

## 壹、中文摘要

乳糖受熱後經由兩大路徑產生變化，其一為經異構化作用 (isomerization) 形成乳酮糖 (lactulose)；另一為乳糖之熱衍生物與胺基酸相互反應發生蛋白質鍵結的梅納反應 (Maillard reaction)，形成安瑪多立產物 (lactulosyllysine)。

本研究係以高效能液相層析儀 (HPLC) 配備 LiChroCART 100 NH<sub>2</sub> 分離管柱，以氘甲烷：0.01 mol/L 磷酸二氫鈉溶液 (81：19) 為移動相 (1.0 mL/min)，偵測生乳與還原乳分別以低溫長時間殺菌法 (LTLT)、高溫短時間殺菌法 (HTST)、仿超高溫殺菌法 (UHT) 及滅菌法 (sterilization) 等處理後其葡萄糖、半乳糖、乳糖及乳酮糖等之變化。

結果顯示鮮乳中葡萄糖與半乳糖的含量會隨著低溫長時間殺菌法、高溫短時間殺菌法、仿超高溫殺菌法及滅菌法等處理逐漸增加，乳糖則會隨之減少，乳酮糖則僅出現在滅菌鮮乳中，故藉此三者之含量，應可有效作為鮮乳係經何種受熱處理之辨識指標。

當有乳粉還原乳存在時，其所佔的比例愈高，則乳中的碳水化合物會因加熱程度的不同而產生越趨明顯之變化，其中葡萄糖與半乳糖和乳酮糖含量顯著升高，而乳糖含量則趨

減少；但就葡萄糖與半乳糖對乳酮糖之比例，經仿超高溫殺菌法之還原乳是隨著乳粉還原乳的比例增加而減少，而經滅菌法之還原乳則呈相反現象。

## 貳、前言

牛乳為富含各種營養成分之高營養液體，自然亦為微生物發育之極適合液體，故當微生物於牛乳中孳長時，即使其發生酸敗或腐敗。因此，為了使乳製品符合衛生安全及提高其保存時間，一般均需施以熱殺菌（pasteurization）或滅菌（sterilization）處理。惟牛乳係一種對熱不安定之物質，其主要成分受熱後，會引起種種物理或化學方面的變化，亦同時降低了原應有的營養價值，且此現象將隨著加熱程度越強其所引起之變化程度越趨明顯。

牛乳中的碳水化合物大部分為乳糖，係半乳糖及葡萄糖各一分子以  $\beta$ -1,4 結合而成的雙醣類，其結構易因受熱而發生變化。乳糖受熱後其主要的反應路徑有二，其一為乳糖異構化形成乳酮糖，另一條路徑為乳糖與胺基酸間之梅納反應，隨後再降解為半乳糖、蟻酸或聚合成其他褐化物質。

就目前之研究顯示，乳酮糖並不存在於生乳中，但會隨著生乳熱處理程度之增加其生成量亦明顯增加，此一結果啟迪吾人探討牛乳製品於不同殺菌條件下與乳糖、乳酮糖之間關係的構想。

供製鮮乳之原料有生乳、再製乳與乳粉還原乳等，本研

究主要目的係藉 HPLC 分析乳糖及其熱衍生物，並探討不同乳原料在不同受熱條件下，乳糖及其熱衍生物間的變化，以期能簡單有效的區別鮮乳與其受熱程度之關聯性，並進一步探討應用其作為鮮乳受熱指標之可行性。

## 參、文獻探討

供作乳製品之原料可分為生乳、無菌包裝滅菌乳（再製乳）及乳粉等，或可將上述二者或三者混合，均可製成市售之乳品。乳品加工之熱處理一般可分為 LTLT、HTST、UHT 及保持滅菌法，而乳粉的製造則須經過更多次熱處理，再進行噴霧乾燥的步驟。

為了解受熱程度對鮮乳製品加工之影響，茲先就與本研究有關之乳糖及其熱衍生物的變化作一探討，期俾益於乳製品加工受熱程度指標之研究。

### 一、牛乳之成分

乳 (milk) 乃哺乳動物分娩後自乳腺產生之分泌物，係白色帶黃白色之液體，而牛乳為母牛分娩之後為了提供仔牛營養而於乳腺生產分泌之物質。牛乳含有仔牛發育與維持健康所需之充分營養分，包括水分、乳蛋白質、乳脂肪、碳水化合物、灰分等及各種微量成分均概括在內。

一般牛乳成分分為水分與總固形分 (total solids)，其中總固形分中又包括乳脂肪與無脂固形分 (solids-not-fat, SNF)，如圖 1 所示。而無脂固形分中概括乳蛋白質、非蛋白

