

利用微生物酵素液化血合肉試驗

王文亮·駱秋燕

Solubilization of Fish Red Muscle with Microbial Enzymes

Wen-Liang Wang and Chiu-Yen Lo

Two strains of Gram negative bacteria screening from 396 sea-water bacterial strains, named Marine-I and Marine-II, having better ability to digest proteins, producing neither ammonia, indole, trimethylamine, nor nitrite and having no decarboxylating enzymes of lysine, ornithine and histidine, were used for compared with one strain of *Aspergillus* sp. isolates from dried skipjack stick (KATSUOBUSHI), one bacterial enzyme named prease and one vegetable enzyme—bromelain, in the test of liquefing the red muscle of bonito.

The optimum temperature for Marine-I and Marine-II were both 35°C, and the optimum pH were 6.5 and 7.0 respectively, both decreasing stabilities slowly over 45°C while sharp decreased over 50°C, and stable in pH 6.5 ~ 7.0 respectively. In order to prevent the action of pathogens and putrefactive bacteria, considering together with the temperature stability, 50°C was used as digest temperature, when the use of raw red muscle as substrate.

By using Marine-I, the liquefaction percentage of nitrogen after 8-hour hydrolysis was 86.2%, and 986.8 mg% of α -amino nitrogen was obtained from hydrolysate. Due to high contents of amino acids, especially tryptophane in the hydrolysate, it was supposed having better nutrition balance, light color and no bitter taste was occurred, all of these were the advantages for the developing low salt seasoning product. By using Marine-II, although the yield of α -amino acids and the composition was lower and less than Marine-I, but within short time digested it will be microparticlized, which can be microencapsulated as fish fry feeding material or as peptone for the bacterial medium used.

The hydrolysate obtained from bromelain was bitter and deep in color, oil-burn flavor and unbalanced of amino acids composition, though having both high nitrogen solubilization ratio and α -amino acid yield. Moreover, all of the hydrolysates contain low 5'-IMP, and the safety or wholesomeness of hydrolysate need further improvement or confirm.

前 言

鮪、鰹是本省製造罐頭外銷的主要原料，除了內臟、魚頭、皮、骨等廢棄物外，佔 15 ~ 20 % 的血合肉部分，因其色澤深且腥味較重，除製造魚粉或直接供飼料用外，目前多供製造寵物罐頭之用，但其市場有限，應開發其他用途發揮其應用價值。

鮮度良好的血合肉，含豐富的及易消化的良質蛋白質，倘能製成調味料或健康食品，當能提昇其利用價值。使用內臟或蛋白分解酵素，將魚肉蛋白液化，早已有許多報告^{(1)~(6)}發表。高橋 喬等⁽⁷⁾抽取鯉幽門垂的蛋白分解酵素，液化鯉血合肉，水解時會釋出大量的氫為最大缺點；井關等⁽⁸⁾使用放線菌酵素（1種）、細菌酵素（2種）、黴菌酵素（2種）及植物酵素（2種）；黃等⁽¹¹⁾以植物酵素（bromelain及papain）、動物內臟酵素（pepsin）及麴黴酵素（商品名Molsin）水解魚肉發現都有不同程度的苦味；鈴木⁽⁹⁾引用日本1976年農林水產技術會議成果報告，雖然多數微生物性蛋白分解酵素水解魚肉產生苦味，但黑麴黴則不會產生苦味，且分解率也高。高橋等⁽⁷⁾指出一種麴菌（*Aspergillus sp.*）的蛋白分解酵素（商品名為Denapsin），具有良好的水解效果，且顏色亦淺。陳⁽¹²⁾指出苦味可由添加少量食鹽（3%）消除；北林等⁽¹⁰⁾則以低溫濃縮及添加糖類來降低苦味；黃等⁽¹¹⁾認為用胍肽水解酵素二度水解，可節省時間及增加收量。

由以上可知微生物性蛋白水解酵素，應用在魚肉液化上可行性很高，很值得吾人去開發。除了調味料之外，傳統發酵法多添加大量食鹽來防腐，用途受到限制，吾人期望朝低塩分或無塩健康食品走向邁進；另外，Sen等⁽¹³⁾利用pH及水解溫度的控制，製造細菌培養基用蛋白胍，高橋⁽⁷⁾用*Bac. thermo- proteolyticus* 蛋白分解酵素，將魚貝肉在30~60分鐘內予以微粒子化，可供養殖魚介苗之餌料，均為吾人開發的方向。

本試驗乃以筆者⁽²⁾分離海水中之細菌二株，及從鯉節上分離出之麴菌一株，與市售蛋白分解酵素二種進行比較對血合肉之液化效果。

材料與方法

一、血合肉：市售新鮮鯉魚及取自罐頭工廠之煮熟鯉血合肉。

二、海水細菌之分離、篩選⁽²⁾：

自龜山島附近採取海水，以0.22 μm 孔隙濾膜過濾後放在marine 2216 agar (DIFCO)平面培養基上，於20°C培養10天後，挑出菌落劃線於marine 2216 agar上，連續劃線2次以確保其純度。然後測定下列項目篩選具有蛋白分解能力，且不會產生氨、三甲胺、吲哚、亞硝酸、組織胺等有毒物質之菌株。

(一)明膠分解酵素 (gelatinase)：依王⁽²⁾的說明實施。

(二)酪蛋白水解 (casein hydrolysis)：依Kaneko⁽²³⁾的方法實施。

(三)吲哚產生 (indole production)：參考蔡⁽²²⁾的說明實施。

(四)氨產生 (ammonia production)：依王⁽²⁾的說明實施。

(五)氧化三甲胺還原酵素 (TMAO reductase)：依Laycock等⁽²⁴⁾定性法實施。

(六)硝酸鹽還原酵素 (nitrate reductase)：依王⁽²⁾的說明實施。

(六)離胺酸脫羧基酵素 (lysine decarboxylase)：參考蔡⁽²²⁾的說明實施。

(六)鳥胺酸脫羧基酵素 (ornithine decarboxylase)：參考蔡⁽²²⁾的說明實施。

(七)組胺酸脫羧基酵素 (histidine decarboxylase)：依王⁽²⁾的說明實施。

三、海水細菌之大量培養及收穫：

將海水細菌接種於500 ml marine 2216 培養液中，在室溫下振盪培養2天後，以12,000 rpm \times 15' 遠心分離，以冰冷生理食鹽水洗滌後，如上遠心分離，洗滌3次後置於-40°C冷凍櫃中備用。

