

黃鰹鮪加工副產物血合肉釀製魚醬油之研究

郭科良¹·楊涵婷²·蕭泉源²·蔡慧君^{1*}

¹行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

²國立臺灣海洋大學食品科學系

摘要

本研究以黃鰹鮪 (*Thunnus albacares*) 加工副產物血合肉為原料，經水解後接種豆麥麴及耐鹽性微生物進行醱酵，探討其釀造魚醬油可行性，以提高副產物之附加價值。黃鰹鮪血合肉加入 3 倍 (v/w) 蒸餾水經自家消化或添加酵素 Alcalase 和 Flavourzyme 水解 4 及 6 hr，以酵素水解組之胜肽類皆高於自家消化組和控制組，其中又以 Alcalase 水解 2 hr 再 Flavourzyme 水解 4 hr 水解液 (A2F4) 增加更為明顯。自家消化或酵素添加組之揮發性鹽基態氮 (VBN)、三甲胺 (TMA) 與水解率等皆高於控制組，且以 A2F4 最高，顯示採用 A2F4 二階段複合酵素水解可增加具甘味和功能性之游離胺基酸和胜肽類，故以此作為後續魚醬油醱酵原料。將鹽度為 15% 及 30% 之 A2F4，接種 10% 豆麥麴後分別添加耐鹽性醱酵菌醃，於 35 °C 下醱酵 90 天，實驗顯示隨釀造時間延長，四組魚醬油之 L 值降低；a、b 值增加；pH 值皆緩慢下降；鹽分含量無顯著變化；VBN 和 TMA 隨時間延長而增加，可溶性固形物最後呈緩慢上升趨勢至 75 天，而總氮與胺基態氮含量於 60 天達最高量後緩慢下降。綜觀以上，15% 鹽分魚醬油較 30% 鹽分有較高之總氮量、胺基態氮與胜肽含量，且組織胺含量也低於 CAC 魚醬油限量標準，而醱酵期間添加耐鹽性微生物，對於魚醬油製品之品質影響並不顯著，推論應為添加量不足，顯示以鮪魚血合肉為原料，添加豆麥麴進行醱酵製成魚醬油是可行的。

關鍵詞：黃鰹鮪、血合肉、酵素、醱酵、魚醬油

前言

臺灣四面環海，蘊藏豐富的水產資源為重要經濟來源之一。依據行政院農業委員會漁業署漁業年報統計，臺灣之漁業生產量約為 141 萬公噸，總產值約為 1,043 億元，其中鮪延繩釣更是臺灣重要漁業之一，其年平均漁獲量約為 20 萬公噸，平均產值高達 229 億元，占漁業總產值的 22%，而鮪魚的年平均漁獲量約為 14 萬公噸，是臺灣重要經濟魚類，此外，鮪魚加工已成為國內水產加工業重要的一環，主要以生魚片和罐頭加工製品為主，總產值約為 1.5 億元，僅次於鯖魚罐頭 (漁業署, 2014)。

在生魚片和罐頭加工過程中，可產生 20 - 25% 的魚頭及內臟；10 - 15% 的魚皮、魚骨以及 5 - 10% 血合肉等副產物 (林與林, 1990)。這些副產物大多被用以製成低價值之養殖飼料或廢棄，其中血合肉的營養價值優於普通肉，若能善加利用不僅能提高副產物之附加價值，同時也能協助加工廠減廢。

魚醬油又名魚露，是常見的醱酵魚產品之一，其釀造方式是由全魚混合大量食鹽後，經天然醱酵釀製至少 6 - 12 個月 (Brillantes and Samonsorn, 2001)。以血合肉製成魚醬油可有效利用副產物，但由於傳統魚醬油的醱酵時間甚長，不利於工業大量生產，且傳統製作過程衛生條件不佳，其製品之魚腥味濃厚，影響消費者接受度，因此在魚醬油釀造品質上仍有很大的改進空間。麴菌併用耐鹽性微生物，除可縮短魚醬油釀造時間，並具抑制異味產生的效果。故本研

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2845; FAX: (02) 2462-3306; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw

