

錢阜甯¹，江善宗²

¹ 食品工業發展研究所

² 國立台灣海洋大學 水產食品科學系

(1997年6月19日接受)



以鯖魚肌肉蛋白生產肉類食品結著劑之研究

摘要

利用鯖魚肉蛋白，配合由豬血中分離之凝血因子XIII，開發肉類食品結著劑。冷凍鯖魚經採肉、漂水、脫水後，添加還原劑至鯖魚漿中，其肌動凝蛋白 (AM) 的抽取率、可反應硫氫基含量、Ca-ATPase 活性均高於對照組。經凍乾之魚肉蛋白粉末添加至碎肉製成肉片，比較對碎肉結著之影響，發現本實驗所製備之結著劑與市售組 (Parumido MX-30) 沒有差異 ($P>0.05$)。將混合不同比例的凝血因子XIII粗酵素之魚肉蛋白粉末加至碎肉，結果其結著力比市售組要佳。以本實驗所開發之食品結著劑來看，最適使用條件為：5% 結著劑添加量，包含 10% 粗酵素粉末，膠化溫度及時間分別為 40°C 及 60 分鐘。

關鍵詞： 冷凍鯖魚，食品結著劑，還原劑，豬血凝血因子XIII

所謂重組肉 (Restructured meat) 即是將次等肉或是加工上不合規格的肉攪拌，或脂肪與肌肉分開重新組合成為價值較高之肉製食品⁽¹⁾。

Thenco et al.⁽²⁾ 曾做過物理性及化學性的處理對雞捲、豬肉捲及牛肉捲之接著性的影響，發現這些肉製品的結著力是賴於鹽溶性蛋白的抽出而形成的；直至今日，肉類 (魚類也同) 中的鹽溶性蛋白已被認為是肉塊之良好接著劑，同時具有乳化及保水作用。

許多研究報告中提及，食品蛋白可經酵素修飾而改變其功能特性及營養價值，Transglutaminase (TGase) 就是其中之一，Tgase 是一種細胞內的酵素，廣泛地分布於動物組織和器官中⁽³⁾，該酵素可催化一些蛋白質分子間或分子內形成 Isopeptide bond 的架橋結合，而改變其功能特性。豬血漿中凝血因子XIII (Plasma factor XIII) 是一種酵素前趨物，經蛋白酶及鈣活化後，稱為活化型的凝血因子XIIIa (Factor XIIIa)，即具有 TGase 的催化能力⁽⁴⁾，可催化蛋白質分子形成架橋結合。Jiang and Lee⁽⁵⁾，由豬血中純化 Factor XIII (Protransglutaminase)，並添加於鯖魚肉蛋白，證明能有效地增強煉製品網狀結構，增加其彈性。

目前市售食品結著劑均仰賴進口，售價頗高，故本

實驗利用此類大宗魚獲物—鯖魚，將其鹽溶性蛋白抽出，再配合豬血漿凝血因子XIII加到碎肉中，開發食品用之結著劑，以增加鯖魚等的消費市場。

材料與方法

(一)、探討利用鯖魚生產食品結著劑之方法

1. 材料：

- (1) 冷凍鯖魚購自南方澳佳福冷凍公司
- (2) 碎豬肉購自一般傳統市場

2. 探討利用鯖魚生產食品結著劑之方法

2-1 製備食品結著劑之方法

冷凍鯖魚採肉、鹼水漂、脫水、除筋、空搗潰 10 分鐘、添加 0.1% 的還原劑(A): Cysteine; (B) : NaHSO₃; (C) : (A)+(B)、攪拌反應 10 分鐘、pH 調整為 7.2、添加 3% 食鹽搗潰 20 分鐘、緩慢添加 5 倍量之冰水均勻混合、將上澄液去除、沉澱部份進行凍結乾燥，即為本實驗製備之食品結著劑。

2-2 品質之測定

- (1) 肌動凝蛋白之抽出率：依照 Noguchi 之方法

錢阜甯, 江善宗 (1997) 以鯖魚肌肉蛋白生產肉類食品結著劑之研究. 水產研究, 5(1): 89-96.