四、鯉節黴之分離、大量培養：

白鯉節上刮下黴菌，塗抹於含80 ppm氯黴素之potato dextrose agar (DIFCO)，分離培養3次後，在顯微鏡下觀察其形態，確認純粹分離及菌種後，接種於Henneberg氏液A⁽²⁵⁾中，在室溫下振盪培養4天，如海水細菌的方法收取菌體。

五菌體細胞壁破壞方法：

以 Dynatech 公司出品之 sonic dismembrator model 150 超音波振盪，每 1 g 之海水細菌振盪 20 次，而麴霉則振盪 40 次，每次 20 秒，每振盪一次停止 20 秒。振盪管浸在冰冷水中以防酵素受熱變性。

六市售酵素：中國新藥出品力價為 10,000 PUC*¹ 之 Prease (由 *Bacillus subtilis* var. T.M. 所得) 及波羅美酵素 (bromelain, MERCK)*²，使用濃度為 0.3 %。

七蛋白質水解指標測定：

(一) 液化率：依高橋等⁽⁸⁾方法計算。即酵素水解前試料全氮量為 a %，TCA 可溶性氮量為 b %；酵素水解後全氮量為 c % 及 TCA 可溶性氮量為 d %，以 micro-Kjeldahl 法則定。

$$\text{消化率} \% = \frac{d/c - b/a}{1 - b/a} \times 100$$

(二) 胺基氮 (α -amino N)：Formol titration 法

取水解液 10 ml 加 10 % TCA 10 ml，加熱至沸騰，冷卻至室溫後以 Toyo No. 5C 濾紙過濾，洗滌 2 次後，以 0.1 N NaOH 調 pH 至 9.0，加 10 ml pH 9.0 之甲醛液及敏滴酚酞指示劑，繼之以 0.2 N NaOH 滴定至 pH 9.0 為止

$$(\text{meq. NaOH}) \times 14 \text{ mgN/meq} \times \frac{1}{10} = \text{mg } \alpha\text{-amino N per ml.}$$

(三) 胜肽氮 (peptide N)：

取 1 ml 血合肉水解液，置於安瓶 (ampoule) 中，加 1 ml 濃 HCl 後減壓封口，以 110°C 加熱 24 小時後，調整 pH 為 7 後定容成 50 ml，以 Formol 法測定胺基氮量。本文中胜肽氮定義如下：

胜肽氮 = 加 HCl 分解後之胺基氮量 - 分解前之胺基氮量。

八酵素活性測定方法：

取 0.5 g 菌體加 5 ml 冰冷磷酸鹽緩衝液 (0.05 M, pH 8.0)，如五超音波振盪、離心，倒出澄清液，以 2 ml 冰冷磷酸鹽緩衝液洗滌 2 次，加緩衝液至 10 ml，再加 1 % 酪蛋白溶液 4 ml，在實驗溫度下水解 4 小時後，加 5 ml 10 % TCA，靜置 10 分鐘後以 Toyo No. 5C 濾紙過濾，水洗後，以 Formol 法測胺基氮量。

九最適 pH 之測定方法：

在不同 pH 值磷酸鹽緩衝液下，依上述活性測定方法在 45°C 下測定各酵素之活性。最適 pH 值之活性為 100 %，其餘 pH 值之活性均取其相對值。

十 pH 值安定性：各酵素在不同 pH 值磷酸鹽緩衝液下，在 45°C 浸漬 8 小時後於 45°C、pH 8.0 測酵素活性，對應其本身未浸漬前之活性為 100 %，其他 pH 值之活性均相對於安定性最高之活性。

十一最適反應溫度之測定方法：

改變不同的溫度，依上述活性測定方法在 pH 8.0 之緩衝液中測定，以最適反應溫度之活性為 100 %，其餘溫度之活性，均取其相對值。

十二溫度安定性：在 pH 8.0 磷酸鹽緩衝液下分別置於 35°C、40°C、45°C、50°C、55°C 及 60°C 振盪恒溫水槽中分別加熱 8 小時後，依上述測殘餘活性。

十三以合成基質試驗供試微生物性酵素之水解能力：為測試酵素對於各種結合形態蛋白質的水解能力，使用模擬的胺基酸合成基質如下：

*¹ 在 pH 7.0 之 2 % 酪蛋白磷酸鹽緩衝液中，於 37°C 10 分鐘產生 0.5 mcg 酪胺酸量訂為 1 PUC.

*² 2 m Anson units/mg.

BAEE : Na -Benzoyl -L-Arginine Ethyl Ester.

TAME : p -Tosyl -L-Arginine Methyl Ester.

ATEE : N-Acetyl -L-Tyrosine Ethyl Ester.

BTEE : N-Benzoyl -L-Tyrosine Ethyl Ester.

改變基質依酵素活性測定法測定水解能力。基質濃度為 0.02 M。

畜血合肉水解液顏色之測定：

(一)色差測定：以 Tokyo denshoku Co. LTD., Model TC-1500 MC 色差儀測定 L, a, b 值。

(二)可視光域吸收光譜，以 Hitachi Model 320 分光光度計實施，在縱軸與橫軸間面積越大者色澤越濃。

去胺基酸測定：

依 Kevin 等⁽⁷⁾的條件，使用 Varian 5020 型 HPLC 實施。

去核昔酸測定：

依王⁽⁸⁾的條件，使用 Varian 5020 型 HPLC 實施。

去血合肉液化方法：

取血合肉 100 g 加水 100 ml，均質後市售酵素加 0.3 g，菌體則海水細菌 1 g，麴菌 40 g，旋搖均勻以 50°C 振盪培養 8 小時，以 12,000 rpm 遠心分離 10 分鐘，水洗 3 次，水解液煮沸後過濾 (Toyo No. 5C)，再通過 0.45 μm 及 0.22 μm 濾膜，定容為 250 ml，此稱水解稀釋液。同時對殘渣也予以秤重。

去組織胺 (histamine)：依河端⁽⁹⁾的方法測定。

結果與討論

一、菌株之篩選：

由 396 個菌落選取 45 株對明膠及酪蛋白具有良好分解能力者，進行多次篩選，得不具離胺酸、鳥胺酸及組胺酸等脫氨基酵素，以及不產生氨、吲哚、三甲胺、亞硝酸等有毒物質之革蘭氏陰性菌株二株，命名為 Marine-I 及 Marine-II，另由經節上分離出的黴菌，經同樣的篩選，經鑑定為 *Aspergillus* sp.。