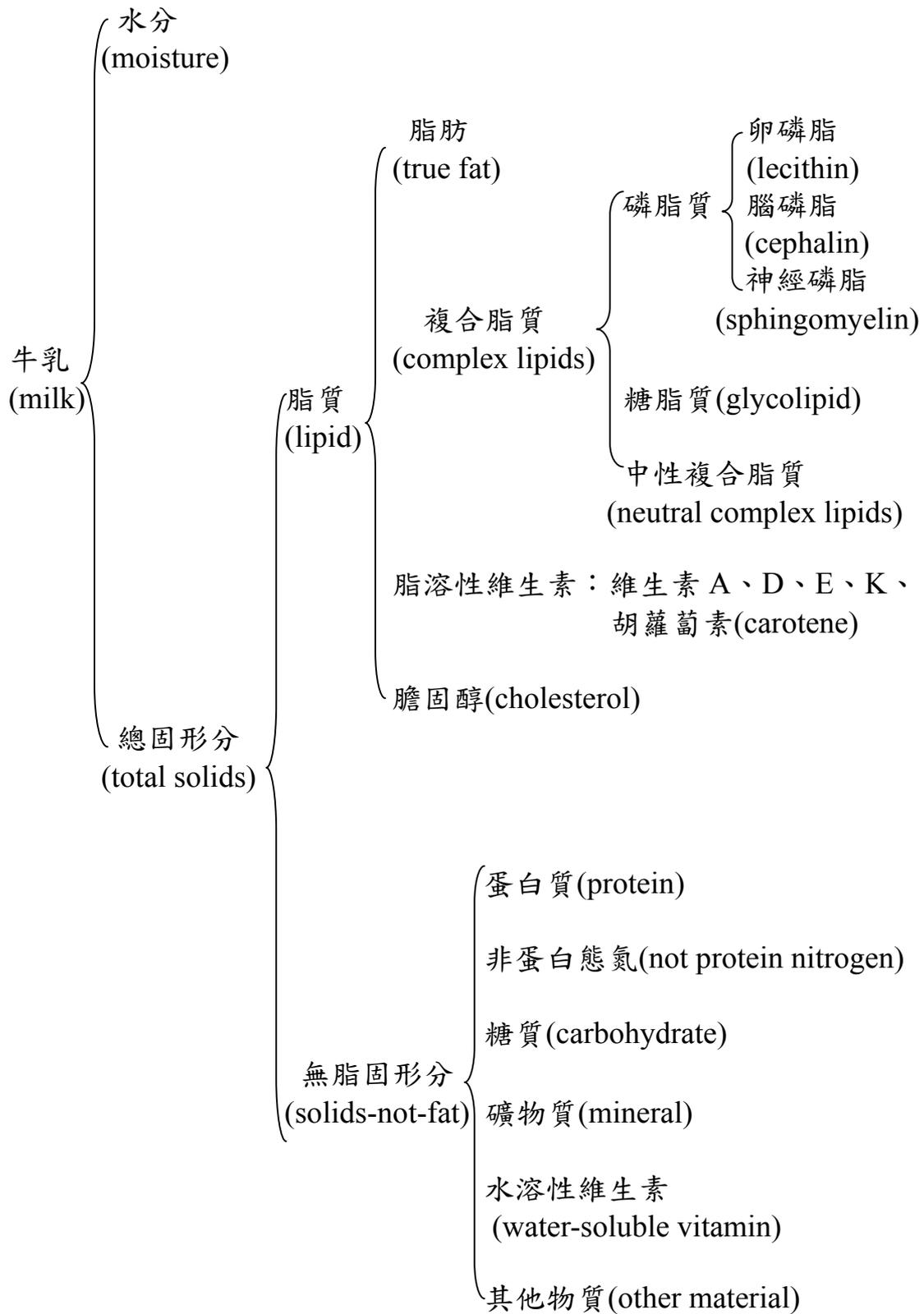


圖 1. 牛乳之組成。

Fig. 1. The composition of milk. (張, 1995)

態氮化合物 (not protein nitrogen; NPN)、碳水化合物 (carbohydrates)、礦物質、水溶性維生素及各種主要、次要及微量成分等綜合概括如表 1 所示。

牛乳含水分約 88%，而其他主要成分如乳蛋白質約佔牛乳的 2.8~4.0%，乳蛋白質成膠質 (colloid) 狀態懸濁液 (suspension) 分散於牛乳的其他成分中；乳脂肪係以微細的乳濁狀態 (emulsion) 分散於牛乳中，一般含量在 3~5% 之間；至於碳水化合物 99.8% 以上為乳糖 (lactose)，其他為微量之葡萄糖、半乳糖等醣類，牛乳之乳糖含量為 4.4~5.2%，平均為 4.8%，以溶液狀態存在牛乳中 (林，2000；張，1995；Maijala, 2000)。

## 二、牛乳之加熱條件

牛乳為富含各種營養成分之高營養液體，同時亦為微生物發育之極適合液體，故細菌易於牛乳中孳長，使其酸敗或腐敗而失去其營養價值。因此，為了使乳製品符合衛生安全及提高其保存時間與營養價值，一般牛乳需實施殺菌或滅菌處理，而牛乳殺菌或滅菌之方法，以加熱處理最為普遍。

牛乳之加熱處理，可區分成殺菌與滅菌。殺菌乃將混於

表 1. 牛乳之主要與次要成分

Table 1. Summary of the composition cow's milk in Finland <sup>a</sup>

Name	%	Sub components	Sub sub components or remarks
Water	86.8		Water soluble vitamins
Lactose	4.8	Galactose Glucose	Cannot be found elsewhere
Fat	4.4	Fatty acid	Short chained unique in milk altogether c. 400 fatty acid
		Glycerides	Tri, di and monoglyceride
		Phospholipids	Lecithins in all animal cells
		Sterols	Cholesterol, important for brains
		Vitamins	A, D, E, K
Protein	3.3		c. 20 amino acids, of which 8 necessary for human
		Casein (80%) Whey protein (20%)	c. 20 genetic type $\beta$ -lactoglobulin, $\alpha$ -lactalbumin, serum albumin, immunoglobulin
Mineral	0.7	Microproteins Macro minerals Micro minerals	Enzymes, hormones etc Ca, P, K, Cl, Na, Mg Zn, Cr, I, F, Fe, Cu, Co, Mn
Others	Trace	Trace elements	Enzymes, hormones, gases, NPN compounds, S binding component

<sup>a</sup>Boldface = an important source of the vitamin/mineral for humans.

