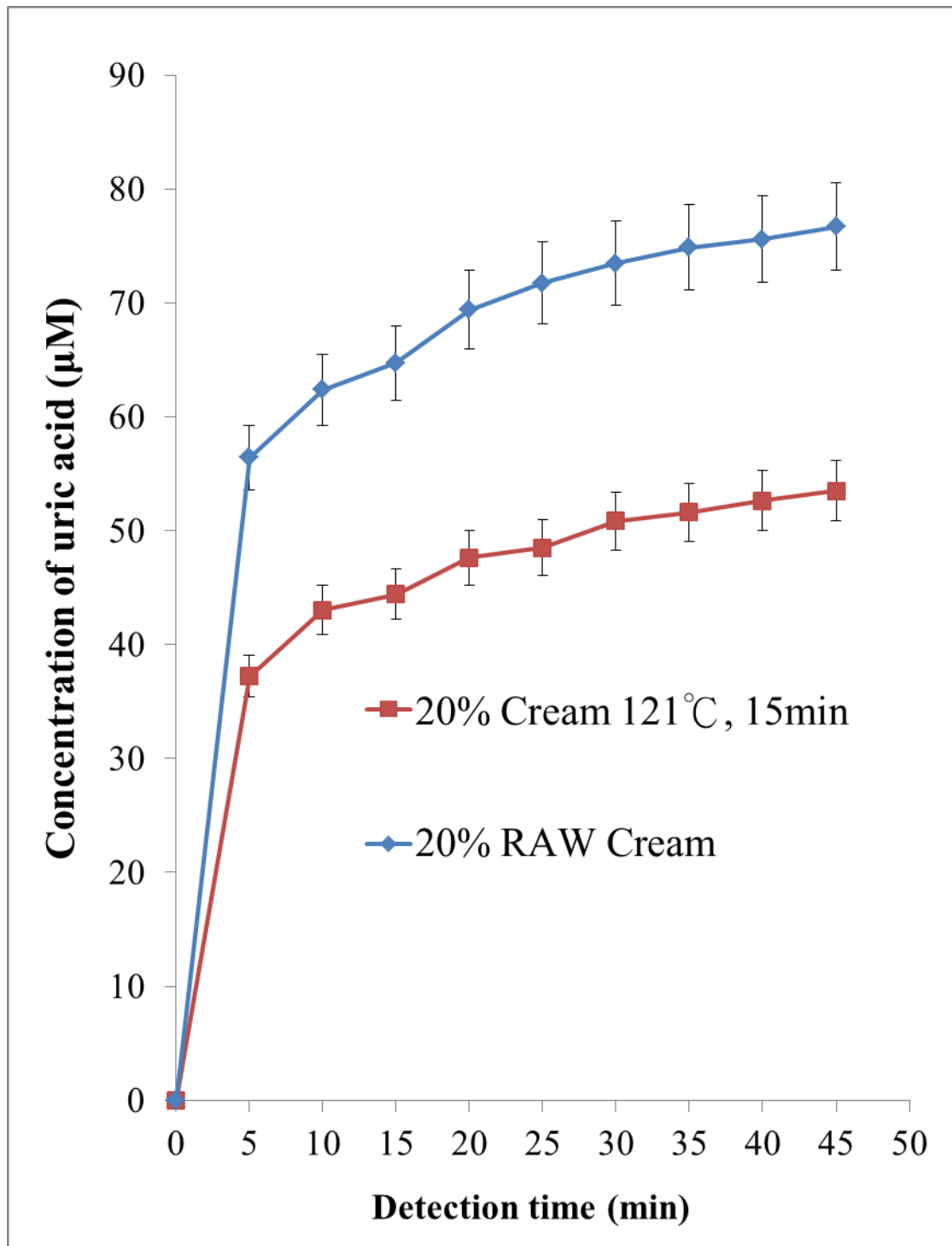


圖 21. 未均質 20%乳油於熱處理前後之尿酸生成量之比較。

Fig. 21. The comparison of uric acid production between 20% un-homogenization cream and 20% un-homo 121°C for 15min sterilized cream.