二、溫度、pH 對供試菌株及蛋白分解酵素活性之影響：

以酪蛋白為基質，在 pH 8.0 磷酸鹽緩衝液中，各種試驗溫度下，供試酵素之相對活性變化如圖 1 所示，Marine-I，II 二組最高活性在 35°C，*Aspergillus* sp. 組為 45°C，Prease 組則為 50°C。供試酵素浸漬在 pH 8.0 磷酸鹽緩衝液中，於各試驗溫度下放置 8 小時以後，以酪蛋白為基質，測定其溫度安定性，結果如圖 2 所示，超過 45°C 時所有供試酵素之安定性均下降，50°C 以上下降的斜率迅即變大，其溫度安定性之順序為 Marine-II > Prease > Marine-I > *Aspergillus* sp.。

改變磷酸鹽緩衝液之 pH 值，於 45°C 下測定各供試酵素之活性，結果如圖 3 所示，Marine-I、Marine-II 及 Prease 組最高活性時之 pH 分別為 6.5，7.0 及 7.0，*Aspergillus* sp. 組則在 pH 5 時活性最高，隨 pH 上昇活性逐漸減弱。將供試酵素浸漬在 45°C 之不同 pH 磷酸鹽緩衝液中經 8 小時後，測定其 pH 安定性，結果如圖 4 所示，除 *Aspergillus* sp. 組外，各供試酵素均在 pH 6.5 ~ 7.0 呈最安定，pH 7 以上 Marine I、II 二組均逐漸不安定化，圖 4 顯示它們在中性至鹼性側較酸性側安定；Prease 組之酸性、鹼性兩側同樣不安定；*Aspergillus* sp. 組則鹼性側較酸性側安定。

綜合以上結果，知供試酵素之最佳作用 pH 在 6.5 ~ 7.0 間，而血合肉本身之 pH 在 6.2 ~ 6.5 間，可以不必調整 pH，此點甚為有利；但最佳作用溫度均在 45°C 以下 Marine I、II 甚至在 35°C 以下，雖可節省能源，但如以生血合肉為基質，經 8 小時之液化，往往會有腐敗臭產生，又病原菌易在 45°C 繁殖，安全性實在大有問題，為了避開腐敗菌與病原菌的作用，兼顧酵素的安定性以縮

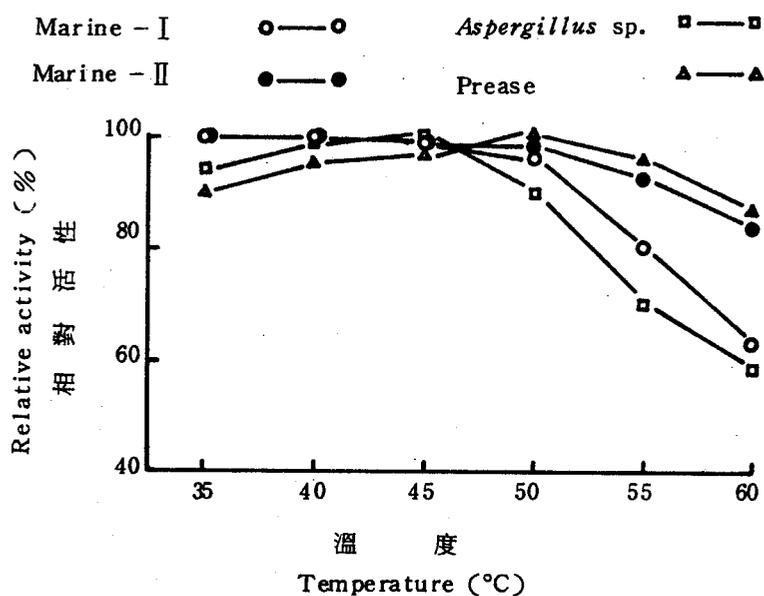


圖1 供試微生物性酵素在不同溫度之相對活性，在pH 8.0磷酸鹽緩衝溶液中以酪蛋白為基質
 Fig.1 Temperature behavior for some microbial enzymes. The enzymes were assayed at pH 8.0 phosphate buffer with casein as substrate.

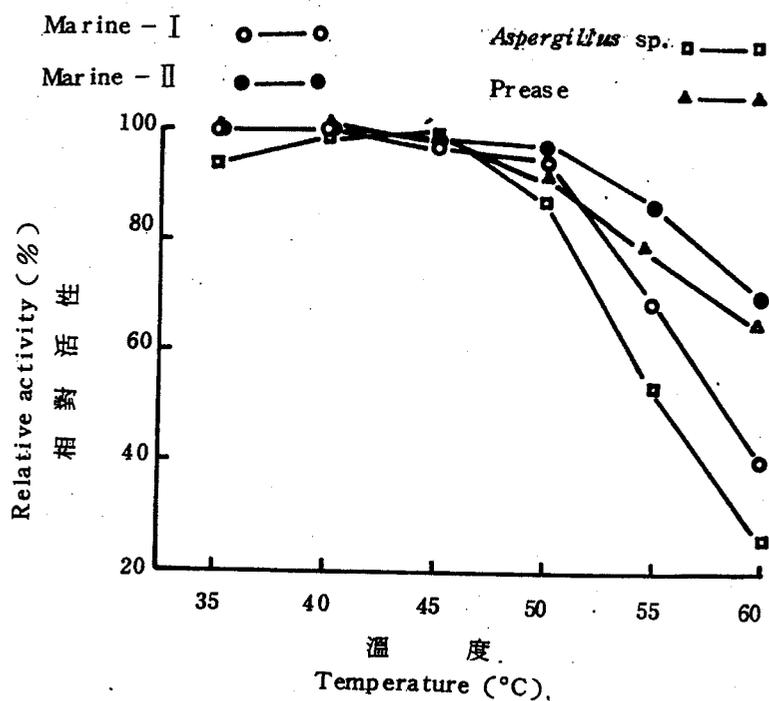


圖2 供試微生物性酵素之溫度安定性，在pH 8.0磷酸鹽緩衝溶液中以酪蛋白為基質
 Fig.2 Temperature stability of some microbial enzymes, in pH 8.0 phosphate buffer for 8 hours with casein as substrate.