(Maijala, 2000)

牛乳中之病原菌完全殺滅，但是細菌孢子之殺滅需要高溫長時間處理；滅菌乃將一切微生物包括其孢子完全殺滅。為了不同產品的需求，又會有不同的殺菌或滅菌過程之分別，一般牛乳殺菌與滅菌之條件係由加熱溫度與受熱保持時間來加以區別（林，2000；張，1995）。

### （一） 殺菌

#### 1. 低溫長時間殺菌法（low temperature long time pasteurization；LTLT）：

一般為 61~65°C，維持 30 分鐘，或是 72~75°C，維持 10~15 分鐘（林，2000；張，1995）。此法係以殺死病原菌為目的，製品僅能於 5~10°C 保存約 1~2 星期。

#### 2. 高溫短時間殺菌法（high temperature short time pasteurization；HTST）：

一般為 70~75°C，維持 15~16 秒鐘（林，2000；張，1995）。此可將大部分的微生物殺死，但部分對乳製品較無影響的耐高溫菌仍存在，如此可減短加熱的時間，節省成本並降低乳製品營養及風味的損耗。

## (二) 滅菌

### 1. 保持滅菌法 (holding sterilization) :

一般為 121°C，維持 12~15 分鐘，又稱為瓶裝滅菌法 (in bottle sterilize) (林，2000；張，1995)。能將食品中的微生物完全殺死，乳製品保存的時間延長許多，惟其最大的缺點係因加熱溫度過高，導致乳製品組成分變化或破壞而影響乳製品的品質。

### 2. 超高溫瞬間滅菌法 (ultra high temperature sterilization ; UHT) :

一般為 130~150°C，維持 0.5~4 秒鐘 (林，2000；張，1995)。在最佳的滅菌程度下，對乳製品的破壞最少。乳製品經過 UHT 滅菌後為無菌狀態，若併用無菌充填系統與包材，則可成為保久乳 (long-life milk)，但若無利用無菌充填，則僅能成為一般市售的殺菌鮮乳。

此外，依據加熱模式的不同，UHT 加熱法又可區分為直接加熱法與間接加熱法兩種 (林，2000；張，1995)。

#### (1) 直接超高溫瞬間滅菌法 (direct UHT) :

原料乳 → 預熱 (75~80°C) → 以蒸氣混合直接加熱

(130~150°C) → 維持 0.5~4 秒鐘 → 冷卻 → 無菌  
充填。

(2) 間接超高溫瞬間滅菌法 (indirect UHT) :

原料乳 → 第一段加熱 (至 85°C) → 均質化 → 第二  
段加熱 (至 135°C 以上) → 維持約 2 秒鐘 → 冷卻  
→ 無菌充填。

### 三、牛乳中之碳水化合物

醣類為生物界主要營養素之一，並提供人類膳食中約 80% 的熱能來源。其構成主要元素為碳、氫、氧三者，其中氫與氧之比通常為 2:1，與組成水之氫氧比相同，故又被稱為碳水化合物。

單醣的一般結構，除了其中一個碳原子是以雙鍵連接一個氧原子而形成羰基 (carbonyl group) 外，其餘碳原子都連接一個羥基 (hydroxy group)。依照羰基的位置，單醣分為醛醣 (aldoses) 和酮醣 (ketoses)，如圖 2 所示 (Campbell and Farrell, 2003)；另一種分類單醣的標準是碳骨架的大小，有 N 個碳原子就稱為 N 碳醣；還有一種單醣差異的來源是由於

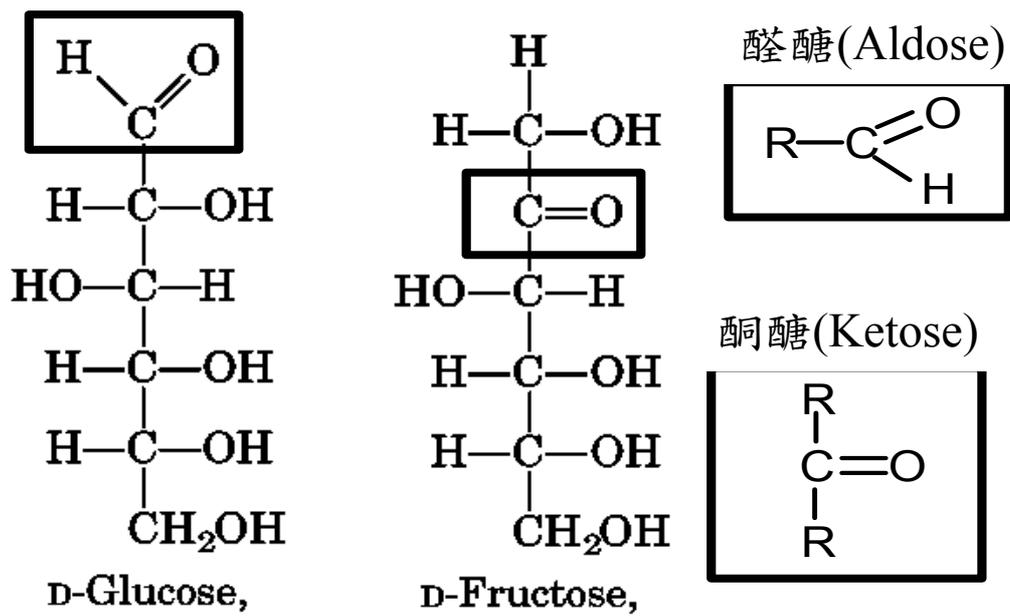


圖 2. 葡萄糖與果糖之結構。

Fig. 2. The structure of glucose and fructose.

(Campbell and Farrell, 2003)

這些不規則碳原子的周圍空間分佈(鏡像異構物)，如葡萄糖和半乳糖。在溶液內，直鏈式的六碳醣及五碳醣較易形成穩定的環狀結構，而醛類與醇類反應可形成半縮醛(hemiacetal)，C1 與 C5 之羥基反應形成分子內半縮醛(intramolecular hemiacetal)，當酮類與醇類反應可形成半縮酮(hemiacetal) (張，2001)。

牛乳中的碳水化合物大部分為乳糖，約佔牛乳總碳水化合物 99.8% 以上，其他則為少量的葡萄糖、半乳糖及其他醣類(林，2000；張，1995；張，2001)。乳糖是由 2 分子的單醣經由醣苷鍵結(glycosidic linkage) 再去一分子水而形成，亦即由一分子半乳糖(D-galactose) 及一分子葡萄糖(D-glucose) 以  $\beta$ -1,4 結合而成的雙醣類，其單醣之聚合及乳糖之結構如圖 3 所示(林，2000；張，1995；張，2001)。