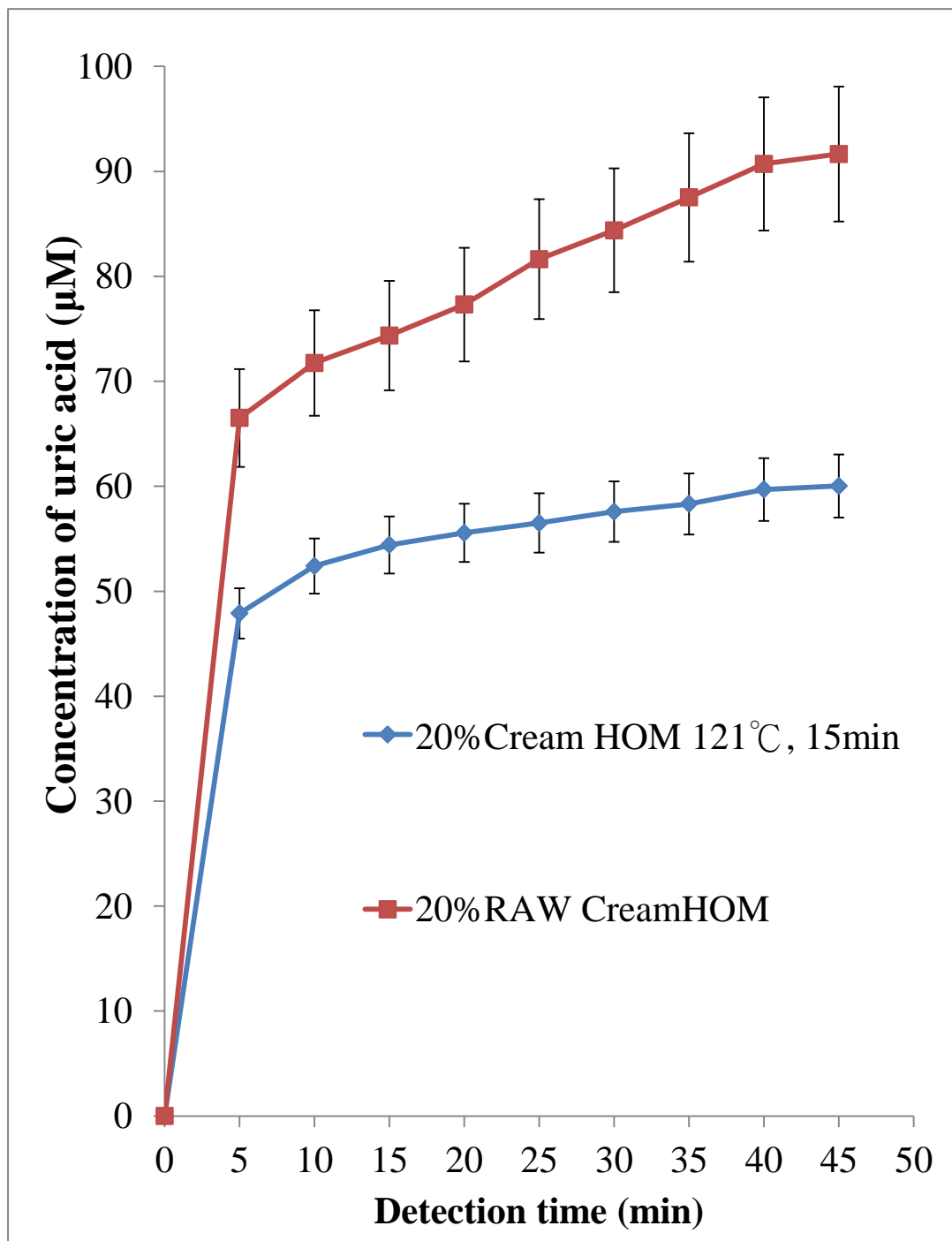


圖 22. 均質 20%乳油熱處理前後之尿酸生成量之比較。

Fig. 22. The comparison of uric acid production between 20% homogenization cream and 20% homo 121°C for 15min sterilized cream.

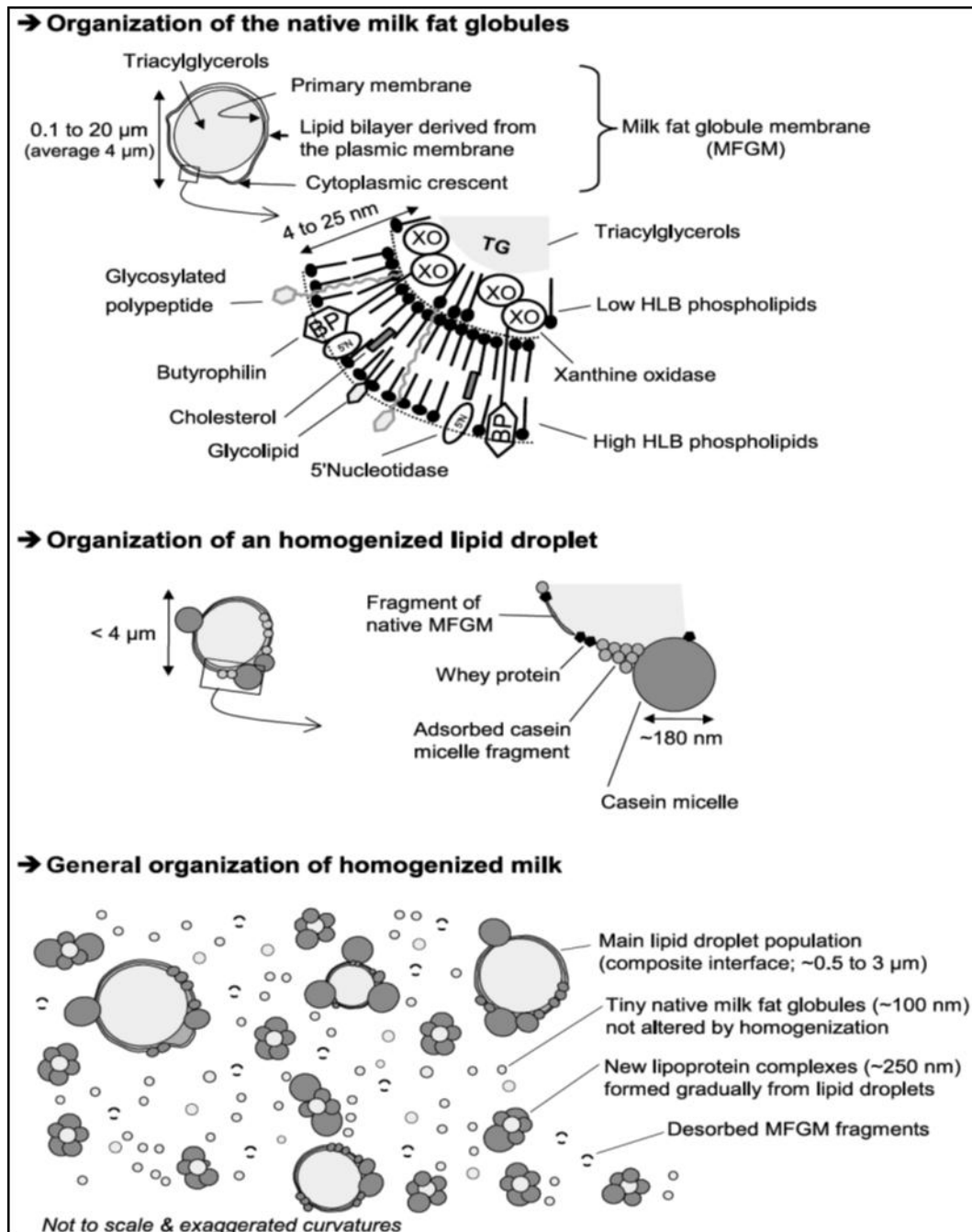


圖 23. 乳脂肪球膜於均質前、後結構之比較。

Fig. 23. Organization of the native milk fat globule membrane (MFGM) compared with the interfacial organization of an homogenized fat droplet and proposed general organization of lipid particles in homogenized milk.

