

## 腸道添加促進鯖魚魚肉均質液中蛋白質水解的效應

保愛貞<sup>1</sup> 龔鳴盛<sup>2</sup>

1. 國立宜蘭技術學院食品科學系助教
2. 國立海洋大學食品科學系教授

### 摘要

研究目的在探討鯖魚魚肉均質液及其添加腸道的最適 pH、溫度和時間之自家消化條件。結果發現鯖魚魚肉均質液自家消化酵素在 25°C 下和高溫 50~67°C 的表現明顯不同，25°C 時在 pH 4.0、6.5、8.0 及 9.5 會出現多重的活性峰。在 50~67°C 之間皆於 pH 9.5 呈現單一較大活性峰。其中以 55°C、pH9.5 及反應時間 8 小時水解者為鯖魚魚肉均質液自家消化最適條件；而以 25°C 水解者效率極低。進一步將鯖魚魚肉均質液添加腸道進行自家消化最適化研究，發現 62°C、pH 9.0 及反應時間 7 小時，可獲得最高的自家消化效率，反映腸道蛋白與魚肉蛋白的生化特徵應屬不同。而添加腸道的魚肉均質液蛋白質水解率是未添加者的 3.5 倍，顯示腸道酵素具有極佳的魚肉蛋白質水解效率。而添加腸道之鯖魚魚肉均質液在最適條件下作用，VBN 值低於 15mg%，尚未達一般水產品腐敗的標準。

關鍵詞：鯖魚、自家消化、均質液、腸道添加

## Effect of Intestine-Added Muscle Homogenates of Mackerel on Autolysis

Ai-Chen Pao<sup>1</sup> and Ming-Sheng Kong<sup>2</sup>

1. Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology, Teaching  
assistant

2. Department of Food Science, National Taiwan Ocean University, Professor

### Abstract

The purpose of this study was to find the optimal autolysis conditions on pH, temperature and reaction time of mackerel muscle homogenized with or without intestines. The results showed that autolysis proteases had significantly different activities between 25°C and 50-67°C for the homogenate without intestines. When the homogenate was incubated at 25°C with pH= 4.0, 6.5, 8.0 and 9.5, the multiple peaks were observed. However, the dominated peak was found during the homogenate incubating at 50-67°C with pH=9.5. The optimal autolysis condition was 55°C, pH=9.5 and 8 hours. The hydrolysis rate was extremely low when incubation took place at 25°C. For the homogenate with intestines, the optimal autolysis condition was 62°C, pH=9.0 and 7 hours. This showed that the different biochemical characteristics between intestinal and the mackerel proteases. The hydrolysis rate was increased by 3.5 times with addition of intestines. The VBN was below 15mg% under the optimal condition, and it hasn't reached the deterioration value of the marine products.

Key words: mackerel, autolysis, homogenate, intestine-added

## 一、前言

蛋白質水解產物自 1940 年代以來已被應用於個人營養調配，以解決病患因無法消化完整蛋白質而引起的營養不良和過敏的問題[1]。隨著對蛋白質水解物機能性的測定與了解，使得蛋白質水解物可以廣泛的應用在食品中，利用水解產物具較多量的低分子胜 而可改善食品質地，增加食品適口性；高溶解度可強化飲品的營養價值[2]；低過敏性可發展特殊嬰兒食品配方[3]；抑制血管升壓素轉換 (ACE)[4]及抗氧化性可提供具生理機能之食品[5]。

蛋白質水解的方式，主要分為化學水解與酵素水解，所謂化學水解，即是採用酸或鹼進行水解，此種水解方式雖然會產生較高量的游離胺基酸，但因作用劇烈而使得一部份營養份流失[6]，且以鹽酸水解蛋白質易產生微量 monochloropropanol (MCP) 及 dichloropropanol (DCP) 之致癌物[7]，在中和時亦會產生大量的鹽分，故化學水解已逐漸被酵素水解取代。

鯖魚為本省近海和沿岸迴游魚類中最具代表性的大宗季節性漁獲之一。鯖魚魚種以花腹鯖和白腹鯖為主，宜蘭地區沿岸大型圍網所捕獲者，大多屬花腹鯖，花腹鯖俗稱花飛或青海，其生態習性喜暖海域（約 22 左右），其盛產季節為 2-4 及 7-9 月[8]，肉質較為粗糙，然由於鯖魚屬血合肉，自家消化和腐敗產生的非常快速，因此多在漁獲後製成罐頭或鹽藏消費。其冷凍魚肉迅速喪失凝膠能力，不適生產魚漿和煉製品[9]。因此，只有少部分供製低級之廉價漁產。在水產加工中常被用來生產高鹽的魚醬油（魚露），利用高鹽來抑制腐敗，又可得具甘甜味之調味品。

