



肉種及相關製品鑑別法

唐玉芸、談國雄、傅幼敏

肉及其製品中攙雜其它價格低廉之原料肉、副產物及非肉原料以降低成本價格及穩定產品品質的情況日趨增加，而添加之取代物，往往會因種類、添加量及加工條件總總因素不同而影響肉製品之品質，這些因素包含種源（包含地區性因素、野生或飼養種及性別差異）、添加的取代物來源（魚類蛋白、油脂類及植物性蛋白質等）、加工方式、不同的處理方式（照射性處理）、添加風味劑、水分或保水劑及烹煮方法等相關問題都可能造成肉類或肉類製品攙雜的問題⁽¹⁾。我國加入 WTO 之後，國外肉品進入國內市場的情況大增，肉品業者因成本考量若有攙雜或混充未標示種源之屠體肉或內臟部位之情事將不易由外觀所察覺。

常用於鑑別的方法除外觀鑑定法外另包含有蛋白質膠體電泳法、色層分析(chromatography)法、DNA 分子標記法等。茲將原理及優缺點詳述如下：

1. 外觀鑑定法：

可藉由有經驗人員以肉眼或是觸摸質地感覺而為之或是經由比較顏色差異性來檢測，缺點則是絞碎混合的碎肉無法辨識或是經低溫冷凍後的肉類不易由顏色辨別，但具有方法簡單、快速且成本低廉等優點。

2. 蛋白質膠體電泳法：

肉類蛋白質提供了食品中重要的官能性質，可依其溶解特性分為三種不同種類分別為具水溶性的肌漿蛋白(sarcoplasmic proteins)、鹽溶性的肌原纖維蛋白(myofibrillar proteins)及非溶性的基質蛋白(stromal proteins)，而由不同胺基酸組成的蛋白質在不同的物種下皆會有差異性，可作為檢測時的依據⁽²⁻³⁾。之前有關膠體電泳法研究中最常使用的方法為 SDS-PAGE 法及膠體毛細管電泳法，利用蛋白質為檢測標的，但限制則為被測定的組織中必須保有完整的蛋白質，因此經過加熱、滅菌處理或特殊處理的加工肉製品，因可能破壞其蛋白質結構，而降低檢測敏感性與正確性，對於高度加工製品影響其檢測結果，再則，由於動物不同組織中所含的特定蛋白質種類與數量都有些差別，使得一些由部分動物內臟或血液混合加工而成的製品，其動物種源鑑別工作難以施行⁽⁴⁾。

3. 免疫分析法：

抗體或免疫球蛋白(immunoglobulin; Ig)，在現代生物技術領域中，被廣泛使用於偵測遺傳性疾病，利用抗原及抗體間相互存在之特異性及敏感度來檢測及定性肉類中所含有的荷爾蒙、微生物、蛋白質、殺蟲劑及黴菌毒素等物質並已發展成商業用的檢測工具⁽⁵⁾，如 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays)、膠體免疫擴散法(agarose gel immunodiffusion; AGID)，如在生肉類製品的測定上，AOAC 於 1990 年曾發表兩種隔夜快速檢測法，分別為 ORBIT

(overnight rapid bovine identification test)及 PROFIT (poultry rapid overnight field identification test)，為在 18-24 小時內分別檢測牛肉及禽肉的培養基質免疫擴散測定法，可應用於肉類製品中有超過 5-10%以上比例的攙雜品時。其它應用於牛肉、羊肉、馬肉及鹿肉的免疫快速檢定法 SIFT (similar species identification field tests)也於 1988-1992 年間由 Cutrufelli 及 Samarajewa 等人所發現出來，但由於具有交互反應作用而無法應用於檢測雞肉及火雞肉等相似物種的測定上，總體而論，免疫分析法的缺點為所需抗體量較多、耗時，無法檢測加熱過之肉製品，在相似性物種如綿羊及山羊上無法有效檢測並易受到肉製品中添加物（鹽、香料）影響，與電泳法相同具有因部位而造成種類及比例差異的情況。

4. DNA 分子標誌法：

DNA 為生物之遺傳物質，最常用於生物種源及遺傳鑑定，而粒腺體(mitochondria; mt)存在於需氧的真核生物細胞內，利用粒腺體 DNA 來鑑定物種有遍存於真核生物中、容易純化分離、基因構造簡單、演化變異單純、直線式的基因傳遞及演化快速等優點⁽⁶⁾。此外，使用粒腺體 DNA 作為檢測物種間所存有的特殊基因片段有幾項優點，如：提供了即使在熱加工後仍有適當的大小可作為延伸模板，更由於在粒腺體基因序列上已有大量的探討，使得在引子的設計上具有可獲得性，再加上混合後仍能精準的檢測出粒腺體 DNA。

廣為運用之 DNA 分子標誌，大抵包含：限制片段長度多型性 (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)、核酸隨機增殖多型性 (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD)、增殖片段長度多型性 (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP) 及微衛星分子標誌 (又稱為 Simple sequence repeat; SSR) 等。