(Michalski and Januel, 2006)

過熱處理時，黃嘌呤氧化酶更行耐熱而不易為被熱處理破壞，所以黃嘌呤氧化酶活性比無均質的組別高。綜上所述（圖 24），20%乳油通過均質後黃嘌呤氧化酶活性上升，且熱處理可有效降低黃嘌呤氧化酶活性，20%乳油通過熱處理後，無論均質與否兩者間並無顯著差異 ( $P>0.05$ )，但乳油未經均質處理，且受高強度加熱後，易造成乳脂肪球膜爆裂使脂肪被釋出，在後續處理中無法復水。故乳油經均質後再行熱處理，則可防止此現象的發生，以利於後續的加工與應用。

#### 五、乳油處理對標準化鮮乳之影響

由上述實驗結果得知利用均質後滅菌處理其乳油中黃嘌呤氧化酶活性可被有效降低，因此更進一步探討鮮乳製造之生產線上，將被分離的乳油經均質及熱處理再回填脫脂乳進行標準化，然後再依一般牛乳製造流程（圖 25），其鮮乳中黃嘌呤氧化酶活性是否會較一般牛乳為低，並且探討飲用低脂鮮乳之風險是否相較全脂鮮乳低。圖 26 所示，乳油無處理直接回填標準化成乳脂率 3%之牛乳，其 45min 之尿酸生成量為  $59.9180\mu\text{M}$ ，皆顯著高於乳油經處理後標準化全脂牛乳 (3%)之  $35.3676\mu\text{M}$  與低脂牛乳 (1.5%)之  $34.0362\mu\text{M}$ ，而全脂與低脂之酵素活性則無顯著差異。此外，因部分黃嘌呤氧化酶存在於脫脂乳中，當完成標準化程序後，再次以 HTST 熱處理仍無法使黃嘌呤氧化酶完全失去活性，黃等人 (2013) 研究發現就熱處理而言，雖會隨著