究擬以黃鰹鮪 (*Thunnus albacares*) 加工副產物之血合肉為原料，選擇 Alcalase 及 Flavourzyme 作為水解黃鰹鮪血合肉之酵素，藉由單獨或混合使用以尋求較佳之水解條件，所獲得之魚肉水解液再接種豆麥種麴及耐鹽性微生物，於不同條件下進行醱酵，期間監測其生化學組成與品質指標之變化，以評估鮪魚血合肉釀造魚醬油之可行性。

材料與方法

一、實驗材料與項目

(一) 材料來源與前處理

黃鰹鮪血合肉購自允偉興業股份有限公司。魚體捕撈後經放血、去頭尾及內臟等前處理，揀選血合肉部位，以熱封袋分裝密封，每袋 1 kg，以保麗龍箱覆冰貯藏送至實驗室，置於 -20 °C 凍藏備用，使用前先放置 4 °C 冰箱解凍。

白米購自基隆市和平島豐利號商行；小麥由嘉義縣東石鄉十甲有機農場提供；大豆為日正食品工業股份有限公司產品，購自全聯福利中心。

商業酵素 Alcalase (源自 *Bacillus licheniformis*) 與 Flavourzyme (源自 *Aspergillus oryzae*)，購自恆洲實業股份有限公司，製造商為 Novo Nordisk A/S, Denmark。

(二) 黃鰹鮪血合肉水解液之製備

參考 Aristotelis *et al.* (2011) 和 Udomsil *et al.* (2011) 的方法，選擇 Alcalase 及 Flavourzyme 作為水解黃鰹鮪血合肉之酵素。取 100 g 解凍後切碎的黃鰹鮪血合肉，加入 3 倍體積 (v/w) 蒸餾水，以均質機均質 2 min，置於恆溫水浴槽 (Firstek Scientific Shaker Bath B205, Taiwan) 進行水解，轉速為 130 rpm，分別利用魚肉自家消化酵素或外添加 2 種商業酵素 Alcalase 及 Flavourzyme 進行水解，並於各酵素最適作用溫度 65 °C 及 50 °C 進行反應。實驗條件為自家消化 (Autolysis) 4 hr 與 6 hr (AU 4；AU 6)；酵素添加組首先以 0.25% Alcalase 水解 2 hr 後，再以 0.5% Flavourzyme 水解 2 hr (A2F2)；另一組則以 0.25% Alcalase 水解 2 hr 後，再以 0.5%

Flavourzyme 水解 4 hr (A2F4)。待實驗終點以 80 °C 沸水浴加熱 20 min 使酵素失活，冷卻離心過濾之水解液，藉由以下品質指標評估較適水解條件，分析項目包括胜肽類、總氮、甲醛態氮、水解率、揮發性鹽基態氮 (VBN)、三甲胺 (TMA)、和 pH 值等。控制組為血合肉加入 3 倍體積蒸餾水，均質、離心過濾後之萃取液。

(三) 鮪魚血合肉釀造魚醬油之製備

1. 豆麥麴製備

取適量白米經蒸煮冷卻後接種米麴菌 (*Aspergillus oryzae*)，並於 30 °C 下培養 2 - 3 天至米粒上長滿黃綠色菌絲。另取水洗後浸漬約 8 hr 的大豆，以殺菌釜 (Tominautoclave TM-329, Taiwan) 1.1 kg/cm²，121 °C 蒸煮 15 min，大豆待冷卻後與焙炒過之小麥粉以 1 : 1 (w/w) 混合，接著混入種菌並攪拌均勻，將混合物移入麴盤後於 30 °C 培養 3 - 4 天，每日進行翻麴，待長滿菌絲後即為發酵菌醃。

2. 魚醬油之醱酵

參考 Yoshikawa *et al.* (2010) 的方法，將黃鰹鮪血合肉水解液，分別加入 15% (w/v) 及 30% (w/v) NaCl，接種 10% (w/v) 豆麥麴，對照組為添加豆麥麴，實驗組則是添加 0.5% *Tetragenococcus halophilus* (BCRC 12550) 和 0.5% *Zygosaccharomyces rouxii* (BCRC 21486)，添加菌量分別為 2.9×10^7 cfu/ml 與 1.0×10^6 cfu/ml，再於 35 °C 下醱酵 90 天。實驗組別為：(1) 15% NaCl 組：對照組為添加 15% NaCl、10% 豆麥麴 (標示為 LSC 組)，實驗組為添加 15% NaCl、10% 豆麥麴、耐鹽性微生物 (標示為 LSM 組)；(2) 30% NaCl 組：對照組為添加 30% NaCl、10% 豆麥麴 (標示為 HSC 組)，實驗組為添加 30% NaCl、10% 豆麥麴、耐鹽性微生物 (標示為 HSM 組)。