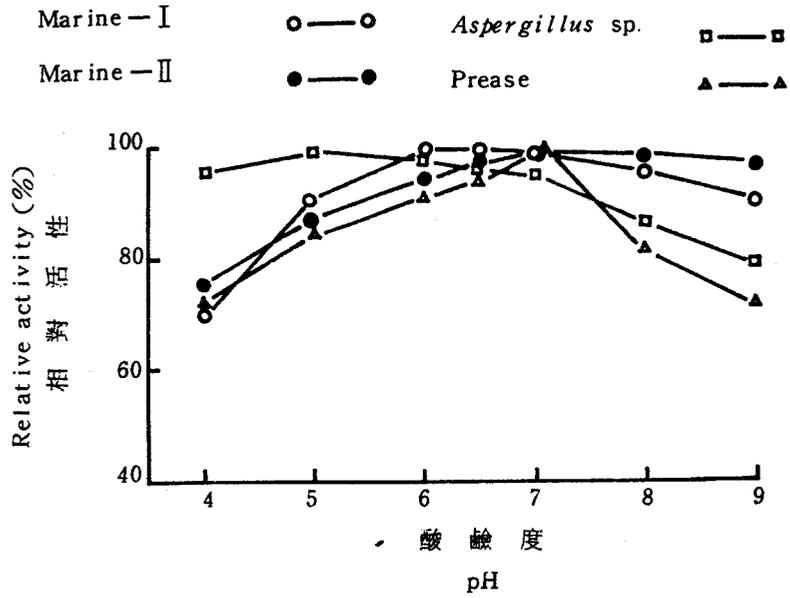


圖 3 供試微生物性酵素在不同 pH 之相對活性，於 45°C 在磷酸鹽緩衝液中以酪蛋白為基質
 Fig.3 pH behavior for some microbial enzymes at 45°C in phosphate buffer with casein as substrate.

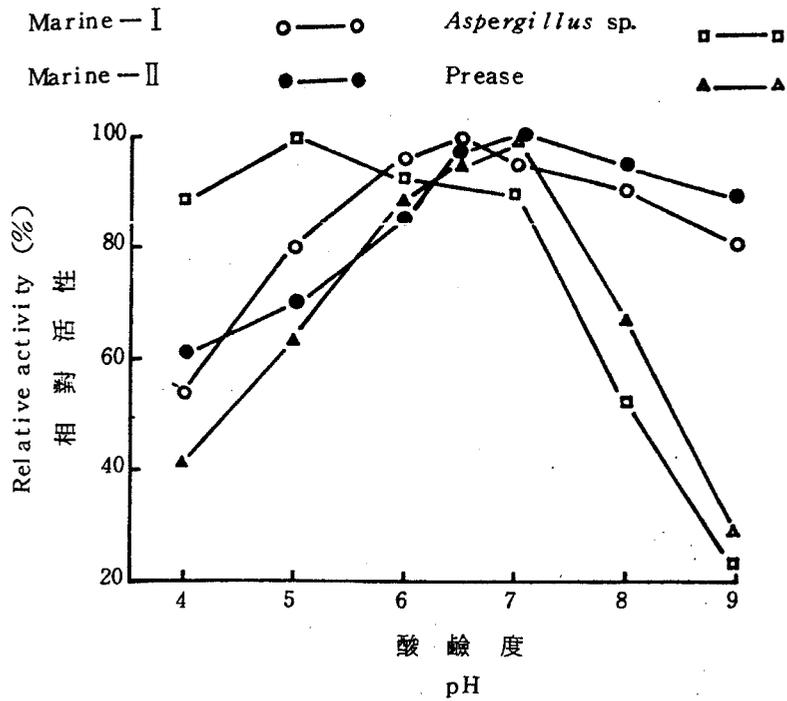


圖 4 供試微生物性酵素之 pH 安定性，於 45°C 在磷酸鹽緩衝液中以酪蛋白為基質
 Fig.4 pH stability of some microbial enzymes at 45°C in phosphate buffer for 8 hours with casein as substrate.

短液化時間，以下的液化試驗溫度一律採用 50°C。

三、供試酵素液化效果比較：

供試酵素對各種結合形態蛋白質的水解能力，以合成基質測定結果如表 1 所示，Marine-I 組對 BAEE 水解能力較強，但對 TAME、ATEE、BTEE 則具中等水解能力；Marine-II 組對 TAME、BTEE 具中等水解能力，但對 BAEE、ATEE 則水解能力較弱。*Aspergillus sp.* 組不但對 BAEE 及 ATEE 水解能力弱，而且對 TAME、BTEE 幾無水解能力；Prease 組也僅對 TAME 具中等水解能力。由上可預知供試酵素中以 Marine-I 組對蛋白質有較佳的水解能力。

以生解經血合肉為基質，液化 8 小時之氮液化率（表 2）依序為 Marine-I (86.2%) > Marine-II (80.6%) \cong Bromelain (80.2%) > Prease (61.2%) > *Aspergillus sp.* (45.1%)，Marine-I、II 二組比一般認為極為優良的蛋白分解酵素—Bromelain 及 Prease 組有過之而無不及，經 20 小時液化 Marine-I 組液化率更高達 92.3%，*Aspergillus sp.* 組之液化率仍然最差，僅為 43.1% 而已，推測可能係其細胞壁以超音波不易打碎所致。

以煮熟的經血合肉為基質時，液化 8 小時之氮液化率（表 3）依序為 Marine-I (74.3%) > Bromelain (70.2%) > Marine-II (67.7%) > Prease (51.1%) > *Aspergillus sp.* (40.5%)，但經 20 小時液化後，氮液化率最高的 Marine-I 也不過是 75% 而已，推測可能係血合肉中原有的蛋白分解酵素受熱變性，以及血合肉蛋白質煮熟凝固後，酵素較不易作用致液化率降低，尤其是 Marine-I、II 二組降低達 10~18% 之多。

分析水解液中 α -胺基氮與胍基氮之比率，結果如表 4 所示，其大小依序為 Marine-I (1.28) > Bromelain (1.04) > Marine-II (0.96) > Prease (0.81) > *Aspergillus sp.* (0.78)，顯示所分離的海洋菌株 α -胺基氮的產率相當不錯。

四、苦味問題：

苦味程度在本試驗中與 α -胺基氮/胍基氮比及 α -胺基氮量並無相關性（表 4），Marine-I 組之 α -胺基氮最高達 986.8 mg % 不產生苦味，*Aspergillus sp.* 組最低為 408.2 mg %，也沒有苦味，反而 α -胺基氮量中等的 Prease (528.5 mg %) 及 Bromelain 組 (750.8 mg %) 苦味

表 1 供試微生物酵素對各種合成基質的水解力比較

Table 1 Comparison hydrolytic activity of some microbial enzymes on synthetic substrates.

基質 Substrate	酵素源 Enzyme or enzyme source			
	Marine-I	Marine-II	Prease	<i>Aspergillus sp.</i>
BAEE	+++	+	+	+
TAME	++	++	++	-
ATEE	++	+	+	+
BTEE	++	++	+	-

+++	活性很強，> 80 % 水解	strong activity, > 80 % hydrolysis.
++	活性中等，> 50 % 水解	medium activity, > 50 % hydrolysis.
+	活性微弱，> 20 % 水解	weak activity, > 20 % hydrolysis.
-	活性非常弱，< 20 % 水解	very weak activity, < 20 % hydrolysis.