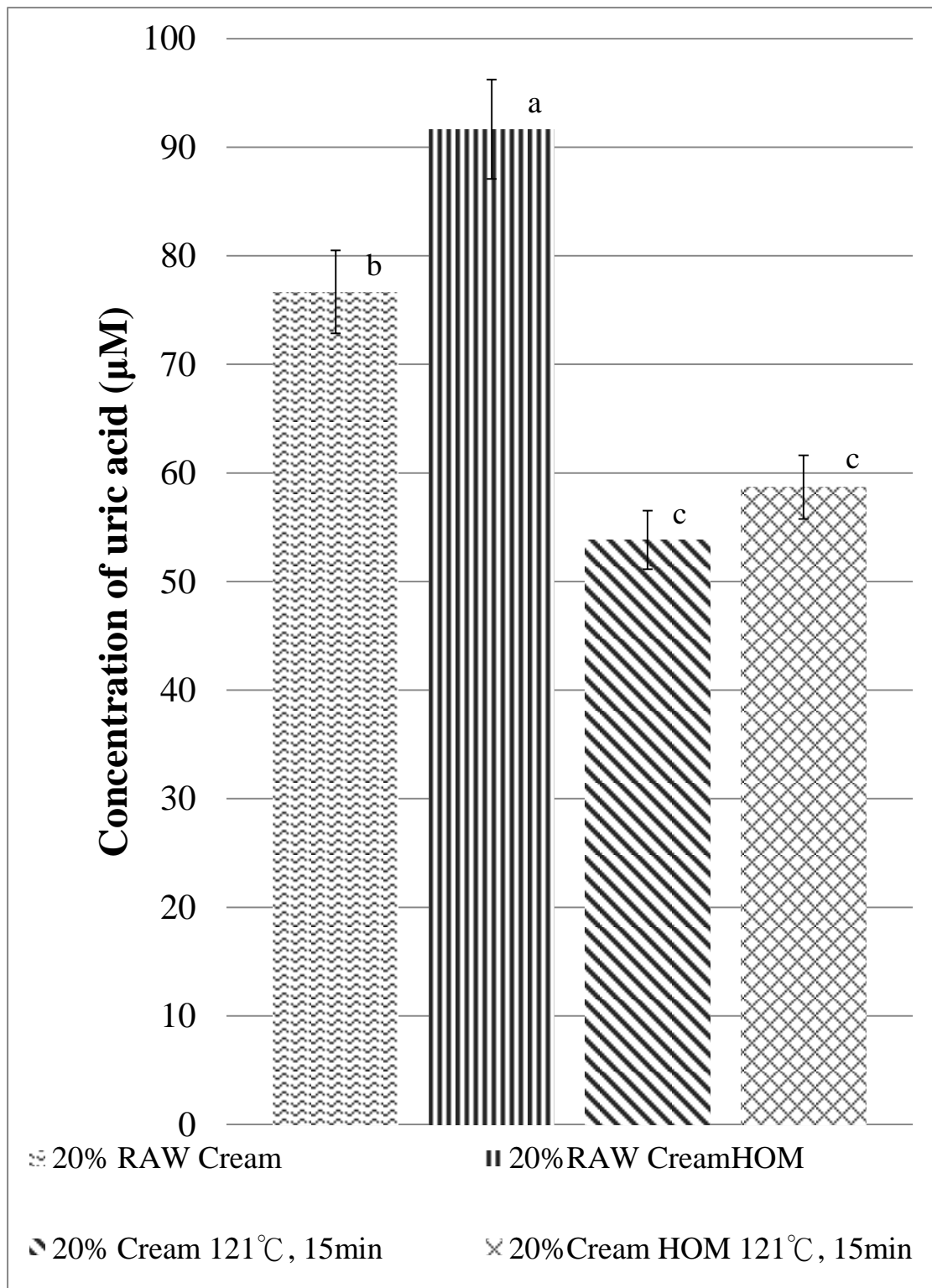


圖 24. 均質與熱處理對於 20%乳油於 45 分鐘之尿酸總生成量之比較。

Fig. 24. The comparison of uric acid production that between the homogenization and heat treatment from 20% cream at 45 min.

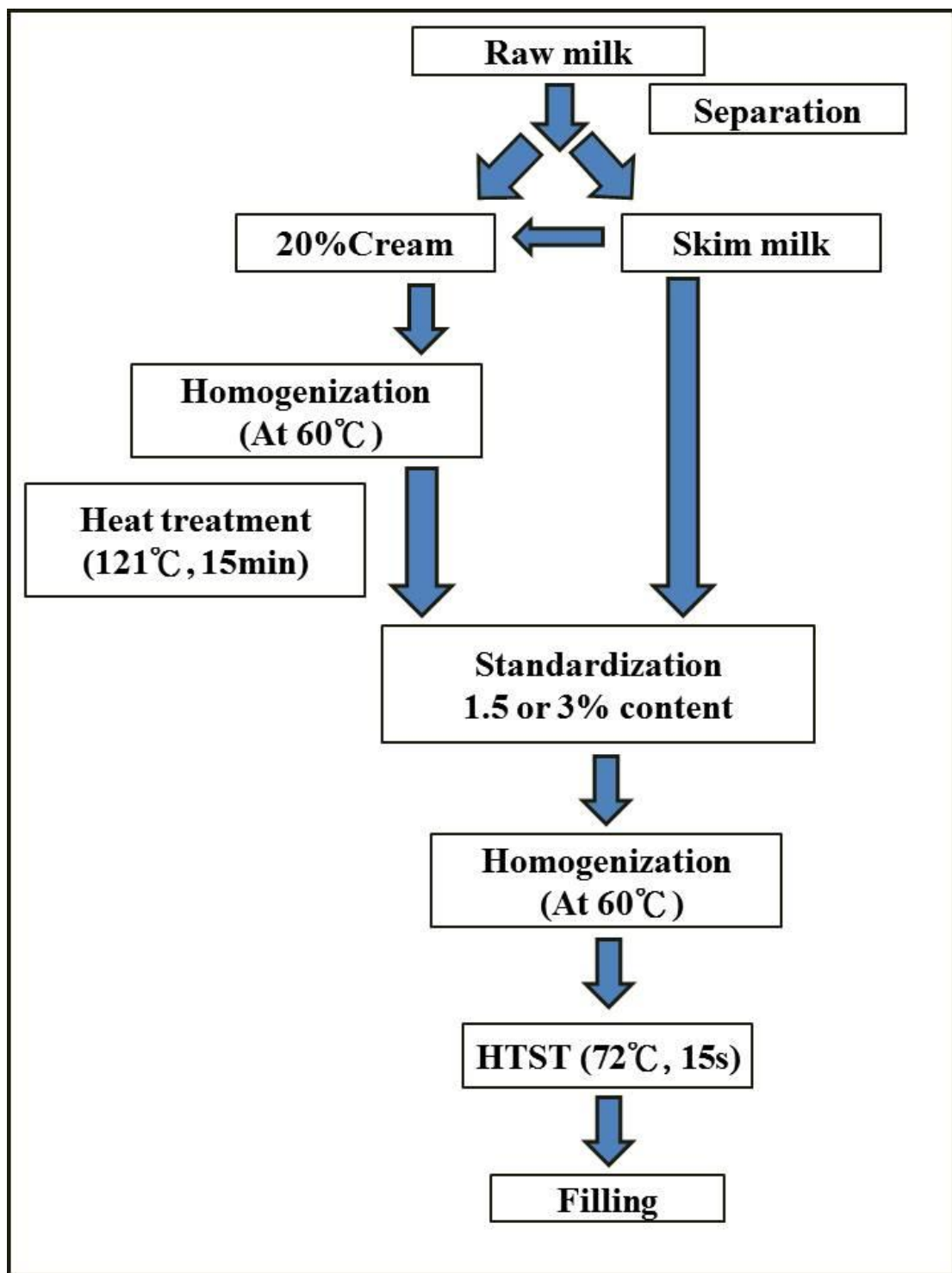


圖 25. 低黃嘌呤氧化酶活性鮮乳製造流程示意圖。

Fig. 25. The model of manufacturing process for low xanthine oxidase activity of HTST fresh milk.