發酵第 0、15、30、45、60、75、90 天分別採樣，取樣前將醬醃攪拌均勻，採樣後以 6,000 rpm/4 °C 下離心 20 min，置於棕色瓶內，保存於 4 °C，進行分析。項目包括：L, a, b 值、pH 值、鹽分、可溶性固形物、總氮、甲醛態氮、氮態氮、胺基態氮、胜肽類、VBN、TMA、和

組織胺等。將各採樣後之魚醬油離心過濾後以 90 °C 水浴進行 30 min 殺菌，冷卻後即為黃鱈鮭血合肉魚醬油成品。

二、分析方法

(一) pH 值

取樣品 20 ml，以震盪器均勻後，使用 pH 測定儀 (Suntex SP-2300) 測定。

(二) 鹽分

依國家標準 CNS 423，類號 N 5006 之方法測定。取 1 ml 樣品液以去離子水定容至 100 ml 後，取 20 ml 加入 0.5 ml 2% 鉻酸鉀 (K_2CrO_4) 指示劑，以 0.1 N 硝酸銀 ($AgNO_3$) 溶液滴定至微橙色止，記錄所消耗之硝酸銀毫升數 (V1) 及空白組所消耗之毫升數 (V0)。NaCl (%) = $F \times (V1 - V0) \times 0.00585 \times 100 / 20 \times 1 / \text{樣品取樣量} \times 100\%$ ；0.00585 代表每毫升 0.1 N 硝酸銀所相當之 NaCl 含量；F 為 0.1 N 硝酸銀標定力價。

(三) 甲醛態氮 (formaldehyde nitrogen, FN)

依許與陳 (1975) 之測定方法略加修飾。取樣品 5 ml，以去離子水定容至 100 ml，之後取 25 ml 以 0.1 N 氫氧化鈉調整 pH 至 8.5，再加入先調好 pH 8.5 之 37% 甲醛溶液 10 ml，混合均勻後再以 0.1 N 氫氧化鈉滴定回至 pH 8.5，記錄其用量 (ml)，甲醛態氮計算公式如下：甲醛態氮 (g/100 ml) = $0.0014 \times F \times a \times (100/W) \times (100/25)$ ；a 為樣品以 0.1 N 氫氧化鈉滴定之用量；W 代表樣品秤取量 (ml)；F 為 0.1 N 氫氧化鈉之標定力價；0.0014 為每毫升 0.1 N 氫氧化鈉所相當之氮含量。

(四) 氨態氮 (ammonia nitrogen, AN)

依 A.O.A.C. (1998) 方法略加修飾。取樣品 15 ml，以 1 N 氫氧化鈉調整 pH 至 9.5，取 5 ml 加入 0.025 M (pH 9.5) 之硼酸鈉緩衝液 1 ml，以凱氏蒸餾裝置進行蒸餾，並以 4% 硼酸加入 2 滴粗蛋白指示劑之 20 ml 溶液作為接收液，再以 0.1 N 氫氧化鈉滴定至終點，氨態氮計算公式如下：氨態氮 (g/100 ml) = $0.0014 \times$

$F \times (a - b) \times 100 / A$ ；a 代表空白組 0.1 N 氫氧化鈉之用量；b 為樣品組 0.1 N 氫氧化鈉之用量；A 為樣品秤取量 (ml)；F 代表 0.1 N 氫氧化鈉之標定力價；0.0014 為每毫升 0.1 N 氫氧化鈉所相當之氮含量。

(五) 胺基態氮 (amino nitrogen)