#### 四、牛乳中乳糖受熱之變化

乳汁由泌乳牛分泌後，需經過一連串的加工處理，才能製成消費者手中的乳製品。無論乳品加工廠所收集的乳源如何，其絕對與剛由泌乳牛體擠出之牛乳不同，如牛乳中可能發生之微生物態改變，即會影響最終製品之品質、保存性及

β-半乳糖 (β-galactose)

α-葡萄糖 (α-glucose)

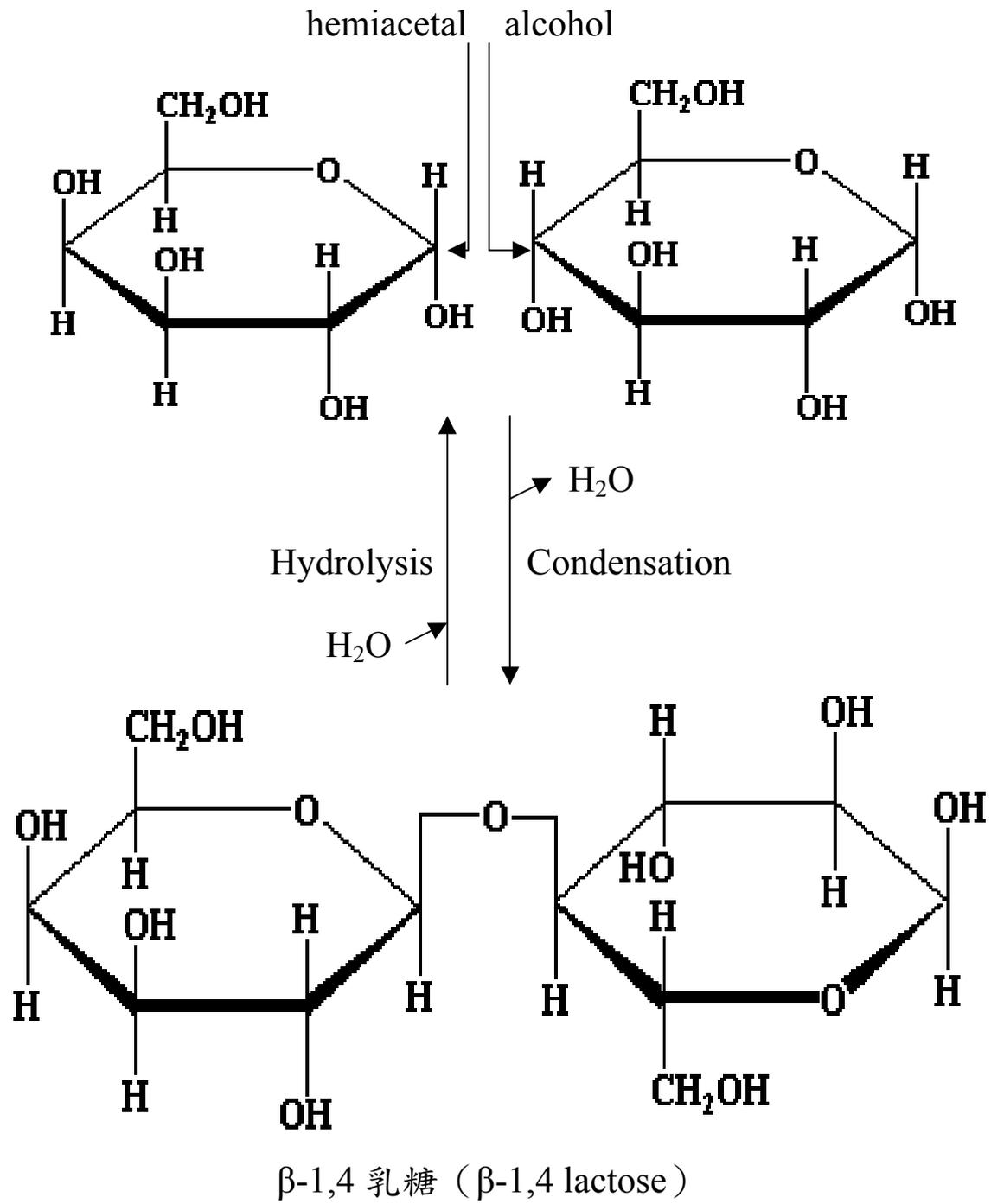


圖 3. 乳糖之結構。

Fig. 3. The structure of lactose. (張, 2001)

安全性。

加熱處理為乳製品加工共同之過程，其主要目的乃為了殺菌或滅菌，牛乳加熱後會產生種種物理或化學上的變化，加熱溫度愈高，時間愈長，其變化即愈顯著，由於牛乳中的碳水化合物以乳糖為最大宗，因此乳糖在牛乳加熱後產生種種的變化上扮演了一個極為重要的角色。

如前所述，乳糖是由一分子半乳糖及一分子葡萄糖以 $\beta$ -1,4 結合而成的雙醣類，惟其雙醣結構容易在加熱的過程中發生異構化作用而產生異構物質 (isomer) (Andrews, 1986 ; Berg and Van Boekel, 1994) ; 乳糖亦可能在高溫下脫水，分子間發生縮合反應，進而產生黑褐色的焦糖產物 (caramelization products)，亦即所謂的焦糖化反應 (caramelization) (Greig and Payne, 1985) ; 而乳糖又會與蛋白質或胺基酸發生縮合反應，引起梅納反應 (Maillard reaction) (Frideman, 1996 ; Yaylayan, 1997)。