抽取⁽⁶⁾。

(2) 白之濃度測定：依 micro-Biuret 之方法定量之⁽⁷⁾。

(3) 肌動凝蛋白可反應硫氫基 (Reactive SH group) 含量之測定：依 Buttkus 之方法測定⁽⁸⁾。

(4) 肌動凝蛋白 Ca-ATPase 活性之測定：依 Arai 之比色定量法測定之⁽⁹⁾。

2-3 碎肉片結著力之測定

不同量之上述製備之結著劑混合於碎豬肉中，製成肉片 (40x25x3 mm)，以 Rheometer 測定拉張力 (Tensile test)，樣品拉斷所須之最大力 (g) 及樣品最大伸長距離 (mm)，二者的乘積 (g x mm) 來表示。

2-4 膠化時間和溫度對碎肉片產品結著強度之影響

同樣以拉張力試驗來比較。

(二)、探討豬血漿凝血因子XIII對碎肉片產品結著力之影響

1 材料：豬血、本實驗製備之食品結著劑及市售之食品結著劑 (Parumido MX-30)、碎豬肉。

2 方法：

2-1 血漿凝血因子XIII之分離

新鮮豬血添加抗凝劑以 1000x g 10 min 離心得血漿，經硫鉍分劃處理 56°C、加熱 3 分鐘，上層液加硫鉍至 36% 飽和，以 50 mm Tris-1 mm EDTA 緩衝溶液透析一夜，進行 DEAE-Sepacel chromatography。

2-2 Factor XIIIa 對 AM 之催化作用

純化之 Factor XIIIa 與 AM 溶液混合，以 SDS-

PAGE 電泳分析 Factor XIIIa 對 AM 之催化作用。

2-3、粗酵素 Factor XIII 對碎肉結著力之影響

(1) 粗酵素 Factor XIII 之製備：新鮮豬血添加抗凝劑，1000xg 離心 10 分鐘二次，收得上層液進行凍結乾燥。

(2) 粗酵素 Factor XIII 對碎肉結著力之影響：將不同比例之粗酵素凍乾粉末與前述製備之食品結著劑混合添加到碎肉中製成肉片，測定其拉強力並與市售結著劑 (Parumido Mx-30) 比較之。

2-4 以感官品評方式來比較結著劑最適添加量

製成之肉片請 6 位品評員就產品的咀嚼度、適口性、整體感評分，最佳者給 5 分，最差者給 1 分。

結果與討論

(一)、探討利用鯖魚生產食品結著劑之方法及其可行性

1. 鹽溶過程中還原劑對鯖魚肌肉中肌動凝蛋白抽出率的影響

Table 1 依實驗方法中所述製備食品結著劑之方式將魚肉的鹽溶性蛋白溶出 (即所謂之肉糊 Meat sol)，不添加還原劑 (對照組) 時肌動凝蛋白的抽出率為 57.4%，添加 0.1% Cysteine (A組)、0.1% 的 NaHCO₃ (B組) 及 0.1% 的 Cysteine 及 NaHCO₃ 之混合劑 (C組)，抽出率分別提高為 78.4、82.8 及 84.1%，顯示添加適當的還原劑可將因冷凍變性造成之雙硫鍵 (S-S) 還原成硫氫基 (SH group)，恢復蛋白質的立體構形提高肌動凝蛋白的抽出率。

Table 1. Effect of the addition of cysteine and sodium bisulfide before grinding process on the extractability¹ of actomyosin of frozen-dried mackerel mince.

Treatment ²	Thawed fish	Meat sol	After freezing	After freeze-drying
Control	24.2a ³	57.4c	48.0c	40.8b
A	---	78.4b	73.2b	68.5a
B	---	82.8a	76.6a	70.1a
C	---	84.1a	75.3a	70.8a

¹ Extractability was expressed as the percentage ratio of the extractable actomyosin to the quantity of fish meat (in dry basis).

² Control: without reducing agent treatment; A: treated with 0.1% cysteine; B: treated with 0.1% NaHSO₃; C: treated with 0.1% of the mixture of cysteine and NaHSO₃.

³ Values in the same column bearing unlike letters differ significantly (P<0.05).