依卓 (2006) 之測定方法，胺基態氮含量 = 甲醛態氮 - 氨態氮。

(六) 水解率

依黃 (2010) 之測定方法，水解率 (%) = 甲醛態氮 / 總氮 $\times 100\%$ 。

(七) 總氮

依 Kjeldahl 法 (A.O.A.C, 2000) 測定之。

(八) 可溶性固形物

依國家標準 CNS 423，類號 N 5006 方法，使用糖度曲折計進行測定，數值扣除鹽分含量即為可溶性固形物。

(九) 揮發性鹽基態氮 (volatile basic nitrogen, VBN)

依國家標準 CNS 1451，類號 N 6029 方法略加修飾。採用康威氏皿 (Conway's) 微量擴散法進行測定。

(十) 三甲胺 (Trimethylamine, TMA)

依 Hasagawa (1987) 方法測定。取 1 ml TCA 樣品抽出液置於康威氏皿外室，內室注入 10% 硼酸吸收液 1 ml，外室加入 1 ml 飽和碳酸鉀溶液於另一側，吸取 1 ml 10% 甲醛溶液注入康威氏皿外室上方，充分混合後，置於 37 °C 室溫下 60 min，再以 0.02 N 鹽酸滴定內室吸收液直至桃紅色出現為止。空白組以 1 ml 之 7% TCA 取代試液，由滴定量計算出 TMA 含量。計算公式如下：TMA (mg/100 g) = $(V_1 - V_0) \times N \times 14 \times 50 / W \times 100$ ；V₁ 為樣品組 0.02 N 鹽酸滴定量 (ml)；V₀ 為空白組 0.02 N 鹽酸滴定量 (ml)；N 代表 0.02 N 鹽酸濃度；50 表示定容至 50 ml；W 為樣品重 (g)。

(十一) 胜肽類

依 Church *et al.* (1983) 的方法，使用鄰苯二甲醛 (*o*-phthalaldehyde, OPA) 分光光度法測定水解產物中 α -胺基的釋放量。OPA 及 2-巰硫乙醇 (β -mercaptoethanol) 會與一級胺 (Primary amines) 反應，其產物 (1-alkylthio-2-alkylisoindole) 在波長 340 nm 有強吸光值。OPA 試劑配製方式如下：取 0.1 M 四硼酸鈉溶液 25 ml、20% SDS 2.5 ml、OPA (40 mg *o*-phthalaldehyde 溶於 1 ml 甲醇) 1 ml、 β -mercaptoethanol 100 μ l，混合後以去離子水定容至 50 ml 並於褐色瓶保存。取 100 μ l 經適當稀釋之水解液，加入 4 ml 之 OPA 試劑，均勻混合並靜置 2 min 後，於 340 nm 下測定吸光值，另以 Leucine-Glycine 製作標準曲線，以推算出樣品中的胜肽含量。

(十二) 組織胺

參考和修改黃 (2010) 方法，取 1 ml 生物胺標準品或 TCA 樣品抽出液，加入 2 N 氫氧化鈉 0.2 ml、飽和碳酸氫鈉溶液 0.3 ml 及單磺醯氯丙酮溶液 1 ml，於 40 °C 避光反應 45 min 後，加入 25% 濃氨水 0.1 ml 後，避光靜置 30 min 以終止反應，並以甲醇定容至 5 ml，於 4 °C、3,000 rpm 下離心 5 min，吸取上清液通過 0.22 μ m 疏水性濾膜，即可注入 HPLC 分析。分析條件如下：

1. HPLC 機型：Jasco pump PU-2089, Jasco UV detector UV-2075 (Japan)
2. 分析管柱：Purospher STAR RP-18e (5 μ m, 4 mm \times 125 mm, Merck KGaA, Germany)
3. 移動相：A 液為甲醇；B 液為水
4. 梯度條件：

時間 (min)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	50	50
19	90	10
20	50	50
30	50	50

5. 流速：0.6 ml/min

6. 管柱溫度：40 °C
7. 進樣量：10 μ l
8. 測定波長：254 nm

(十三) L, a, b 值

樣品以色差儀 (Minolta spectrophotometer CM-3500d, USA) 測定 L、a 和 b 值，其中 L 值代表亮度 (lightness; L value)；正 a 值代表紅色度 (redness; +a value)、負 a 值代表綠色度 (greenness; -a value)、正 b 值代表黃色度 (yellowness; +b value) 及負 b 值代表藍色度 (blueness; -b value)，並以標準白板校正，校正之標準白板為 X = 94.79、Y = 99.99、Z = 107.27。