茲歸納乳糖在牛乳受熱過程中可能產生的反應如下：

#### (一) 乳糖之異構化

乳糖在受熱過程中，會發生鍵結斷裂、位移，經過 Lobry de Bruyn & Alberda van Ekenstein (LA) 轉換，進而產生異構

化物質乳酮糖，如圖 4 所示 (Andrews, 1986)，最主要的改變是乳糖中葡萄糖結構發生轉換變成果糖結構而生成異構化物質乳酮糖，在加熱的牛乳中，乳酮糖較乳糖不易降解，其可能繼續發生表異構化作用 (epimerization) 生成 epilactose (galactosyl-mannose)，如圖 5 所示 (Andrew, 1986)；亦可能經由  $\beta$ -elimination 發生降解作用釋放出半乳糖產生異糖酸 (isosaccharinic acid)，如圖 6 所示 (Andrew, 1986)。一般推測乳糖受熱過程中亦會產生 1,2-烯二醇 (1,2-enediol)，一條路徑形成 epilactose，接著釋放出半乳糖、3-去氧葡萄糖酮醛 (3-deoxyglucosone)、蟻酸 (formic acid)、2-去氧核糖 (2-deoxyribose) 及羥甲糠醛 (hydroxymethylfurfural；HMF)；另一條路徑則是在第一和第二碳的位置異構化形成乳酮糖，而乳酮糖再異構化形成 2,3-烯二醇 (2,3-enediol)，釋放出半乳糖、異糖酸、糠醛以及 C5、C6 等化合物，如圖 7 所示 (Berg and Van Boekel, 1994；Olano and Calvo, 1989；Olano *et al.*, 1992)。

## (二) 焦糖化反應

焦糖化反應是一種自動催化 (autocatalytic) 反應，溫度

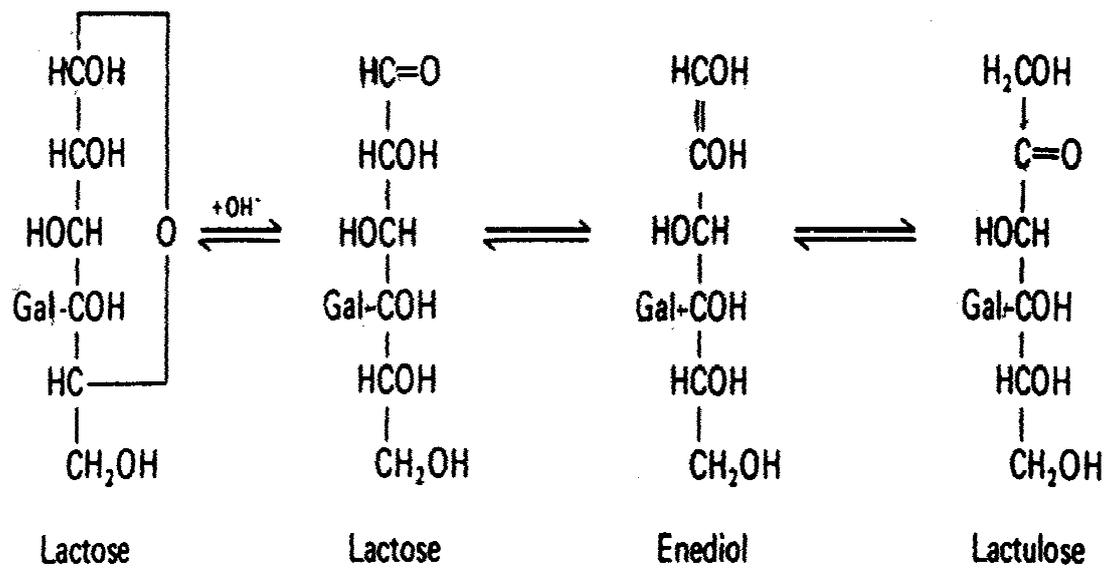


圖 4. 乳酮糖之生成。

Fig. 4. Lobry de Bruyn & Alberda van Ekenstein (LA)

transformation of lactulose. (gal=galactosyl)

(Andrews, 1986)

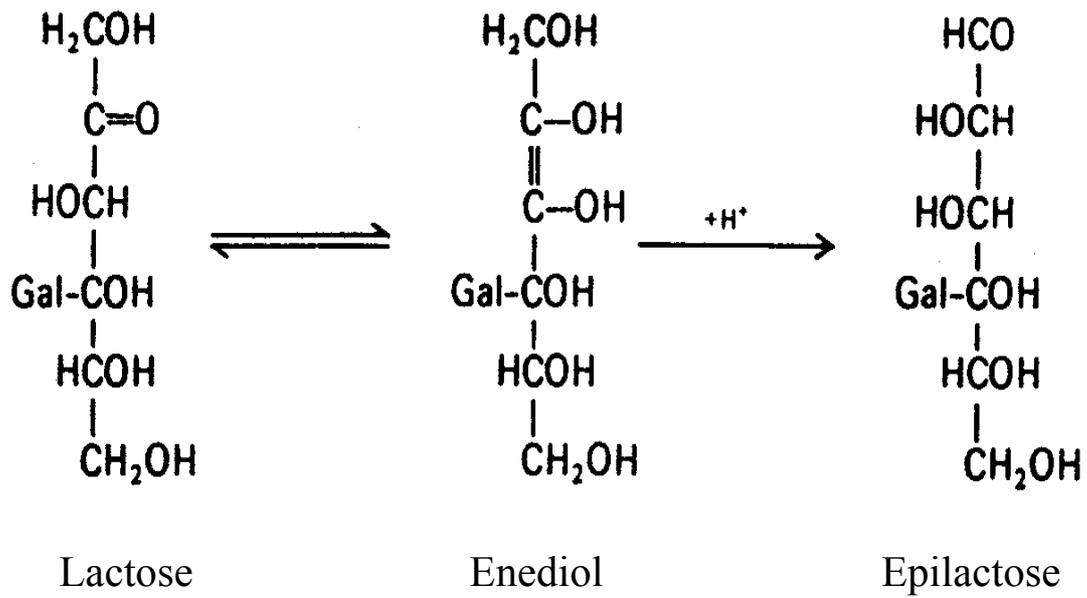


圖 5. Epilactose 之形成。

Fig. 5. Epimerization of lactulose to epilactose. ( gal=galactosyl )

( Andrew, 1986 )