表 2 生鯉血合肉以四種微生物性蛋白分解酵素及波羅美酵素水解之液化率
 Table 2 Nitrogen solubilized ratio of raw skipjack red muscle with four microbial proteolytic enzymes and bromelain.

酵素源* ¹ Enzyme or enzyme source	水解條件 Condition of hydrolysis			氮液化率** (%) Ratio of nitrogen solubilized (%)
	酸鹼度 pH	溫度(攝氏) Temperature (°C)	時間(小時) Time (hr.)	
Marine-I	6.5	50	8	86.2
			20	92.3
Marine-II	7.0	50	8	80.6
			20	84.9
<i>Aspergillus</i> sp.	5.0	50	8	45.1
			20	46.3
Prease	7.0	50	8	61.2
			20	63.7
Bromelain	5.0	50	8	80.2
			20	87.4

*¹ 濕菌體對血合肉海水細菌用 1%，麴菌為 40%，酵素粉末則為 0.3%

Ratio of enzymes applied to solubilization of moist marine bacteria, moist *Aspergillus* sp. and powder enzymes were 1%, 40% and 0.3% weight of red muscle respectively.

** 液化氮對血合肉蛋白氮之比

Ratio of the nitrogen solubilized to the protein nitrogen of red muscle.

程度則較重。北林等⁽⁹⁾認為苦味產生之母體主要為苯丙胺酸(phenylalanine)及未知胜肽，陳等⁽¹²⁾認為水解液中含多量胜肽亦為苦味來源，這些會產生苦味的未知胜肽北林等⁽⁹⁾認為可利用魷魚之肝、胰臟萃取物之添加而消除，而苯丙胺酸與醣類因化學結合所產生的苦味則需在水解或濃縮時，保持在 60°C 以下才能避免。

五 血合肉微粒子化：

液化後之水解液過濾時，殘留在 Toyo No. 5C 濾紙，0.45 及 0.22 μm 濾膜上殘渣的百分率如表 5 所示，Marine-I, II 二組有相當部份的比率殘留在 0.45 及 0.22 μm 濾膜上，顯示若將液化時間予以縮短，則此等微粒子可能會增多，乃進行表 6 之實驗，發現經 150 分鐘之液化約有 47 ~ 50% 殘留在 0.45 及 0.22 μm 濾膜上，產率相當高，若再予以研究改進當可利用來生產蛋白胨供製培養基之用。

六 水解液胺基酸分析：

生血合肉經 8 小時液化後，其胺基酸之組成如圖 5 所示，Marine-I 組之胺基酸種類及相對

表3 熟鯷血合肉以四種微生物蛋白分解酵素及波羅美酵素水解之液化率
 Table 3 Nitrogen solubilized ratio of cooked skipjack red muscle with four microbial proteolytic enzymes and bromelain.

酵素源* ¹ Enzyme or enzyme source	水解條件 Condition of hydrolysis			氮液化率* ² (%) Ratio of nitrogen solubilized (%)
	酸鹼度 pH	溫度(攝氏) Temperature (°C)	時間(小時) Time (hr.)	
Marine—I	6.5	50	8	74.3
			20	75.0
Marine—II	7.0	50	3	67.7
			20	68.9
<i>Aspergillus</i> sp.	5.0	50	8	40.5
			20	43.1
Prease	7.0	50	8	51.1
			20	54.4
Bromelain	5.0	50	8	70.2
			20	73.6

*¹ 濕菌體對血合肉量海水細菌用1%，麴菌為40%，酵素粉末則為0.3%

Ratio of enzymes applied to solubilization of moist marine bacteria, moist *Aspergillus* sp. and powder enzymes were 1%, 40% and 0.3% weight of red muscle respectively.

*² 液化氮對血合肉蛋白氮之比

Ratio of the nitrogen solubilized to the protein nitrogen of red muscle.

量均較其他供試酵素多，東秀雄⁽⁴⁾以色胺酸(tryptophan)含量作為營養價值之判定指標，Marine—I，II二組的血合肉水解液中色胺酸比其他供試酵素顯然要高，胺基酸的均衡殆無疑義。*Aspergillus* sp. 組缺乏纈胺酸(valine)、酪胺酸(tyrosine)、胱胺酸(cystine)、脯胺酸(proline)等胺基酸，精胺酸(arginine)及麩胺酸(glutamic acid)量也很低；Prease及Bromelain二組則缺乏胱胺酸及脯胺酸。

七 水解液核苷酸分析：

生血合肉經8小時液化後，其核苷酸之組成如圖6所示，顯然呈味主要成分之5'-IMP各供試酵素均不理想，若在液化前將生血合肉均質液微溫(50°C)萃取，待液化後加回水解液中，可以提高IMP的含量(圖6，Marine—I組虛線部分)，其原因可能係IMP在水解過程被其水解酵素水解所致。

八 色澤分析：

一般血合肉或全魚之水解液，顏色往往過度偏紅褐色，故往往需再經脫色手續，所以色澤也是

表 4 生血合肉水解液^{*1}之 α -胺基氮與胜肽氮比及苦味程度
 Table 4 Ratio of α -amino nitrogen to peptide nitrogen and bitterness in raw red muscle hydrolysates

水 解 液	酸 鹼 度	$\frac{\alpha\text{-胺基氮}}{\text{胜肽氮}}$	α -胺基氮 (mg %)	苦味程度 ^{**}
Hydrolysate	pH	$\frac{\alpha\text{-amino N}}{\text{peptide N}}$	$\alpha\text{-amino N (mg \%)}$	Bitterness
Marine - I	6.5	1.28	986.8	-
Marine - II	7.0	0.96	639.4	+
<i>Aspergillus</i> sp.	5.0	0.78	408.2	-
Prease	7.0	0.81	528.5	++
Bromelain	5.0	1.04	750.8	++

*1 在 50°C 水解 8 小時

Hydrolysis at 50°C × 8 hr.