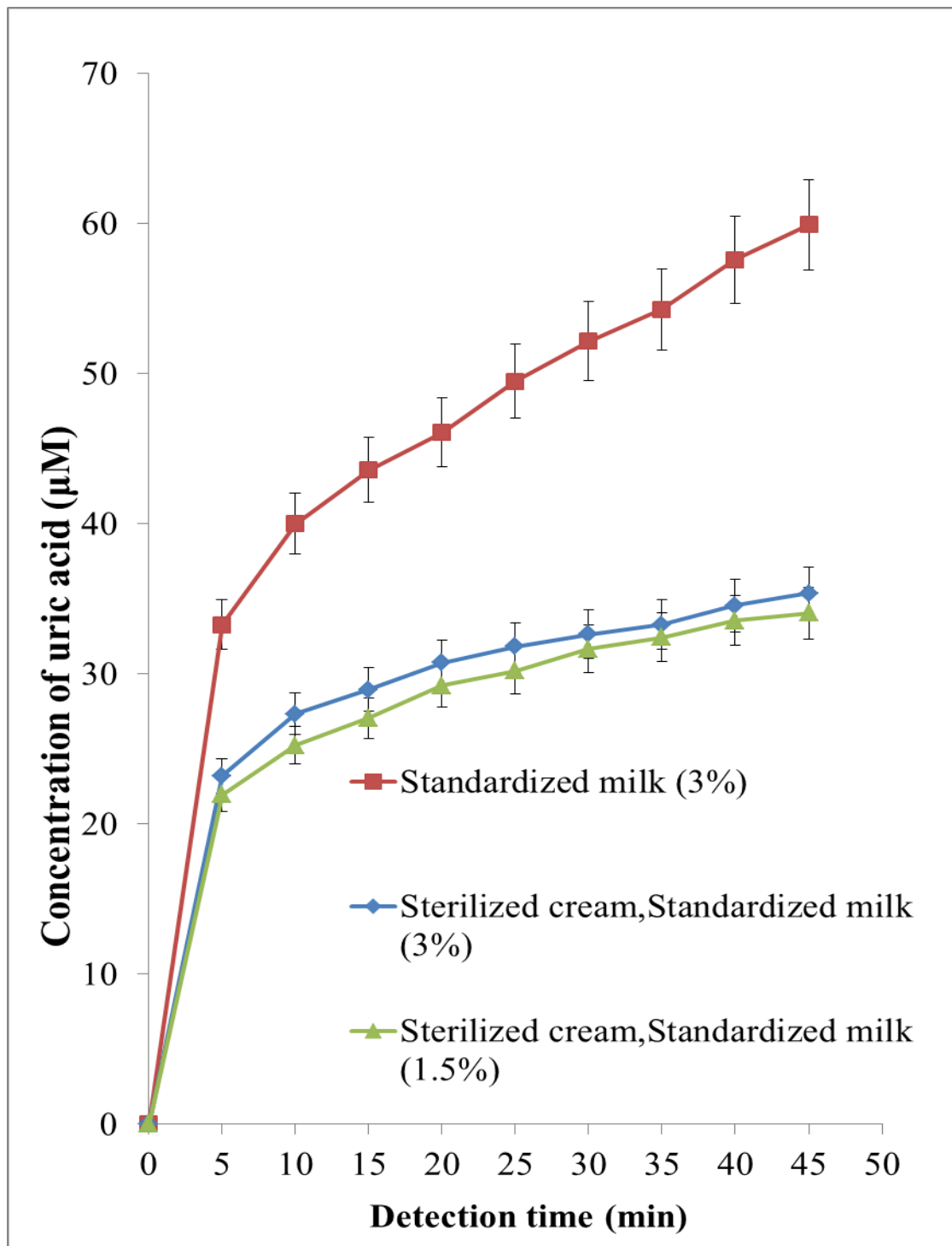


圖 26.乳油無處理標準化 HTST 鮮乳與乳油經處理再標準化 HTST 鮮乳(乳脂率 1.5, 3.0%)之尿酸生成量之比較。

Fig. 26. The comparison of uric acid production from standardized HTST milk and sterilized cream, standardized HTST milk (1.5%, 3.0%).

加熱溫度愈高或加熱時間增加，使黃嘌呤氧化酶活性下降，但在 LTLT 與 HTST 熱處理條件下，仍然無法使酵素完全失活。此外，因為有研究顯示經噴霧乾燥後的乳粉，其黃嘌呤氧化酶活性呈失活狀態（張, 2009），而乳粉製程中大多經 UHT 殺菌後，再以 130~180°C 熱風噴霧乾燥，但是亦有因裝置種類達 200°C 以上者（張, 1983），顯示乳脂肪球膜中黃嘌呤氧化酶係因這些高溫處理導致失活。實驗顯示針對乳油的處理可達成在不大幅度變更生產線的條件下，達到黃嘌呤氧化酶的活性下降，但無法使黃嘌呤氧化酶如同乳粉完全失去活性。



## VI、結論

- 一、成分無調整生乳均質與否不影響黃嘌呤氧化酶之活性，但經脫脂、標準化後再行均質處理則會造成黃嘌呤氧化酶活性上升，此外乳油受到均質後，因細化乳脂肪球，使脂肪球變小增加其總表面積，進而促進乳中黃嘌呤氧化酶之活性上升。
- 二、HTST (72°C) 可使脫脂乳中乳清膜顆粒中之黃嘌呤氧化酶活性顯著降低，但無法使其完全失活，然因乳清膜顆粒進入腸胃中可被腸胃道酵素破壞，因此對人體影響較小。
- 三、乳脂肪球膜會因均質而改變型態使黃嘌呤氧化酶再受熱時被酪蛋白與乳清蛋白保護，使黃嘌呤氧化酶相較於無均質者更加耐熱，但總體而言熱處理可使黃嘌呤氧化酶之活性有效降低。
- 四、乳油經處理後再進行生產標準化牛乳，可達成降低黃嘌呤氧化酶活性之目的，而全脂與低脂鮮乳在尿酸生成量上則並無差異。