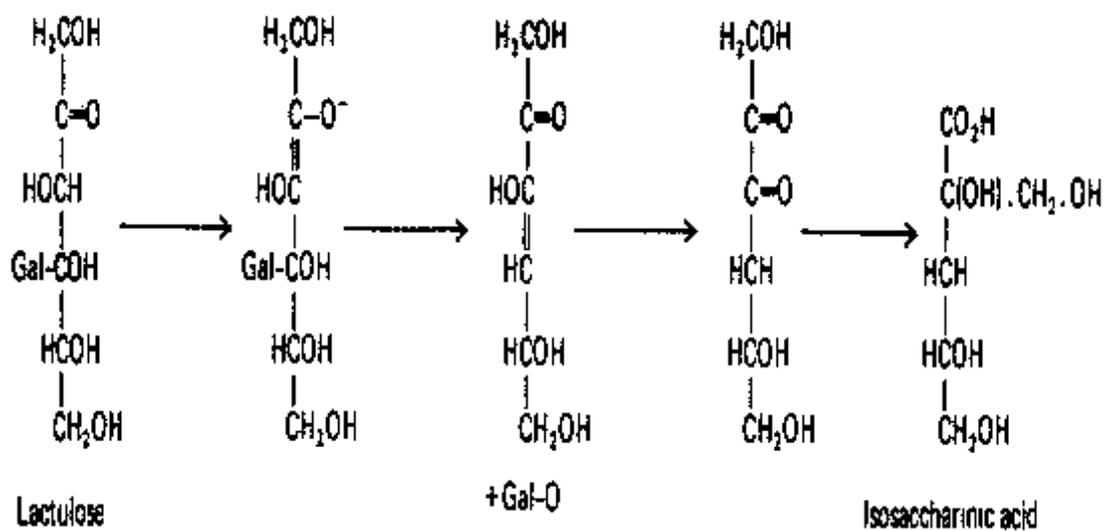


圖 6. 乳酮糖之降解作用。

Fig. 6. Degradation of lactulose by  $\beta$ -elimination.

(gal=galactosyl)

(Andrew, 1986)

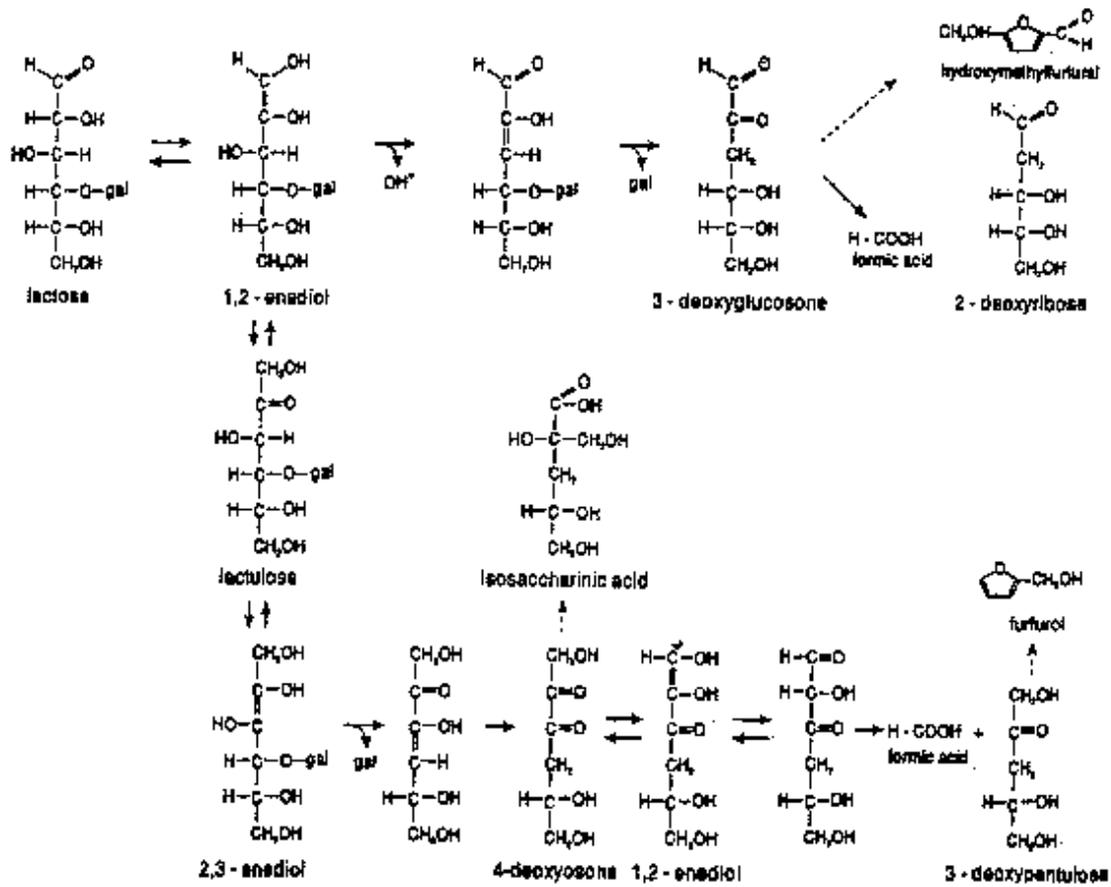


圖 7. 乳糖受熱之反應。

Fig. 7. Reaction schemes leading to formation of galactose, C6 compounds, formic acid and C5 compound from lactose through heat processing. (gal=galactose)

(Berg and Van Boekel, 1994)

之增加不僅會提高反應速率，且會產生有色物質。乳糖在高溫下分解、脫水，分子間發生縮合反應，在這個過程當中所產生的物質，有不少成分已被認為具有焦糖味，而醴受熱時顏色隨溫度及加熱時間之增加而改變，顏色的改變同時伴隨著味道之變化，最後產生黑褐色帶苦味的碳化物質。一般在牛乳於液體狀態加熱過程中焦糖化反應之程度較輕微，除非過度加熱才可能發生（林，2000；張，1995；Greig and Payne, 1985）。