因此，本論文主要目的是探討鯖魚魚肉自家消化中，藉測定魚肉水解後產生的三氯醋酸（TCA）可溶性胜 量之變化，獲知蛋白質水解酵素 pH 值及溫度之最適化條件；因一般加工時魚內臟大都廢棄，故進一步探討添加腸道部分進行全魚利用之自家消化的情況，找出魚肉蛋白質水解之最適條件。

## 二、材料與方法

### （一）材料

本研究所使用之鯖魚，由宜蘭蘇澳地區漁船所捕獲八月至十月之花腹鯖（chub mackerel；*Scomber australascus Cuvier*），購買地點在宜蘭市綠九市場，魚體重量在 700 ±50g，身長在 30 35cm 之間。為避免因魚的鮮度差異而造成實驗數據誤差，選用的魚體其 pH 為 6.5 以上者，且 VBN < 10 mg %，未達此一標準即丟棄不用，力求實驗之一致性。

### （二）實驗方法

## 1、pH 值測定

依 Korhonen *et al.*[10]的測定方式。取 5g 去皮鯖魚背肉，加入 45ml 的蒸餾水，以均質機均質（3500rpm）1 分鐘，再以 pH 計測定其 pH 值。

## 2、揮發性鹽基態氮（VBN）含量測定

參考山形等[11]的方法經修改後，進行下列實驗步驟：取 5g 樣品，以 7 % TCA 均質後過濾，並定容至 50ml。吸取 1ml 硼酸吸收液注入 Conway's dish 內室，其蓋緣塗上凡士林，蓋上蓋子，來回旋轉確認其密合情況，放置 15 分鐘，看吸收劑有無褪色；若退為無色，則表示 Conway's dish 不潔，取未褪色者使用之。吸取試液 1ml 注入外室，將 Conway's dish 蓋子滑動蓋上。將蓋滑動推開一小縫，吸取 1ml 飽和碳酸分解液注入外室並立即滑動玻蓋加壓蓋妥，並以制壓器（clip）壓制之，輕輕地水平搖動 Conway's dish 使分解液與試液充分混合。將 Conway's dish 放入 37 之恆溫箱中 90 分鐘。取出 Conway's dish 以水平微量滴入 N/50 HCl 於內室，至內室吸收劑之溶液出現桃紅色為止。本實驗需做空白試驗，以 1ml 7 % TCA 代替試液。

計算：

VBN ( volatile basic nitrogen ) mg %

$$= 0.02 \times 14 \times ( a - b ) \times F \times 50 / W \times 100$$

a：試液滴定量

b：空白試液滴定量

50/W：50 表示定容至 50ml，W 表示樣品重（g）

F：0.02N HCl 之力價

## 3、鯖魚魚肉蛋白質均質液之製備

主要依修飾 Noguchi[12]的蛋白質直接抽取法。取 100g 鯖魚去皮魚肉，加入 900 ml 預冷含 0.6M KCl-0.02M 磷酸鹽緩衝溶液（pH7.0），以均質機轉速 7200rpm（6 秒/次）均質 6 次，再於 4 以離心機 5000×g 離心 20 分鐘，以脫脂棉將油脂去除，上層即為可溶性蛋白質均質液。

取 99g 鯖魚去皮魚肉加入 1g 魚腸道（從鯖魚腹中取出腸道，擠出腸中雜質，經細碎處理），以上法處理而成可溶性蛋白質（含腸道酵素）均質液。

## 4、緩衝溶液之配製

pH 2.0 - 5.5 以 0.3M Na,K-C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>OHCOOH 及 0.3M HCl 配製，pH 6.0 - 8.0 以 0.3M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 及 0.3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 配製，pH 8.5 - 9.0 以 0.3M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 及 0.3M HCl 配製，pH 9.5 - 10.0 以 0.3M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 及 0.3M NaOH 配製[13]。

## 5、鯖魚魚肉自家消化及添加腸道 TCA 可溶性勝 量

參考 Pigott 之方法[14]，取 2g 可溶性蛋白質溶液加入 1ml pH 緩衝溶液，在 25、50、55、62 及 67 下水浴震盪水解，隨一定作用時間取出冰浴，加入 2ml 20 % TCA 終止反應，取濾液測其  $A_{280}$  之吸光值。添加腸道者則在 50、55、62 及 67 下水浴震盪水解。