限制片段長度多型性的特性為DNA 經限制酶切割 (digestion)，由於不同生物個體染色體上限制酶切點 (restriction site) 之數目與位置不同，切出之片段大小顯出差異性，即出現DNA 長度多型性，RFLP 多用於親緣關係分析、圖譜建立等，然而分析流程太長，需耗費大量時間與人力，所須DNA 樣本量多，且須進行大量分析才得以確定結果，在同一次分析中所能偵得基因座亦較少，理論上，粒腺體DNA 對某一限制酶有N 個限制酶 (restriction enzyme) 切點存在時，可分切成N個DNA 片段。

相較於RFLP，核酸隨機增殖多型性 (RAPD) 為顯隱性、聚合酶連鎖反應為基礎之分子標誌，分析上採用隨機序列引子，經單一合成之10-12 鹼基對引子進行PCR 增幅，反應產物再經膠體電泳分離、染劑染色、再觀察結果。此分析過程所需之DNA 量少、敏感度高、快速、簡單且便宜亦具多型性^(7,8)，且在同一次分析中所能偵得的基因座較RFLP多，然而對試驗反應條件相當敏感，再現性低，因而不易發展成為基因標誌用於後續研究。

而增殖片段長度多型性 (AFLP) 此法係以聚合酶連鎖反應為基礎之分子標誌，分析上首先將基因組DNA 以兩種限制酶進行切割，以得到限制片段，再於限制片段左右兩端各加上雙股之轉接子(adaptor，此兩轉接子可分別與上面處理之酶切位黏接)，經由轉接子序列設計引子進行PCR 分析。AFLP 再現性高、一次分析可得到為數最多的多型性條帶，無法運用其他分子標誌辨別之低遺傳歧異度物種，亦可經AFLP 決定其祖先來源，然而方法建立不易且費用高、分析流程太長、所須之樣本DNA 量亦多。

結論

利用 PCR 技術鑑別之優點，除能免除以蛋白質受熱變性而減低或靈敏度下降之偵測問題外，經過加熱或高溫高壓處理的肉，用於動物種源鑑別時，其檢測靈敏度會比利用新鮮肉約低 5-10 倍，由於分子生物法不斷更新，得以利用核 酸之排列順序差異性來鑑別成分來源，不僅在精準度上有所突破更甚而能降低檢測時間，更由於經過加工或加熱處理後導致變性而使特異性消失如：抗原及抗體間的反應或但 PCR 法可以呈現及保存經過加工物種的 DNA，並不會受加工時所添加之添加劑的影響等優點。近年來 DNA 序列分析因 PCR 增幅技術與定序之自動化，提供快速便捷大量複製 DNA 片段的使用與應用。

以聚合酵素連鎖反應為基礎 (PCR-based) 之分子標誌，分析過程快速簡單，每次分析所可偵得之基因座較多，且為共顯性、專一性高之高度多型性 DNA 標誌，能分析種系間及種系內差異，但須注意的問題則為確定有足夠之 DNA 濃度、避免檢體間相互污染及避免因擴增條件設計不良而有偽陰性情況發生等。

使用傳統型 PCR 擴增技術，雖可檢測出是否有其他肉種源之攙雜，但對於所摻入比例、濃度仍不甚準確，如要能精確的分辨出業者為有意或不慎添加，則須定量方法之配合，如即時 (real-time PCR) PCR 及競爭型 (competitive PCR) PCR，皆可做更準確之檢測⁽⁶⁾，此外，利用複合型的即時定量 PCR 技術具有單次檢驗多種物種及省時之優點，也是另外可研究發展的重點。

近日來，相關報導指出不肖業者以經過一氧化氮處理後顏色變鮮紅的豬肉以混充牛肉賣出，但口感上豬肉與牛肉之咬勁及口感仍有所差異，若有攙假之情事，應是絞碎後與其它種肉類混雜者為多，再者，以補抓稀有保育類作成肉製品時有耳聞，如何建立肉品種源及檢測法以維護消費者權益及安全及落實動物保育法為重要之課題。

參考文獻

- (1). Barai, B. K., Nayak, R. R., Singhal, R. S. and Kulkarni, P. R. 1992. Approaches to the detection of meat adulteration. *Trends in Food Science and Technology*. 31:69-72.
- (2). Recio, I., Ramos, M. and Lopez-Fandino, R. 2001. Capillary electrophoresis for the analysis of food proteins of animals origin. *Electrophoresis* 22: 1489-1502.
- (3). Bean, S. R. and Lookhart, G. L. 2001. High-performance capillary electrophoresis of meat, dairy, and cereal proteins. *Electrophoresis*. 22: 4207-4215.
- (4). 孫玉苓、林志生。2002。食品與飼料組成份中動物種源的核酸鑑別技術。食品工業 34(12): 37-46。
- (5). Berger, R. G., Mageau, R. P., Schwab, B. and Johnson, R. W. 1988. Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(2): 406-409.
- (6). Rodríguez, M. A., García, T., González, L., Asensio, L., Mayoral, B., López-Calleja, I., Hernández, P. E. and Martín, R. 2003. Identification of goose, mule, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1524-1529.
- (7). Martinez, I. and Yman, I. M. 1998. Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Research International* 31(6-7): 459-466.
- (8). Rao, K. B. C. A., Rao, V. K., Kowale, B. N. and Totey, S. M. 1996. Sex-specific identification of raw meat from cattle, buffalo, sheep, and goat. *Meat Science* 39: 123-126.