三、統計分析

實驗數據以 SPSS 22.0 (statistical products & services solution) 套裝軟體做單向變異數分析 (one-way analysis of variance)，並以鄧肯氏多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 測定各處理組間之差異，顯著水準設定為 $p < 0.05$ 。

結果與討論

一、原料一般成分之分析

本研究以黃鰭鮪加工副產物之血合肉為原料，經分析一般成分結果如 Table 1 所示，水分含量為 64.34%，蛋白質、脂肪分別為 16.89% 及 12.62%，灰分為 0.92%。傳統醱酵醬油常用之植物性蛋白及碳水化合物包括大豆、黑豆及米、玉米、小麥等，其中大豆富含蛋白質、脂肪、異黃酮、礦物質及纖維素等營養成分 (王, 2012)；而小麥則含有大量麥穀蛋白 (Glutenin)，且碳水化合物中約含 10% 聚戊糖，有益於醬油醱酵時黑色素之形成 (邱等, 2007)，故本研究選用大豆及小麥作為穀類醱酵基質。

二、黃鰭鮪血合肉水解液之製備及化學成分之分析

Table 1 Proximate composition (%) of yellowfin tuna dark muscle, soybean and roasted wheat powder

Sample	Moisture	Crude protein	Crude fat	Ash	Carbohydrate
Yellowfin tuna dark muscle	64.34 ± 0.30 ¹	16.89 ± 0.25 (47.37 ± 0.92) ²	12.62 ± 0.35 (35.39 ± 1.13)	0.92 ± 0.03 (2.57 ± 0.10)	5.24 ± 0.75 (14.68 ± 2.00)
Soybean powder	10.73 ± 0.24	32.47 ± 0.26 (36.37 ± 0.37)	18.63 ± 0.02 (20.87 ± 0.04)	4.26 ± 0.07 (4.77 ± 0.06)	33.92 ± 0.39 (37.99 ± 0.35)
Roasted wheat powder	8.20 ± 0.03	13.81 ± 0.18 (15.04 ± 0.20)	1.64 ± 0.10 (1.79 ± 0.11)	1.89 ± 0.02 (2.06 ± 0.02)	74.46 ± 0.23 (81.11 ± 0.22)

¹Expressed as mean ± standard deviation (n=3).²Expressed as dry basis.**Table 2** The contents (mg/100 ml) of total nitrogen (TN), formaldehyde nitrogen (FN), hydrolysis ratio (%), peptides, volatile basic nitrogen (VBN), trimethylamine (TMA) and pH value of hydrolysates of yellowfin tuna dark muscle

Sample	TN	FN	Hydrolysis ratio	Peptides	VBN	TMA	pH
Control	103 ± 7 ^{c1}	2.0 ± 1.0 ^c	2.0 ± 0.5 ^c	159 ± 5 ^{d1}	2.90 ± 0.10 ^d	0.69 ± 0.15 ^c	6.50 ± 0.01 ^c
AU4	153 ± 8 ^b	36 ± 4 ^b	23.8 ± 1.3 ^b	716 ± 57 ^c	9.00 ± 0.40 ^b	2.77 ± 0.30 ^b	6.53 ± 0.01 ^b
AU6	165 ± 15 ^b	39 ± 4 ^b	23.5 ± 0.6 ^b	727 ± 73 ^c	8.22 ± 0.40 ^c	2.77 ± 0.15 ^b	6.56 ± 0.01 ^a
A2F2	433 ± 18 ^a	137 ± 12 ^a	31.6 ± 2.9 ^a	3,374 ± 59 ^b	12.63 ± 0.40 ^a	3.46 ± 0.30 ^a	6.44 ± 0.01 ^d
A2F4	461 ± 32 ^a	139 ± 10 ^a	30.1 ± 0.3 ^a	4,704 ± 209 ^a	12.63 ± 0.30 ^a	3.46 ± 0.30 ^a	6.49 ± 0.01 ^c

¹Expressed as mean ± standard deviation (n=3).Means followed by the same superscript within each column are not significantly different ($p < 0.05$).