## 6、水解率的測定

2g 可溶性蛋白質均質液加入 1ml 濃鹽酸[15]，在 60 下水浴震盪，使其完全水解（即加 20 % TCA 時無沈澱發生），再測其  $A_{280}$  之吸光值。

$$\text{水解率} (\%) = \frac{\text{自家消化濾液 } A_{280} \text{ 之吸光值}}{\text{濃鹽酸水解液 } A_{280} \text{ 之吸光值}} \times 100 \%$$

## 7、添加腸道水解過程中 VBN 之變化

取 2g 有添加鯖魚腸道之蛋白質抽取均質液，試管口以保鮮膜及橡皮圈密封，水浴震盪水解，50、55 及 67 者加 1ml pH 9.5 緩衝溶液，而 62 則加 1ml pH 9.0 緩衝溶液，隨一定作用時間取出冰浴，7 % TCA 用針筒打入試管，避免揮發性鹽基態氮流失，再同前之 VBN 測量步驟。

# 三、結果與討論

## （一）鯖魚魚肉均質液自家消化蛋白質水解的變化

### 1. pH、溫度及時間對 TCA 可溶性勝 量之影響

圖一為鯖魚魚肉經預冷 0.6 M KCl 磷酸緩衝溶液（pH 7.0）抽取之蛋白質溶液後，在 25 及 pH2.0~10.0 的變動下，及經過 3、6、9、12、15、18 及 24 小時水解，測試可代表魚肉均質液自家消化程度的 TCA 可溶性勝 量變化，即  $A_{280}$  吸光值的變化，結果顯示在 25 下，自家消化酵素隨著 pH 變化呈現有多重活性峰，且值隨著水解時間增長而增加，活性峰的位置分別為 pH 4.0 6.5 8.0 及 9.5，顯示有四組酵素群在 25 具有活性，於 24 小時後其值（ $A_{280}$ ）分別為：0.130、0.369、0.300 及 0.340。將上述鯖魚魚肉之均質液，以 12N HCl 在 60 下充分作用至澄清，測其  $A_{280}$  值，定其均質液之水解率為 100 %。進一步換算出魚肉均質液蛋白質水解率約只有 3.2 %，所以反映了鯖魚在 25 之自家消化酵素活性低，可供利用性實屬不佳。

因在 25 下自家消化酵素效率不彰，故本研究進而向高溫區尋找較好的條件。以往對魚肉自家消化酵素的研究都著重於防止其發生方面，因自家消化酵素會使 A band 縮短寬度、

淨化 A band 中心區域及造成 Z-line 的移位等[16],而影響魚漿之成膠性。Yoshinaka *et al.* [17] 發現溫度可提升內生性蛋白酶活性而加速自家消化的水解速率,沙丁魚肉之自家消化水解溫度愈高,則游離胺基酸含量越多,但當超過最適溫度(50-60 °C)後,其胺基酸生成量反隨溫度之提高而下降,故本研究採用此溫度附近之 50 及 55 °C 做為測試溫度;另外恐因溫度的升高造成微生物所引起的腐敗加速,故又選用 62 及 67 °C 兩組具有抑菌效果的溫度進行測試,希望能尋找出鯖魚魚肉最佳效果又不至於發生微生物引起的腐敗作用的條件。由圖二至圖五分別顯示魚肉均質液在 50、55、62 及 67 °C 高溫下自家消化酵素的表現,結果均與 25 °C 水解下截然不同,在高溫區 (50 - 67 °C) 水解之圖譜均呈現在 pH 9.5 有較大活性峰,其中在 25 °C 水解所出現的 pH4.0 及 pH6.5 兩活性峰均較低或已消失,意味這兩組酵素群在高溫下有失活的現象;但以 25 °C 水解中,在 pH8.0 具有活性的酵素群,在高溫培養時並未失活,活性反為升高;此結果與 Dahlmann *et al.* [18]從兔肉中所分離出之鹼性蛋白酶 (multicatalytic protease) 的性質相似,而 Kinoshita *et al.* [19]則發現鯉魚肌肉中的鹼性蛋白酶其活性在高溫加熱可被引出,甚至在高溫時產生不可逆的活化,並可降解多數鹽溶性蛋白質。

進一步將四種水解溫度在最適 pH9.5 下,所測得不同時間培養下 TCA 可溶性蛋白量 ( $A_{280}$ ) 之變化進行比較,結果歸納。發現同一時間中以 55 °C 所測得吸光值最高,50 °C 者次之,再者為 62 °C,67 °C 者最低。代表鯖魚魚肉均質液在 55 °C 水解下具有最佳的自家消化能力;而溫度過高時可能因魚肉蛋白質的變性和酵素失活,造成自家消化能力反轉下降,故 67 °C 者之自家消化效果最差。而且四者均在約反應至 8 小時時吸光值的增加有轉折減緩的趨勢。