### （三）梅納反應（Maillard reaction）

梅納反應是一種胺基酸群與還原糖相互作用的化學反應，此反應會影響食品中的性質。梅納反應可以細分成三個階段，初期梅納反應（early Maillard reaction）、中期梅納反應（advanced Maillard reaction）與末期梅納反應（final Maillard reaction）三個階段。初期梅納反應是還原糖與胺基酸群反應形成希夫鹼（Schiff's base），再經由安瑪多立重排作用（Amadori rearrangement）重組成安瑪多立產物（Amadori product）之 lactulosyllysine。中期梅納反應是安瑪多立產物開始產生分裂降解形成醴胺化合物的分裂產物。末期梅納反

應是胺基酸化合物與糖的碎片開始形成蛋白質聚合與褐化物質的產生，這是還原糖與胺類在沒有酵素的存在下發生反應，產生黃棕色物質，此種反應亦屬非酵素性糖化反應 (nonenzymatic glycation) 之梅納反應 (Maillard reaction) (O'Brien and Labuza, 1994 ; Turner *et al.*, 1978 ; Van Boekel, 1998 ; Yaylayan, 1997)

### 1. 初期梅納反應

在初期梅納反應，乳糖與胺基酸群蛋白質鍵結形成希夫鹼，再經由安瑪多立重排作用重組成蛋白質鍵結的安瑪多立產物 lactulosyllysine，如圖 8 所示。在安瑪多立重排作用的過程裡，醛糖被轉變成酮糖。只要加熱狀態不要太強烈或是反應時間不要過長，安瑪多立產物在牛乳中其實是很安定的。這個階段最大的影響是離胺酸的可利用性下降，此時並沒有任何的顏色或是風味物質的產生 (Berg and Van Boekel, 1994 ; Manzocoo *et al.*, 2001 ; Van Boekel, 1998)。

事實上，安瑪多立產物是可以被測量的，Furosine 是一種人工的胺基酸，可以從安瑪多立產物酸水解中產生，其結構式如圖 9 所示。在許多報告中指出，Furosine 可作為牛乳

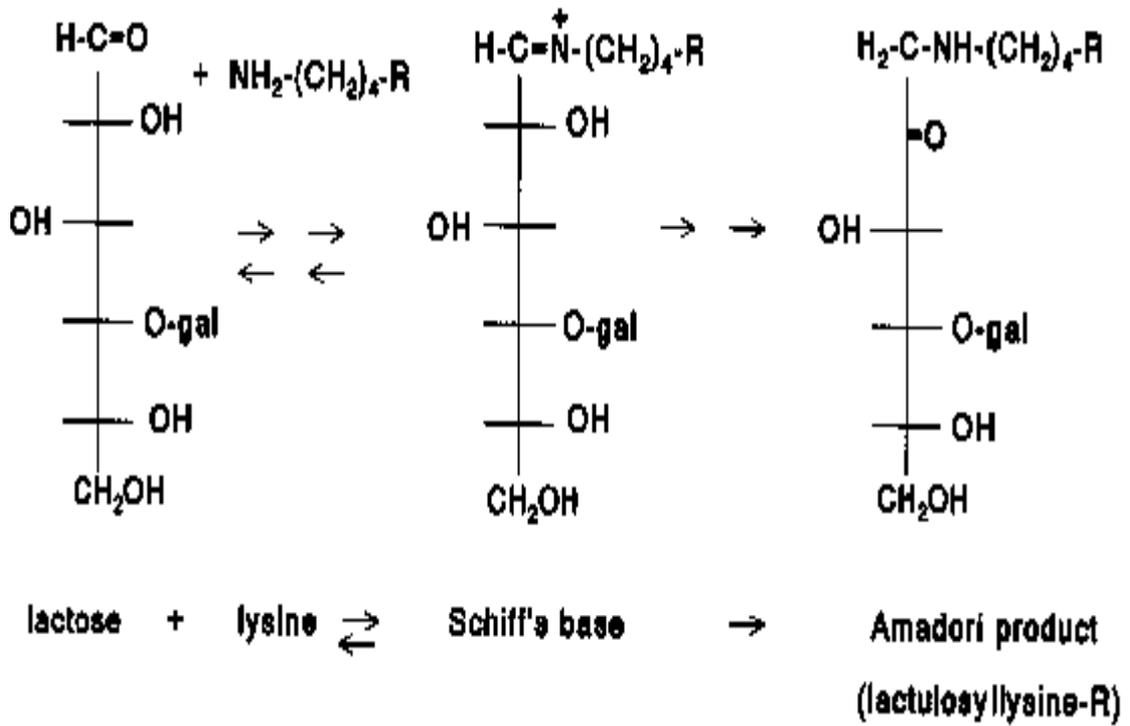


圖 8. 牛乳初期梅納反應。

Fig. 8. Schematic overview of the early Maillard reaction in milk, leading to Amadori product. (gal=galactose, R=protein chain) ( Van Boekel, 1998 )

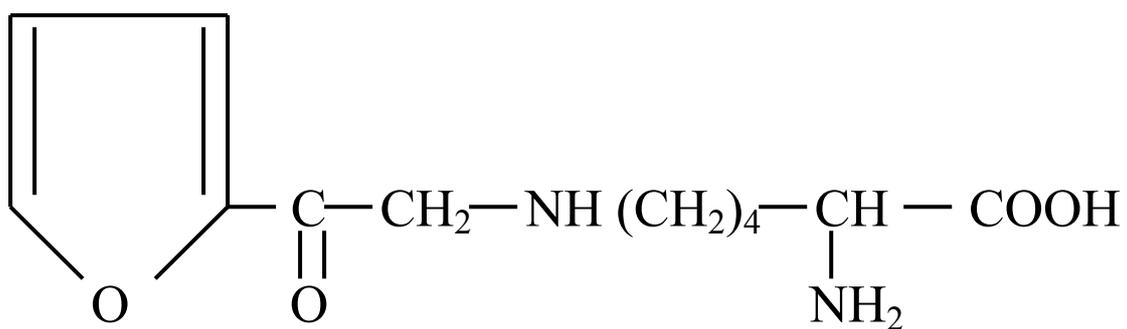


圖 9. Furosine 之結構。

Fig. 9. Structure of furosine.