** ++ 苦味 with bitterness

+ 稍有苦味 slightly bitterness

- 無苦味 none bitterness

表 5 液化^{*1}後各過濾階段殘渣百分率^{**}
 Table 5 Residue percentage for each filtration process after liquified

處 理	濾 紙	濾 膜		合 計
		No. 5C	0.45 μm	
Treatment	No. 5C	%		Total
Control	98.6 ^{*3}	1.4	0.2	98.4
Marine - I	5.3	4.1	2.8	12.2
Marine - II	4.6	10.6	4.0	19.2
<i>Aspergillus</i> sp.	50.4	4.0	0.1	54.5
Prease	35.9	2.4	0.3	38.6
Bromelain	8.8	5.4	0.8	15.0

*1 水解條件如表 4。

The hydrolysis condition was described in Table 4.

** 對 100 g 生血合肉之百分率，以乾物計。

Residue to the 100 g raw red muscle, on dry basis.

*3 過濾前加熱至沸騰。

Heat to boiling before filtration.

表 6 海洋菌株酵素短時水解*¹殘渣顆粒*²分佈情形

Table 6 Particle distribution of residue after short time hydrolysis of marine strains.

酵素源 Enzyme source	水解時間(分) Hydrolysis time (min)	濾紙	濾	膜	合計 Total
		No. 5 C	0.45 μm	0.22 μm	
		%			
Marine - I	30	60.2 ^{*3}	8.2	0.6	69.0
	60	42.7	21.6	3.2	67.5
	90	26.6	30.3	9.1	66.0
	120	20.1	30.6	14.0	64.7
	150	16.5	28.5	18.6	63.6
Marine - II	30	65.6	7.4	0.3	73.3
	60	46.3	18.4	5.2	69.9
	90	30.4	27.5	10.0	67.9
	120	21.2	36.0	10.1	67.3
	150	17.2	40.2	9.6	67.0

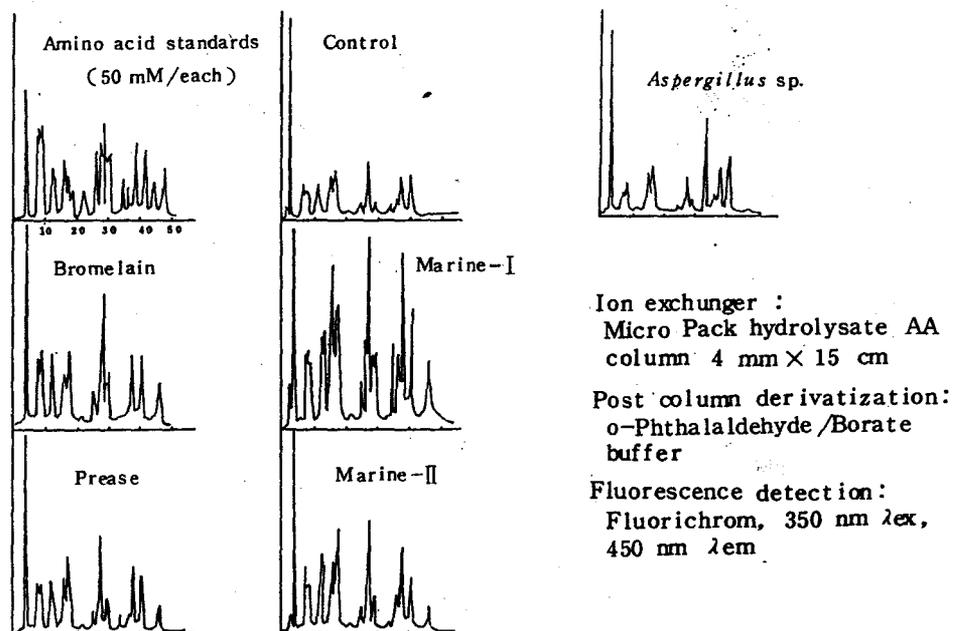
*¹ 水解條件 Hydrolysis condition: pH=6.5, 50°C*² 對 100 g 生血合肉之百分率，以乾物計。Residue to the 100 g raw red muscle, on dry basis.*³ 過濾前加熱至沸騰 Heat to boiling before filtration.

圖 5 水解液及標準品胺基酸高效層析分離圖

Fig. 5 Elution profile of amino acids for standard and hydrolysates by HPLC.