綜合以上結果,鯖魚魚肉均質液在 0.6 M KCl 磷酸緩衝溶液 (pH 7.0) 的反應環境中,最適的作用溫度為 55 °C, pH 為 9.5,時間為 8 小時。

## 2. 自家消化最適化條件下魚肉均質液蛋白質水解率之比較

將 0.6M KCl 溶出之鯖魚魚肉蛋白質溶液,以 12NHCl 在 60 °C 下充分作用至澄清,測其  $A_{280}$  值,定此為 100 % 之蛋白質水解率。將魚肉均質液分別在 50、55、62 及 67 °C 的自家消化最適化條件下反應所得之  $A_{280}$  吸光值,換算得其蛋白質水解率,結果歸納於表一之鯖魚魚肉均質液部分。結果顯示 50、55、62 及 67 °C 培養者,蛋白質水解率分別為: 11.1、12.2、7.0 及 5.0 %,此結果均遠較 25 °C 水解者之 3 % 為高,反映出較高的反應溫度,可以提升鯖魚魚肉均質液自家消化效率。

### (二) 鯖魚魚肉均質液自家消化添加魚腸道後蛋白質水解的變化

#### 1. 添加腸道對鯖魚魚肉均質液自家消化 TCA 可溶性蛋白量之影響

圖六至圖九為鯖魚魚肉添加 1 % 腸道之均質液分別在 50、55、62 及 67 °C 四種溫度下進行水解,測定隨不同 pH 及時間變動下所得 TCA 可溶性蛋白量之變化,此部分的  $A_{280}$  吸光

值較高，故測量時樣品先稀釋五倍。由圖顯示 50、62、67 腸道酵素之活性峰均在鹼性範圍呈現單一峰，50、55 及 67 者最高值出現在 pH 9.5，而 62 者則出現在 pH 9.0，反映了腸道蛋白質酵素在高溫的條件下，僅鹼性蛋白質的活性可顯著地被誘昇；相較之下酸性蛋白質則無明顯活性。進一步比較四種培養溫度在其最適的反應 pH 值下，均質液隨反應時間之  $A_{280}$  吸光值變化，結果可看出四者的  $A_{280}$  測值均隨時間延長而增加，其中前 5 個小時四者均無明顯差異，之後測值高低順序為 62 > 55 > 50 > 67，且直至 7 小時時四者測值上昇趨勢才達緩和。證實了鯖魚腸道鹼性蛋白質最適反應溫度應為 62，較魚肉自家消化酵素的 55 為高。

綜上結果，鯖魚魚肉與魚腸道以 99 : 1 比例混合，在 0.6 M KCl 磷酸緩衝溶液 (pH 7.0) 的環境下，其最適的蛋白質水解消化條件為：反應溫度 62，pH 為 9.0，作用時間為 7 小時。說明了鯖魚腸道鹼性蛋白質與魚肉鹼性蛋白質的最適反應條件不同，兩者應屬不同生化活性的蛋白質。

## 2. 最適條件下添加腸道的魚肉均質液蛋白質水解之比較

表一之添加腸道均質液部分，是將魚肉蛋白質溶液添加 1% 腸道後，分別在 50、55、62 及 67 的最適化自家消化條件下反應，所測得之  $A_{280}$  吸光值，進一步換算成其蛋白質水解率。結果顯示，在 50、55、62 及 67 四種溫度水解之蛋白質水解率分別為 33.3、37.2、42.3 及 30.8%，均遠高於以魚肉蛋白質自家消化之測值。

將自家消化 (pH 9.5、溫度 55、7 小時) 與添加腸道 (pH 9.0、溫度 62、7 小時) 最佳條件之比較，添加腸道所得產量為自家消化 3.5 倍，顯示添加腸道可明顯提昇魚肉蛋白質水解效率。

## 3. 添加腸道培養過程中 VBN 之變化

為瞭解添加腸道酵素魚肉均質液的最適化研究過程中，是否會有因伴隨著微生物滋長所引起的腐敗現象發生，使產品無法達到合格的衛生安全標準之內，故在四種溫度下進行最適化魚肉均質液水解反應過程，測試能代表產品腐壞程度的揮發性鹽基態氮 (VBN) 值，結果如圖十。發現四種溫度條件下，VBN 值均隨作用時間增長而增加，在 6 小時前，VBN 值均能在 15mg % 以下；惟至 8 小時，55 者 VBN 已超過衛生安全標準的 20 mg %，50 者亦達 18 mg %，僅 62 及 67 仍不超過 15 mg %。很顯然地，後兩者的溫度確實可有抑菌的效能，前兩者則反而會促增微生物的生長，致產品 VBN 值會迅速升高。總之，以添加腸道酵素進行魚肉均質液在最適化條件下進行水解反應，產品並無腐壞未達衛生安全標準之虞。