肉糊經凍結及凍乾後食品之物性會因凍結乾燥而發生改變，故肌動凝蛋白的抽出率均略為下降，但處理組 (A、B、C組) 之抽出率均較對照組高。

2. 還原劑對鯖魚肌肉中肌動凝蛋白可反應硫氫基 (Reactive SH) 含量之影響

由解凍魚肉所萃取之肌動凝蛋白其可反應硫氫基含量為 $18.6 \text{ mole}/5 \times 10^5 \text{ g}$ (Table 2)，但在處理過程中添加還原劑者 (A、B、C組) 其可反應硫氫基含量分別為 27.7、29.1 及 $30.2 \text{ mole}/5 \times 10^5 \text{ g}$ ，經凍乾後處理組之可反應硫氫基含量均無大變化，但都比對照組高。

由於搗潰的作用致使魚肉蛋白分子展開，官能基暴

露出來，造成硫氫基及其它鍵結如疏水鍵或氫鍵等重排，相互作用產生凝聚，故可測得之可反應硫氫基含量較低；但添加還原劑後可將部份因凍結造成蛋白質分子內或分子間的雙硫鍵打斷，還原成硫氫基，因此硫氫基數目很明顯的增加。

3. 還原劑對鯖魚肌肉中肌動凝蛋白 Ca-ATPase 活性之影響

一般而言 Ca-ATPase 活性之變化比抽出率更能反應蛋白質品質之變化，只要蛋白質分子發生部份之微細構造變化，就會使得酵素活性發生變化。與上述結果相同添加還原劑處理後均可有效地提高 Ca-ATPase 之活性 (Table 3)。

Table 2. Effect of the addition of cysteine and sodium bisulfide before grinding process on the reactive SH¹ of actomyosin of frozen and freeze-dried mackerel mince.

Treatment ²	Thawed fish	Meat sol	After freezing	After freeze-drying
Control	18.6a ³	15.8c	16.2c	15.4c
A	---	27.7b	24.3b	22.1b
B	---	29.1a	29.0a	27.4a
C	---	30.2a	28.8a	26.5a

¹ The reactive SH was expressed as moles of SH per $5 \times 10^5 \text{ g}$ of protein.

² Refer to the footnote of Table 1.

³ Values in the same column bearing unlike letters differ significantly ($P < 0.05$).

Table 3. Effect of the addition of cysteine and sodium bisulfide before grinding process on the Ca-ATPase activity¹ of actomyosin of freeze-dried mackerel mince.

Treatment ²	Thawed fish	Meat sol	After freezing	After freeze-drying
Control	0.185a ³	0.165c	0.143c	0.100c
A	---	0.201b	0.186b	0.164b
B	---	0.224a	0.201a	0.169ab
C	---	0.221a	0.194ab	0.172ab

¹ The Ca-ATPase activity was expressed as micromoles of inorganic phosphate released within 1 min reaction at 250c per mg protein.

² Refer to the footnote of Table 1.

³ Values in the same column bearing unlike letters differ significantly ($P < 0.05$).

由以上之實驗結果顯示，冷凍雖造成上述肌動凝蛋白之抽出率、可反應硫氫基含量、Ca-ATPase 活性的下降，但添加還原劑後能使上述特性提高，顯示還原

劑有恢復魚肉蛋白之立體結構使其重新具有鹽溶性之效果，由此判斷添加適量之還原劑對於製作食品結著劑具有提昇品質的效果。

(二)、結著劑對碎肉片產品結著力的影響

1 食品結著劑對碎肉結著力之影響

添加不同量本實驗所製備之各種食品結著劑至碎肉中製成肉片，探討該結著劑是否具有增強碎肉黏鑊效果。在 40°C 恆溫 60 分鐘後，再以 90°C 加熱 20 分鐘，待冷卻後測其拉張力，結果如 Table 4 所示，不添加食品結著劑之碎肉直接膠化加熱處理後之肉片，其結著力為 370 g.mm 左右，添加還原劑處理所製得之結著劑各組 (A、B、C組) 之拉張力均比對照組高 ($p < 0.05$)，但是在相同添加量下處理組之間並沒有統計上的差異 ($p > 0.05$)。一般市售植物性蛋白結著劑混合之麵漿中，若蛋白質與原料表面蛋白質的親和力愈強則形成的結合鍵結也愈強，因此添加食品結著劑可增強碎肉組成之重組肉片的結著強度就愈大。