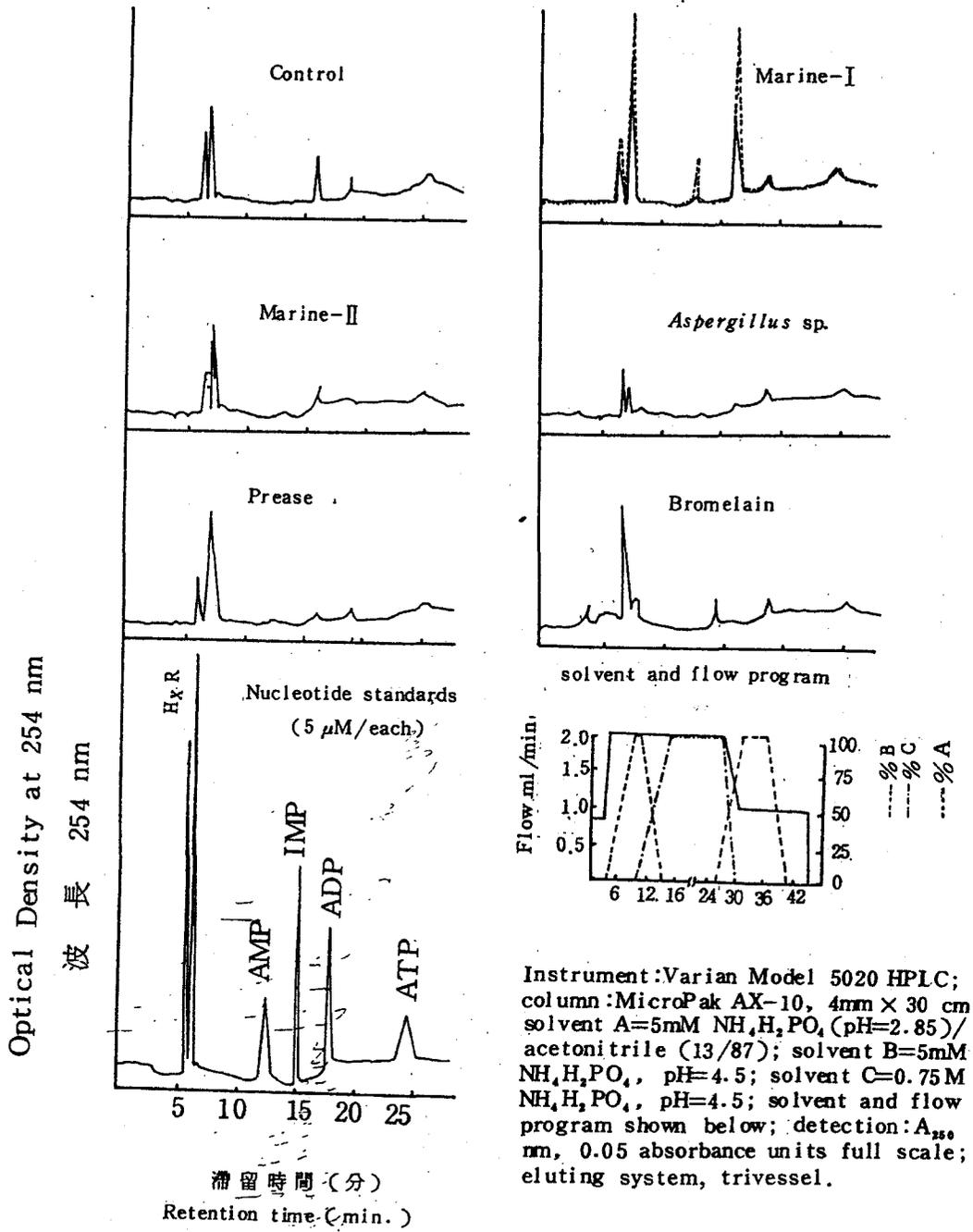


圖6 水解液及標準品核苷酸高效層析分離圖
 Fig. 6 Elution profile of nucleotides for standard
 and hydrolysate by HPLC.

水解液的一個問題，各試驗組水解液之色澤，經以分光光度計測其可視光域之吸收光譜及以色差儀測定其色差（圖 7，表 7），發現除了 Bromelain 組水解液顏色呈深褐色外，其餘各試驗組均呈淡黃色，不需再行脫色。

Bromelain 組除了顏色深之缺點外，水解液的油膩味道也較重，水解液表面有一層黃色浮油，其他各試驗組均無此種現象。綜合以上各試驗結果，筆者等認為 Marine-I 菌株對經血合肉不但液化率高， α -胺基酸產率大，並且不產生苦味、色澤淡黃，可以改良及發展成低鹽調味品，不過在安全性及健全性方面仍需繼續進行試驗，以確保食用安全無虞。Marine-II 菌株對血合肉之液化效果雖不如 Marine-I，但吾人可利用短時液化，產生多量微粒子製成蛋白朊或製成微膠囊取代餌料生物可行性甚大。各試驗組及對照組水解液之組織胺含量，經測定結果均在 10 ppm 以下，證實只要原料鮮度良好，Marine-I, II 與其他酵素一樣沒有組織胺的問題。

此外，在酵素或菌體固定化方面也值得做進一步的研究，菌株的改良、脂肪的水解、核苷酸呈味成分的保存等也都是筆者等所要努力的方向。

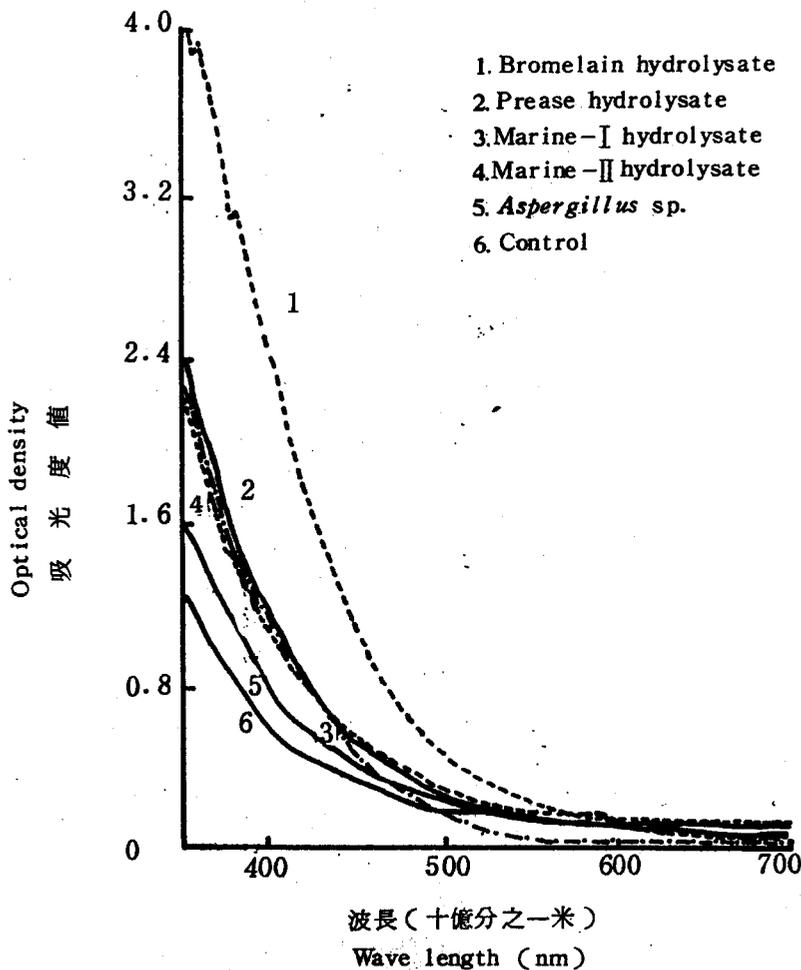


圖 7 血合肉酵素水解液之吸收光譜，直接取自表所述酵素水解液。

Fig. 7 Absorption spectra of red muscle hydrolysate.

表 7 血合肉酵素水解液之色差分析
Table 7 Color difference analysis of red muscle hydrolysates.

水解液 Hydrolysate	亮度 L	色 彩		ΔL	Δa	Δb	色差* ΔE
		a	b				
Control	80.5	17.7	12.0	-4.0	-0.5	16.9	17.4
Marine-I	72.4	19.6	29.8	-12.1	1.4	34.7	36.8
Marine-II	77.8	18.2	22.1	-6.7	0.0	27.0	27.8
Prease	77.2	18.4	25.9	-7.3	0.2	30.8	31.7
<i>Aspergillus</i> sp.	79.0	18.1	18.8	-5.5	-0.1	23.7	24.3
Bromelain	66.2	24.3	49.0	-18.3	6.1	53.9	57.2

$$* \Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

摘 要

由海水中分離出 396 菌株，選取蛋白分解能力強，不具離胺酸、鳥胺酸及組胺酸等脫羧基酵素，以及不產生氨、吡啶、三甲胺、亞硝酸等有毒物質之革蘭陰性菌二株，與由經節上分離之 *Aspergillus* sp.、市售細菌性酵素一種—Prease、植物性酵素一種—bromelain 進行對血合肉液化比較。