綜上所述，於不大幅變動現有鮮乳生產線上流程中，將生乳經乳油分離後，乳油以脫脂乳調整乳脂至 20% 後進行均質與 121°C, 15min

處理，再依照市售鮮乳處理程序進行標準化與 HTST 處理，則可達成製造低黃嘌呤氧化酶活性之鮮乳。

## VII、參考文獻

- 林慶文。1993。乳製品之特性與機能。第 33 頁，第 35-44 頁。華香園出版社。台北市。
- 林慶文。2008。乳品加工學三版四刷，第 1-3 頁，第 9-10 頁，第 24-35 頁，第 61-62 頁，第 80-92 頁，第 116-123 頁，第 145-180 頁，第 190-197 頁，第 232 頁，第 245-260 頁，第 280-286 頁，第 576-577 頁。華香園出版社。台北市。
- 施英隆、范宜琮。2001。納豆~神奇之保健食品。生物資源生物技術 4：37-45。
- 陳宥蓁。2007。黃嘌呤氧化酶與受質 6-formylpterin 作用機制及其中間產物形式之研究。碩士論文。清華大學化學系。
- 陳泰吉。2005。黃嘌呤氧化酶兩單體間之交互作用對催化受質機制之探討。碩士論文。清華大學化學系。
- 曹偉。1997。斑蝥文獻考察暨斑蝥素實驗研究--斑蝥素及其類似體對黃嘌呤氧化酶和超氧化物自由基活性作用之研究。博士論文。中國醫學研究所。
- 黃姿穎、張佳瑜、周繼發。2013。鮮乳中黃嘌呤氧化酶之活性(1)熱處理、均質化與乳脂肪含量對牛乳中黃嘌呤氧化酶活性之影響。東海學報 54:1-9。

黃雅婷。2012。痛風病患服藥經驗之探討。碩士論文。中臺科技大學護理系。

張佳瑜。2009。熱處理、均質化與乳脂含量對牛乳中黃嘌呤氧化酶活性之影響。碩士論文。東海大學畜產與生物科技學系。

張勝善。1983。牛乳與乳製品，第 72-74 頁，第 146-147 頁，第 220-227 頁，第 323-342 頁，第 499-507 頁，第 598-601 頁，第 630-635 頁，長河出版社，台北市。

鄒明學。2012。胃腸蛋白酶作用對乳脂肪球體外消化效率之影響。碩士論文。東海大學畜產與生物科技學系。

黎明倩。2004。黃嘌呤氧化酶催化過程交互作用之研究。碩士論文。清華大學化學系。

顏正賢。1997。痛風。高醫醫訊 17(2)：5-6。

Amaya Y., K. Yamazaki, M. Sato, K. Noda, T. Nishino, and T. Nishino. 1990. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O<sub>2</sub>-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. J. Biol. Chem. 265(24):14170-14175.

- Benboubetra, M., A. Baghiani, D. Atmani, and R. Harrison. 2004. Physicochemical and kinetic properties of purified sheep's milk xanthine oxidoreductase. *J. Dairy Sci.* 87(6):1580-1584.
- Berry, C. E., and J. M. Hare. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease:molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* 555(3):589-606.
- Battelli M. G., S Musiani, M Valgimigli, L Gramantieri, F Tomassoni, L Bolondi and Stirpe F. 2001. Serum Xanthine Oxidase in Human Liver Disease. *Am J Gastroenterol.* 96:1194-9
- Boueiz, A., M. Damarla, and P. M. Hassoun. 2008. Xanthine oxidoreductase in respiratory and cardiovascular disorders. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294:L830-L840.
- Bray, R. C., and B. G. Malmstron. 1964. The chemistry of xanthine oxidase. The amino acid composition. *Biochem. J.* 93:633-634.
- Chien, K. R., I. J. Domian, and K. K. Parker. 2008. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science.* 322:1494-1497.
- Chong, B. M., P. Reigan, K. D. Mayle-Combs, D. J. Orlicky, and J. L. McManaman. 2011. Determinants of adipophilin function in milk

lipid formation and secretion. *Trends Endocrinol. Metab.* 22:211-217.

Claeys, W. L., C. Verraes, S. Cardoen, J. De Block, A. Huyghebaert, K. Raes, K. Dewettinck and L. Herman. 2014. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 42:188-201

Clifford, A. J., C. Y. Ho, and H. Swenerton. 1983. Homogenized bovine milk xanthine oxidase: a critique of the hypothesis relating to plasmalogen depletion and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 38:327-332.

Considine, T., H. A. Patel, S. G. Anema, H. Singh, and L. K. Creamer. 2007. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review. *Innov. Food Sci. Emerg.* 8:1-23.

Dawson, R. B., S. Rafal, and L. R. Weintraub. 1970. Absorption of hemoglobin iron: the role of xanthine oxidase in the intestinal heme-splitting reaction. *Blood* 35(1):94-103.

Demott, B. J., and O. A. Praepanitchai. 1978. Influence of storage, heat, and homogenization upon xanthine oxidase activity of milk. *J. Dairy Sci.* 61:164-167.

- Dennis, E. A., and M. G. Dennis. 1990. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Cop. 182:291-291.
- Dewettinck, K., R. Rombaut, N. Thienpont, T. T. Le, K. Messens, and J. V. Camp. 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* 18:436-457.
- Doehner, W., and U. Landmesser. 2011. Xanthine oxidase and uric acid in cardiovascular disease: clinical impact and therapeutic options. *Seminars in Nephrology*. 31(5):433-440.
- Doehner, W., N. Schoene, M. Rauchhaus, G. Schuler, and R. Hambrecht. 2002. Effect of xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from two placebo-controlled studies. *Circulation* 105:2619-2624.
- Egwim, E. C., M. A. Vunchi, and P. O. Egwim. 2005. Comparison of xanthine oxidase activities in cow and goat milks. *Biokemistri*. 17(1):1-6.
- El-Loly, M. M. 2011. Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 61:7-32.