2 膠化時間及溫度對碎肉片產品結著力的影響

以添加 5% 的結著劑並在 40°C 下膠化，結果發現隨著膠化時間 (0-120 分鐘) 的增加，碎肉片產品之結

著力亦隨之增強 (Table 5)，另 Table 6 之結果，肉片產品之結著力隨著膠化溫度升高而增大。

(三)、凝血因子XIII對肌動凝蛋白的催化作用

將高純度之凝血因子XIII經 DTT 及 Thrombin 活化後加入肌動凝蛋白溶液中，並添加 CaCl_2 溶液使其最終濃度為 10 mM，在 37°C 分別膠化 30 分鐘，以 SDS-PAGE 的方式來觀察凝血因子XIII對肌動凝蛋白催化的情形，圖一當膠化 30 分鐘時，隨著酵素添加量的增加，則在膠體中的肌凝蛋白重鏈 (Myosin heavy chain, MHC) 會逐漸減少，顯示凝血因子XIIIa會催化 MHC 形成非雙硫鍵的共價結合，因所形成之聚合物無法被 SDS、Urea 和 Mercaptoethanol 裂解，故無法進入電泳膠體，導致電泳圖譜上 MHC 蛋白帶顯著變細，也可以看到 Actin 的蛋白帶逐漸變淡，由此可知凝血因子XIIIa確實會催化肌動凝蛋白形成架橋結合，且膠化溫度及時間對酵素的催化反應影響很大。

Table 4. Effect of the quantity of binder added on tensile strength¹ of pork sticks².

Quantity of binder (%)	Treatment ³			
	Control	A	B	C
0	364.0e ⁴	367.4e	393.5e	372.1e
2.5	959.4d	1230.5d	1185.8d	1264.0d
5.0	1847.2c	2152.2c	2139.7c	2128.1c
7.5	2629.3b	3127.7b	3160.6b	3303.2b
10.0	3207.4a	3625.0a	3879.3a	3852.1a

¹ Tensile strength was expressed as g x mm of strength when the stick was torn away. Value in this table were means of 3 determinations.

² Pork stick (40x25x3 mm) was prepared by forming the pork chucks (5x5x5 mm) with various amount of binder.

³ Control : pork sticks bound with the freeze-dried muscle protein powder; A : pork sticks bound with the freeze-dried muscle protein powder treated with 0.1% cysteine; B : pork sticks bound with the freeze-dried muscle protein powder treated with 0.1% NaHSO_3 ; C : pork sticks bound with the freeze-dried muscle protein powder treated with 0.1% of the mixture of cysteine and NaHSO_3 .

⁴ Values in the same column bearing unlike letters differ significantly ($p < 0.05$).

Table 5. Effect of the setting time on tensile strength¹ of pork sticks².

Setting time (min) at 40°C	treatment ³			
	Control	A	B	C
0	955.3d ⁴	1366.5d	1332.5c	1359.2d
30	1340.3c	1677.1c	1851.1b	1713.6c
60	1819.4a	2120.4a	2230.7a	2145.0a
90	1588.0b	2154.7a	2144.1a	2005.5b
120	1580.3b	1881.7b	1862.8b	1841.3b

^{1, 3} Refer to the footnote of table 4.

² Pork stick (40x25x3 mm) was prepared by forming the pork chunks (5x5x5 mm) with 5% of binder.

⁴ Values in the same column bearing unlike letters differ significantly (p<0.05).

Table 6. Effect of the setting temperature on tensile strength¹ of pork sticks².

Setting temp(°C) for 60 min	treatment ³			
	control	A	B	C
25	1653.3d	2055.2b	1917.5c	2132.1b
30	1752.8b	2198.7b	1900.4c	2095.2b
35	1900.8a	2122.7b	2048.9b	2298.6a
40	1832.4a	2416.1a	2281.1a	2280.2a

^{1, 2, 3} Refer to the footnote of Table 5.

⁴ Values in the same column bearing unlike letters differ significantly (p<0.05).