## 四、結論

以 25 之水解條件，鯖魚魚肉均質液自家消化酵素隨 pH 值變化呈現多重活性峰，活性

峰的位置分別為 pH 4.0、6.5、8.0 及 9.5，顯示有四組酵素群在 25 具有活性，但水解效率均不高。而在高溫 50、55、62 及 67 培養條件下，鯖魚魚肉均質液自家消化呈現較大單一活性峰，最適的作用條件溫度為 55，pH 值為 9.5，作用時間為八小時。鯖魚魚肉添加 1% 腸道之均質液，在高溫 50、55、62 及 67 培養條件下，最適作用條件溫度為 62，pH 值為 9.0，時間則為 7 小時。添加腸道之鯖魚魚肉均質液在最適條件下作用，VBN 值低於 15mg %，未達腐敗的標準。

## 五、參考文獻

1. Mahmoud, M. I., Malone, W. T. and Cordle, C. T. ( 1992 ) , “Enzymatic hydrolysis of casein : effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties”, J. Food Sci., Vol.57, pp.1223-1229.
2. 陳建廷 ( 1998 ) , 雞精製程之改良及其回收碎肉製作煉製品之探討，海洋大學水產食品科學系碩士論文。
3. Lin, S. B., Nelles, L. P., Cordle, C. T., and Tomas, R. L. ( 1997 ) , “Debittering casein hydrolysates with octadecyl-siloxane(C18) columns”, J. Food Sci., Vol.62, No.4, pp.665-670.
4. 蔡震壽、陳美貞 ( 1999 ) , 鯖魚肉蛋白質水解物作為營養食品與其生理機能特性，第18-32頁，食品科技研發成果彙編。
5. 林玫欣 ( 1999 ) , 鯖魚肉與內臟水解物之抗氧化性研究，海洋大學食品科學系碩士論文。
6. 涂瑞澤、吳孟娟、吳淑姿 ( 1999 ) , 「豬肝酵素水解物的功能特性」，食品科學，第二十六卷，第一期，第47-61頁。
7. 鄭靜桂 ( 1997 ) , 「蛋白質之水解與水解液之利用」，食品工業月刊，第二十九卷，第五期，第10-17頁。
8. 孫寶年、李國誥、翁秀貞主編 ( 1991 ) , 台灣地區常見食用魚貝類圖說，第52-53頁，行政院衛生署。
9. 朱玉灼、羅正仁、周照仁編譯 ( 1989 ) , 多獲性紅肉魚類的有效利用，第35、118頁，華香園出版社，台北。
10. 河端俊治 ( 1974 ) , 水產生物化學、食品學實驗書，第281頁，恆星社厚生閣，東京，日本。
11. Korhonen, R. W., Lanier, T. C. and Giesbrecht F. ( 1990 ) , “ An evaluation of simple method for following rigor development in fish”, J. Food Sci., Vol.55, pp.346-351.



12. Noguchi, S. ( 1974 ), The control of denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. Doctoral Dissertation of Sophia Univ., Tokyo, Japan.
13. 李秀、賴滋漢 ( 1992 ), 食品分析與檢驗, 第559-562頁, 精華出版社, 台中。
14. Martin, R.E. ( 1982 ), Enzyme modifications of fishery by-products, pp.447-452 A.V.I .Publishing.
15. 潘嘉如 ( 2000 ), 山藥水解液之製備, 中興大學食品科學系碩士論文。
16. Zeece, M.G., Katoh, K., Robson, R.M. and Parrish, F. C. Jr.( 1986 ), “ Effect of cathepsin D on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature”, J. Food Sci., Vol.51, pp.769-780.
17. Yoshinaka, R., Sato, M., Tsuchiya, N. and Ikeda, S. ( 1983 ), “Production of fish sauce by utilization of its viscera enzyme”, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., Vol.49, No.2, pp.463-469.
18. Dahlmann, B., Kuehn, L., Rutschmann, M. and Reinhauer, H. ( 1985 ), “Activation of the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle by fatty acids or sodium dodecylsulfate”, Biochem. J., Vol.228, pp.171-177.
19. Kinoshita, M., Toyohara, H. and Shimizu, Y. ( 1990 ), “Diverse distribution of four distinct types of modori ( gel degradation )-inducing proteinases among fish species”, Nippon Suisan Gakkaishi., Vol.56, pp.1485-1492.