Enroth, C., B. T. Eger, K. Okamoto, T. Nishinoi, and E. F. Pai. 2000.

Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *PNAS* 97(20):10723-10728.

Fang, J., and M. H. Alderman. 2000. Serum uric acid and cardiovascular

mortality the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1992.

National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 283:2404-2410.

Friedl, H. P., D. J. Smith, G. O. Till, P. D. Thomson, D. S. Louis, and P.

A. Ward. 1990. Ischemia-reperfusion in humans: appearance of xanthine oxidase activity. *Am. J. Pathol.* 136(3):497-495.

Godber, B. L. J., J. J. Doel, J. Durgan, R. Eisenthal, and R. Harrison.

2000. A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett.* 475:93-96.

Godber, B. L. J., J. J. Doel, G. P. Sapkota, D. R. Blake, C. R. Stevens, R.

Eisenthal, and R. Harrison. 2000. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 275:7757-7763.



- Granger, D. N. 1988. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia –reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 255:H1269-H1275.
- Harrison, R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic. Biol. Med.* 33(6):774-797.
- Harrison, R. 2006. Milk xanthine oxidase: properties and physiological roles. *Int. Dairy J.* 16: 546-554.
- Heid, H. W., and T. W. Keenan. 2005. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *Eur. J. Cell Biol.* 84:245-258.
- Hille, R. 1996. The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* 96(7):2757-2816.
- Hille, R., and T. Nishino. 1995. Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J.* 9(11):995-1003.
- Ho, C. Y., and A. J. Clifford. 1977. Bovine milk xanthine oxidase, blood lipids and coronary plaques in rabbits. *J. Nutr.* 107:758-766.
- Hoffmann, W., C. Kiesner, I. Clawin-Rädecker, D. Martin, K. Einhoff, P. C. Lorenzen, H. Meisel, P. Hammer, G. SuhRen, and P. Teufel.

2006. Processing of extended shelf life milk using microfiltration. *Int. J. Dairy Technol.* 59(4):229-235.
- Huth, P. J., D. B. DiRienzo, and G. D. Miller. 2006. Major Scientific Advances with Dairy Foods in Nutrition and Health. *J. Dairy Sci.* 89:1207-1221.
- Janssens, H. J. E. M., E. H. van de Lisdonk, M. Janssen, H. J. M. van den Hoogen, and A. L. M. Verbeek. 2006. Gout, not induced by diuretics? A case-control study from primary care. *Ann. Rheum. Dis.* 65:1080-1083.
- Jenkins, T. C., and M. A. McGuire. 2006. Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *J. Dairy Sci.* 89:1302-1310.
- Kelley, E. E., N. K. H. Khoo, N. J. Hundley, U. Z. Malik, B. A. Freeman, and M. M. Tarpey. 2010. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 48:493-498.
- Kim, S. C., S. Schneeweiss, N. Choudhry, J. Liu, R. J. Glynn and D. H. Solomon. 2015. Effects of xanthine oxidase inhibitors on cardiovascular disease in patients with gout: a cohort study. *Am J Med.* 128:653
- Kökoglu, E., A. Belce, E. Özyurt, and Z. Tepeler. 1990. Xanthine oxidase levels in human brain tumors. *Cancer Lett.* 50 (3) :179-181.

- Landmesser, U., S. Spiekermann, S. Dikalov, H. Tatge, R. Wilke, C. Kohler, D. G. Harrison, B. Hornig, and H. Drexler. 2002. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 106:3073-3078.
- Le, T. T., J. V. Camp, R. Rombaut, F. V. Leeckwyck, and K. Dewettinck. 2009. Effect of washing conditions on the recovery of milk fat globule membrane proteins during the isolation of milk fat globule membrane from milk. *J. Dairy Sci.* 92:3592-3603.
- Lopez, C., M. N. Madec, and R. Jimenez-Flores. 2010. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chem.* 120:22-33.
- Lopez, C. 2011. Milk fat globules enveloped by their biological membrane: unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 16:391-404.
- Martelin, E., R. Lapatto, and K. O. Raivio. 2002. Regulation of xanthine oxidoreductase by intracellular iron. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283(6):1722-1728.

- Mather, I. H. 2000. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 83: 203-247.
- Mazur, A., and A. Carleton. 1965. Hepatic xanthine oxidase and ferritin iron in the developing rat. *Blood* 26(3):317-322.
- Mccarthy, R. D., and C. A. Long. 1976. Bovine milk intake and xanthine oxidase activity in blood serum. *J. Dairy Sci.* 59:1059-1062.
- Mendel, R. R. 1983. Release of molybdenum co-factor from nitrate reductase and xanthine oxidase by heat treatment. *Phytochemistry.* 22(4):817-819.
- Michalski, M. C., R. Cariou, F. Michel, and C. Garnier. 2002. Native vs. damaged milk fat globules: membrane properties affect the viscoelasticity of milk gels. *J. Dairy Sci.* 85:2451-2461.
- Michalski, M. C., and C. Januel. 2006. Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends Food Sci. & Technol.* 17:423-437.

Morin, P., R. Jiménez-Flores, and Y. Pouliot. 2007. Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes. *Int. Dairy J.* 17:1179-1187.

Nishino, T., and K. Okamoto. 2000. The role of the [2Fe-2S] cluster centers in xanthine oxidoreductase. *J. Inorg. Biochem.* 82:43-49.

Ogg, S. L., A. K. Weldon, L. Dobbie, A. J. H. Smith, and I. H. Mather. 2004. Expression of butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:10084-10089.

Özer, N., M. M. D. Ataman, A. Ercan, and I. H. Ögüs. 1999. Simple, high-yield purification of xanthine oxidase from bovine milk. *J. Biochem. Biophys. Methods* 39:153-159.