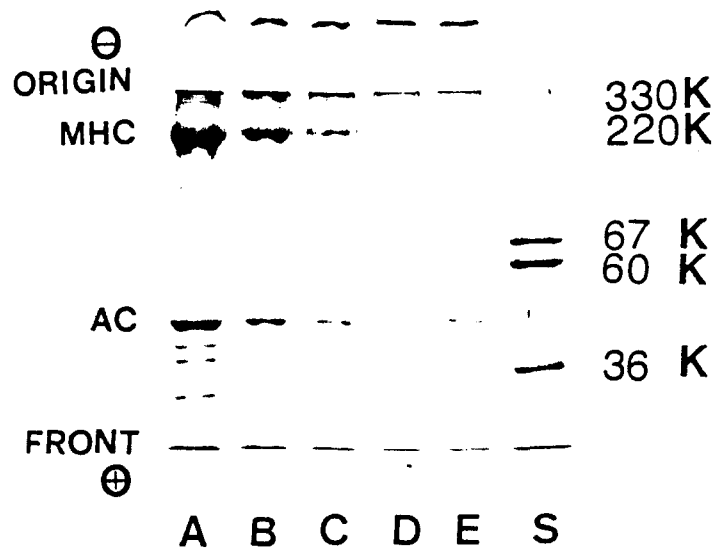


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the polymerization of actomyosin (AM) by pig plasma factor XIIIa. Standard protein (S); actomyosin without factor XIIIa (A); AM (2.41mg/ml) incubated with 0.2 ml (B); 0.4 ml (C); 0.6 ml (D); 0.8 ml (E) of factor XIIIa (0.083 mg/ml) at 37°C for 30 min.

(四)、粗凝血因子XIII對碎肉片產品結著力之影響

以 5% 魚肉蛋白粉末來比較添加不同量的粗酵素粉末對碎肉片結著力的影響。由 Table 7 知，單獨使用魚肉蛋白粉末者其碎肉片的結著力強度與市售組 (Parumido MX-30) 沒有差異，但魚肉蛋白粉末混有 5% 以上的粗酵素粉末時所製得之碎肉片產品的結著力均較市售結著劑要佳，可能是因凝血因子XIII催化蛋白質分子上 Glutamine 的 γ -carboxamide 及另一蛋白質分子上之 Lysine 的 ϵ -amino group 進行醯基轉移反應，產生 ϵ -(γ -glutamyl) lysine 的異生太鍵 (Isopeptide bond) 的鍵結，使得碎肉間的鍵結更加堅固而提高產品的拉

張力；但添加粗酵素粉末至 40% 時所製得產品之結著力反而下降，推測粗酵素粉末中可能含有胺類 (Amines)，產生抑制作用而阻礙了架橋結合反應，造成產品的結著力稍下降。

(五)、各種結著劑之添加量對碎肉片製品官能品質的影響

Table 8 是以 Cysteine and NaHSO₃ 處理製成食品結著劑，再添加到碎肉中製成肉片之感官品評結果，當結著劑添加至 5% 時，其咀嚼度、適口性及整體感均達到最高，添加 7.5% 及 10% 與添加 5% 者沒有差異 (P>0.05)，所以基於成品的考量，5% 的添加量即是最適當的。

Table 7. Effect of the quantity of crude factor XIII on tensile strength¹ of pork sticks².

Factor XIII added (%)	Treatment ³			
	Control	A	B	C
0	1746.8c ⁵	1931.2c	2064.7b	2079.4c
5	1837.0c	2230.4b	2523.8a	2344.8b
10	2187.8a	2696.2a	2678.9a	2842.3a
20	1990.9b	2162.9b	2131.1b	2248.5b
40	1936.3b	1891.6c	1955.6c	2111.3c
MX-30 ⁴	2110.4a	--	--	--

^{1, 2, 3} Refer to the footnote of Table 5.

⁴ MX-30: commercial binder (Parumido MX-30).

⁵ Values in the same column bearing unlike letters differ significantly (p<0.05).

Table 8. Effect of the quantity of binder (treated with the mixture of cysteine and sodium bisulfide) on sensory quality pork sticks¹.

Quantity of binder (%)	Chewiness ²	Mouthfell ²	Over-all acceptability ²
0	1.2c ³	1.0d	1.0c
2.5	2.2b	2.8c	2.3b
5.0	3.8a	3.7b	3.5a
7.5	3.8a	4.5a	4.2a
10.0	4.2a	3.7b	3.8a

¹ Pork stick(40x25x3 mm) was prepared by forming the pork chunks (5x5x5 mm) with 5% of binder containing 10% crude factor XIII.