( Van Boekel, 1998 )

受熱之指標物質，其含量也代表著初期梅納反應的程度

(Corzo *et al.*, 1994; Erbersdobler *et al.*, 1987; Pellegrino *et al.*, 1995; Van Boekel, 1998; Van Renterghem and Block, 1996)。

## 2. 中期梅納反應

在中期梅納反應，主要是安瑪多立產物發生裂解，經過烯醇形式形成安瑪多立化合物。

主要的路徑有三條，在酸性狀態下，安瑪多立產物經 1,2-烯醇化的 3-deoxyosone-pathway；在中性狀態下，安瑪多立產物經 2,3-烯醇化的 1-deoxyosone-pathway；在鹼性狀態下，安瑪多立產物是經 4-deoxyosone-pathway。而不同的路徑所產生的反應化合物也不同，如圖 10 所示 (Adachi and Patton, 1961; Hewedy *et al.*, 1994; Morales and Van Boekel, 1997; Valero *et al.*, 2001)。

## 3. 末期梅納反應

這個階段主要是褐色碎片 (melanoidins) 的產生以及蛋白質交叉連結的發生。Melanoidins 是一個分子量很大的物質 (大約 1,000,000)，包含氮在其中，當此黑褐色物質產生，

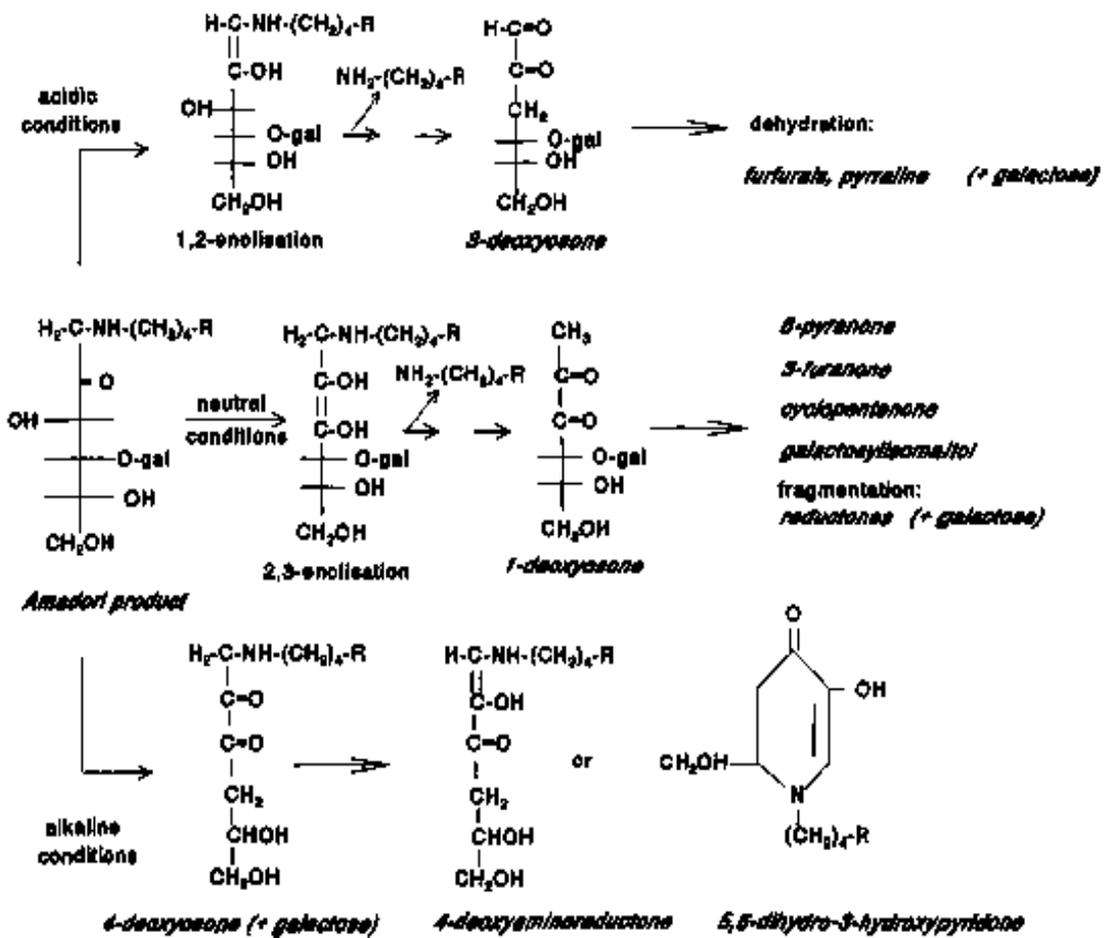


圖 10. 中期梅納反應。

Fig. 10. Breakdown of the Amadori product in the advanced Maillard reaction under acidic, neutral and basic conditions. (gal=galactose, R=protein chain)

(Van Boekel, 1998)

對牛乳之顏色及風味均造成很大的影響 ( Brands *et al.*, 2002 ; Manzocoo *et al.*, 2001 ; Martins *et al.*, 2003 )。

綜合梅納反應對牛乳與乳製品的影響可包括：

- (1) 營養價值的流失 ( Frideman, 1996 )
- (2) 風味化合物的形成 ( Frideman, 1996 )
- (3) 抗氧化化合物的形成 ( Bressa *et al.*, 1996 )
- (4) 突變與致癌化合物的形成 ( Shibamoto, 1982 )
- (5) 抗菌性化合物的形成 ( Einarsson *et al.*, 1983 )
- (6) 降低牛乳過敏症 ( Frideman, 1996 )
- (7) 牛乳蛋白質聚合 ( Zin El-Din *et al.*, 1991 )
- (8) 褐色發生 ( Morales and Jimenez-Perez, 2001 ; Morales and Van Boekel, 1998 )