Palmer, G., R. C. Bray, and H. Beinert. 1964. Direct studies on the electron transfer sequence in xanthine oxidase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. I. Techniques and description of spectra. *J. Biol. Chem.* 239(8):2657-2666.

- Priambodo, R., Y. J. Shih, Y. J. Huang, and Y. H. Huang. 2011. Treatment of real wastewater using semi batch (photo)-electro-fenton method. *Sustain. Environ. Res.* 21(6): 389-393.
- Puddu, P., G. M. Puddu, E. Cravero, L. Vizioli, and A. Muscari. 2012. The relationships among hyperuricemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *J. Cariol.* 59:235-242.
- Robenek, H., O. Hofnagel, I. Buers, S. Lorkowski, M. Schnoor, M. J. Robenek, H. Heid, D. Troyer, and N. J. Severs. 2006. Butyrophilin controls milk fat globule secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:10385-10390.
- Shamma'a, M. H., S. M. Nasrallah, and U. A. S. Al-Khalidi. 2005. Serum xanthine oxidase, an experience with 2000 patients. *Digest. Dis.* 18:15-22.
- Singh, H. 2006. The milk fat globule membrane-A biophysical system for food applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11:154-163.
- Singh, H., and A. Waungana. 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *Int. Dairy J.* 11:543-551.

Silanikove, N., and F. Shapiro. 2007. Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activity in bovine milk: Physiological and technological implications. *Int. Dairy J.* 17:1188-1194.

Silanikove, N., F. Shapiro, A. Shamay, and G. Leitner. 2005. Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: manipulation with casein hydrolyzates. *Free Radical Bio. Med.* 38:1139-1151.

Stirpe F., and E. Della Corte. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol. Chem.* 244(14):3855-3863.

Spiekermann, S., U. Landmesser, S. Dikalov, M. Brecht, G. Gamez, H. Tatge, N. Reepschläger, B. Hornig, H. Drexler, and D. G. Harrison. 2003. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 107: 1383-1389.

Spitsberg, V. L., and R. C. Gorewit. 1998. Solubilization and purification

- of xanthine oxidase from bovine milk fat globule membrane. *Protein Expr. Purif.* 13:229-234.
- Spitsberg, V. L. 2005. Invited review: bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *J. Dairy Sci.* 88:2289-2294.
- Trotta, P. P., E. M. Smithwick, and M. E. Balis. 1976. A normal level of adenosine deaminase activity in the red cell lysates of carriers and patients with severe combined immunodeficiency disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73(1):104-108.
- Waud, W. R., and K.V. Rajagopalan. 1976. Purification and properties of the NAD<sup>+</sup>-dependent (type D) and O<sub>2</sub>-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 172(2):354-364.
- Ye, A., H. Singh, D. J. Oldfield, and S. Anema. 2004a. Kinetics of heat-induced association of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin with milk fat globule membrane in whole milk. *Int. Dairy J.* 14:389-398.
- Ye, A., H. Singh, M. W. Taylor, and S. Anema. 2004b. Interactions of fat globule surface proteins during concentration of whole milk in a pilot-scale multiple-effect evaporator. *J. Dairy Res.* 71:471-479.
- Ye, A., H. Singh, M. W. Taylor, and S. Anema. 2002. Characterization of



- protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. *Int. Dairy J.* 12:393-402.
- Ye, A., H. Singh, M. W. Taylor, and S. Anema. 2004. Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. *Lait.* 84:269-283.
- Ye, A., J. Cui, and H. Singh. 2011. Proteolysis of milk fat globule membrane proteins during *in vitro* gastric digestion of milk. *J. Dairy Sci.* 94:2762-2770.
- Ye, A., S. G. Anema, and H. Singh. 2004. High-pressure-induced interactions between milk fat globule membrane proteins and skim milk proteins in whole milk. *J. Dairy Sci.* 87:4013-4022.
- Ye, A., S. G. Anema, and H. Singh. 2008. Changes in the surface protein of the fat globules during homogenization and heat treatment of concentrated milk. *J. Dairy Res.* 75: 347-353.
- Ye, A. 2010. Surface protein composition and concentration of whey protein isolate-stabilized oil-in-water emulsions: Effect of heat treatment. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 78:24-29.
- Yu, K., and S. Luo. 2003. Younger age of onset of gout in taiwan. *Rheumatology* 42(1):166-170.

Yu, K. H. 2007. Febuxostat: a novel non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase for the treatment of hyperuricemia in gout. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 1:69-75.

Zikakis, J. P., S. J. Rzedzic, and N. O. Biasotto. 1976. Persistence of bovine milk xanthine oxidase activity after gastric digestion *in vivo* and *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 60(4):533-541.

## VIII、英文摘要

Xanthine oxidase (XOase) mainly exists in milk fat globule membrane, and its activity alters due to milk processing. The study aims to investigate the effect of cream heat treatment for HTST whole and low-fat milk on the activity of xanthine oxidase. The XOase was purified from cow milk through ammonium sulphate fractionation and the enzyme activity was detected by UV-spectrophotometer at 285 nm wavelength to measure uric acid formation. The results showed XOase activity in un-homo skim milk with HTST (72°C, 15s) is lower than that in no heat-treated skim milk ( $P < 0.05$ ). XOase activity showed significantly different between un-homo cream and homo cream. After cream heat treatment (121°C, 15min), XOase activity in un-homo and homo raw cream becomes significantly lower. After standardization, the XOase activity between HTST low-fat fresh milk (1.5%) and HTST whole fat milk (3%) is no significant difference. In conclusion, the best way to decrease XOase activity is to sterilize cream before standardizing milk through HTST. This study may provide a suitable method to produce the lower XOase activity of HTST fresh milk.