² Cores in chewiness, mouthfell, and over-all acceptability were means of 6 determinations which were expressed as: 1: very poor; 3: acceptable; 5: excellent.

³ Values in the same column bearing unlike letters differ significantly (p<0.05).

結論

以經冷凍--解凍之鯖魚為原料，在製作 0.1% 結著劑的過程中添加 0.1% Cysteine、NaHSO₃ 或兩者之混合物對冷凍鯖魚之肌動凝蛋白質抽出率、Ca-ATPase 活性及 Reactive SH 均有復原的效果。將本實驗製備之食品結著劑與市售食品結著劑 (Parumido MX-30) 分別撒於碎肉中比較其結著力，結果發現本研究所開發之食品結著劑與市售相同，而添加豬血中分離之凝血因子XIII之粗酵素粉末後其結著力則較市售者佳。雖然肉類製品之結著力會隨著結著劑添加量的增加而增強，但感官品評的結果及經濟的考量，當添加5%結著劑 (包含 10% 粗凝血因子XIII) 時，肉類製品的結著力、咀嚼度及彈性可達最適口的程度，膠化溫度及時間分別為 40°C、60 分鐘。

謝辭

本篇報告得以完成，承蒙實驗室之工作伙伴們之務實幫忙，在此一併誌謝。

參考文獻

1. Seideman, S. C., G. C. Smith, Z. L. Carpenter and C. W. Dill (1979) Plasma protein isolate and textures soy protein in ground beef formulations. *J. Food Sci.*, **44**: 1032.
2. Thenco, D. M., D. G. Siegel and G. R. Schmidt (1978) Meat massaging : Effects of salt and phosphate on the microstructural composition of muscle exudate. *J. Food Sci.*, **43**: 483.
3. Folk, J. E. and S. I. Chung (1973) Molecular and catalytic properties of transglutaminases. *In Advance in Enzymology*, (A. Meister and J. Wiley eds.). New York, **38**: 109.
4. Chung, S. I., M. S. Lewis and J. E. Folk (1974) Relationships of the catalytic properties of human plasma and platelet transglutaminase (actives blood coagulation factor XIII) to their subunit structures. *J. Biol. Chem.*, **249**(3): 940.
5. Jiang, S. T. and J. J. Lee (1992) Purification, characterization and utilization of pig plasma factor Xiii. *J. Agric. Food Chem.*, **40**(7): 1101.
6. Noguchi, S. (1974) The control of denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. Doctoral Disseration. Sophia Univ., Tokyo, Japan.
7. Itzhaki, R. F. and D. M. Gill (1964) A micro-Biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.*, **9**: 401.
8. Buttkus, H. (1971) The sulphhydryl content of rabbit and trout myosins in relation to protein stability. *Can. J. Biochem.*, **49**: 97.
9. Arai, K. (1974) Quality of fish: Evaluation of fish quality from the muscle protein studies. *Jap. Soc. Sci. Fish Koseisha*, Tokyo, 55pp.

Fu-Ning Chien¹ Shann-Tzong Jiang²

¹Food Industry Research and Development
Institute, Hsinchu 300, Taiwan.

²Marine Food Science Department, National
Taiwan Ocean University, Keelung 202, Taiwan.

(Accepted 19 June 1997)



Feasibility Study on the Development of Food Binder Produced from Minced Mackerel

Abstract

In order to develop the food binder, the freeze-thawed mackerel *Scomber australasicus* was ground with 0.1% cysteine, NaHSO₃ or the mixture of these two compounds for 10 min. The extractability, Ca-ATPase activity, reactive SH of actomyosin (AM) remarkably increased, compared with those without treatment by reducing agents, even after freeze-drying. When 5% of the treated muscle protein powder was added into pork chunks and incubated at 40°C for 60 min, no significant difference in binding ability (tensile strength) of these powders and Parumido MX-30 (a commercialized food binder) was observed ($p>0.05$). The tensile strength of the pork sticks prepared by using the muscle protein powder contained 10% crude factor XIII was significantly higher than that of Parumido MX-30. From the sensory quality and tensile strength, the optimal conditions on using the developed food binder were: quantity added, 5%; content of crude factor XIII, 10%; setting temperature and time, 40°C, 60 min.

Key words: Freeze-thawed mackerel *Scomber australasicus*, Food binder, Reducing agent, Pig plasma factor XIII