一 Marine-I, II 之最適作用溫度為 35°C，最適反應 pH 為 6.5 ~ 7.0，45°C 以上酵素安定性稍下降，50°C 以上急速下降，pH 6.5 ~ 7.0 安定性良好。

二為避開腐敗菌、病原菌的作用溫度，兼顧酵素之安定性，生血合肉之液化溫度採用 50°C。

三 Marine-I 氮液化率高（生血合肉，86.2% / 8 小時）， α -胺基酸收率高（生血合肉，986.8 mg% / 8 小時），水解液無苦味，呈淡黃色，色胺酸含量高，且胺基酸較均衡，可朝低塩調味品方向發展。Marine-II 菌株在短時水解可微粒子化，可製成蛋白朊供培養基用，或製成微膠囊供取代餌料生物用。

四 Bromelain 雖具良好氮液化率及 α -胺基酸收率，但也具苦味、水解液色澤太深、油燒味重及胺基酸不均衡等缺點。

五各供試組之水解液核苷酸含量均不理想，有待改進。此外水解液之安全性及健全性也有待進一步確認。

謝 辭

本試驗承所長李燦然博士鼓勵，前系主任賴永順先生關照，秘書陳茂松及王副研究員文政兄之指正與提供資料，特此致謝。

参考文献

1. 富山哲夫・杉原 喬 (1951). 魚體の液化に関する生化学的研究—I, 魚類液化の基礎条件について。九大農学部農藝雑誌, 13, 297—305.
2. 柏田研一 (1955). 水産動物組織の酵素分解に関する研究—I、II, 筋肉よりアンモニアの生成(i), (ii)。日水誌, 21(7), 494—500.
3. 柏田研一 (1957). 水産動物組織の酵素分解に関する研究—III, アンモニア生成とアミドとの関係。日水誌, 23(10), 656—659.
4. 東 秀雄・村山繁雄・大西登史良・井關重夫・渡邊武彦 (1965). 魚類液化蛋白に関する研究—I, 液化蛋白質の營養價。東海水研報 43, 77—86.
5. 築瀨正明 (1965). 魚類液化蛋白に関する研究—II, 魚體の酵素分解方法と分解物可溶部のトリプトファン含量。東海水研報, 43, 87—90.
6. 井關重夫・渡邊武彦・衣卷豊輔 (1968). 魚類液化たんぱくに關する研究—IV, 製造条件の吟味。東海水研報, 59, 81—99.
7. 井關重夫・渡邊武彦・衣卷豊輔 (1973). 魚類液化たんぱくに關する研究—V, 分解收率の検討。東海水研報, 73, 85—101.
8. 杉井麒三郎・衣卷豊輔 (1973). 魚類液化たんぱくに關する研究—VI, 使用酵素劑の種類と液化たんぱくの組成。東海水研報。73, 103—112.
9. McBride, J.R., Idler, D.R. and MacLeod, R.A. (1961). The liquefaction of British Columbia herring by ensilage, proteolytic enzymes and acid hydrolysis. J. Fish. Res Bd. Canada, 18(1), 93—112.
10. 黃蔭樺・陳錫秋 (1971). 食用魚溶漿之研究, 第一報: 酵素和pH對魚溶漿鮮度之影響。中國水產, 222, 15—18.
11. 黃蔭樺・陳錫秋 (1971). 食用魚溶漿之研究, 第二報: 酵素對魚肉蛋白之液化作用。中國水產, 226, 7—12.
12. 陳錫秋 (1972). 食用魚溶漿之研究, 第三報: 添加物對魚類液化作用、腥臭及苦味之影響。中國水產, 239, 11—16.
13. Sen, D.P., Sripathy, N.V., Lahiry, N.L., Sreeivasan, A. and Subrahmanyam (1962). Fish hydrolysates. I. Rate of hydrolysis of fish flesh with papain. Food Technology, 16, 138—141.
14. Hale, M.B. (1969). Relative activities of commercially-available enzymes in the hydrolysis of fish protein. Food Technology 23, 107—110.
15. 衣卷豊輔 (1969). 酵素による魚肉タンパクの可溶化とその特性。New Food Industry, 11(12), 49—55.
16. 衣卷豊輔 (1970). 酵素にする魚肉タンパクの可溶化とその特性(續)。New Food, Industry, 12(1), 73—78.
17. 高橋 喬・森下達雄・富田和明 (1984). 酵素による血合肉の液化に関する研究。三重大學水研報, 11, 207—218.
18. 鈴木たね子 (1984). 魚類タンパク濃縮物。New Food Industry 26(12), 55—68.
19. 北林邦次・首藤勝夫・中村邦典・石川宣次 (1963). 水産動物肉の酵素分解——苦味について。北海道立水産試験場報告。1, 88—97.

20. 高橋 慧 (1970). 食品加工における酵素の利用と 2, 3 の問題点。New Food Industry 12 (2), 1—8.
21. 王文亮 (1985). 台灣東北部海域人工浮魚礁海洋好氣性異營細菌數值分類研究。國立台灣海洋學院水產食品科學研究所碩士論文。
22. 蔡士及 (1979). 水產細菌學。農復會水產專刊第 33 號。
23. Kaneko, T., Krichevsky, M.T. and Atlas, R.M. (1979). Numerical taxonomy of bacteria from the Beaufort sea. J. Gen. Microbiol. 110, 111—125.
24. Laycock, R.A. and Regier, L.W. (1971). Trimethylamine producing bacteria on haddock (*Malanogrammus aeglefinus*) fillet during refrigerated storage. J. Fish. Res. Bd. Canada. 28(3), 305—309.
25. 魏岳壽・張曙明著 (1972). 農業微生物實驗法。p71. 國立編譯館出版，正中書局印行。
26. 高橋 喬・森下達雄・上野隆二・坪井敏彦 (1979). 酵素によるサメ肉の脱尿素液化物の製造について。三重大學水研報，6，199—207.
27. Kevin, K., Bod, C. and Tim, S. (1983). HPLC analysis of amino acids by post column reaction with orthophthaldehyde and fluorescence detection, Varian Instrument at work, No. LC 117.
28. 王文政 (1983). 鯖及紅目鱸冰藏改進及鮮度快速測定。國立台灣海洋學院水產製造研究所碩士學位論文，p9—10, 35.
29. 蘇和傑 (1974). 水產化學實驗。p85—86. 文笙書局經售，一文出版社印行。
30. 河端俊治 (1974). ヒスタミンの交換クロマトグラフィー，水產生物化學・食品學實驗書，p300—305. 恆星社厚生閣。