(一) 黃鰭鮪血合肉水解液之總氮、FN 及水解率

魚肉先以自家消化酵素或外添加酵素進行水解，期能獲得較高量之總氮及較佳水解率之水解液，同時藉由提升蛋白質利用率，以縮短後續魚醬油釀造時間。由 Table 2 得知未經自家消化或添加商業酵素的控制組之總氮含量為 103 mg/100 ml；FN 含量為 2.0 mg/100 ml，而魚肉水解液無論是自家消化或外加酵素之處理組，皆比控制組有顯著較高量之總氮和 FN，其中又以酵素處理組最高，其總氮量為控制組 4.3 - 4.6 倍，FN 則高達 60 倍 ($p < 0.05$)，此結果顯示酵素水解作用，可將原不溶性蛋白質經水解成可溶性，因而增加總氮的含量，相對也呈現顯著較高的水解率 ($p < 0.05$)。

(二) 胜肽含量

試劑 *o*-phthaldialdehyde 易與小分子胜肽

(M.W. < 6,000 Dalton) 及胺基酸之 α 胺基反應 (Church *et al.*, 1983)，可利用此法檢測水解物中小分子胜肽含量。結果如 Table 2 所示，胜肽含量在控制組為 159 mg/100 ml；四組水解液為 716 - 4,704 mg/100 ml，且不論自家消化或是添加酵素水解者，其胜肽含量均隨水解時間延長而增加，其中又以酵素添加組之胜肽含量顯著高於自家消化組和控制組，其值在 A2F2 為 3,374 mg/100 ml，而 A2F4 則高達 4,704 mg/100 ml。

(三) VBN、TMA 與 pH 值

VBN 和 TMA 含量常用於水產品以作為鮮度指標，當鮮度降低後魚肉的蛋白質被腐敗菌分解而漸產生 VBN 與 TMA，與魚品質之劣變呈現正相關。我國對生食用魚介類的衛生標準規定 VBN 含量每 100 g 應在 15 mg 以下；冷凍鮮魚介類在 25 mg 以下。本試驗結果如 Table 2 所示，VBN 在控制組為 2.90 mg/100 g；四組水解液為 8.22 - 12.63 mg/100 ml。酵素添加組之 VBN 雖顯著

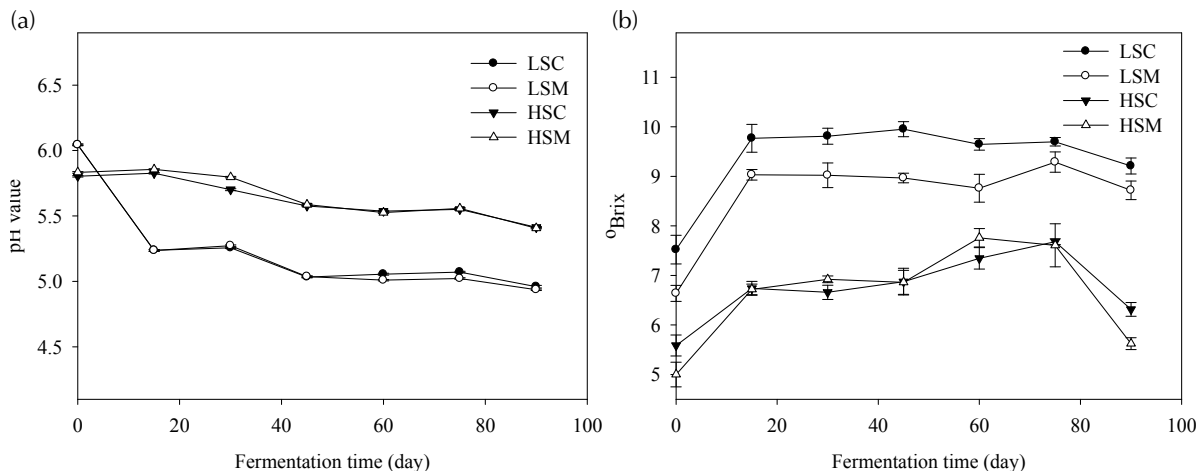


Fig. 1 Changes in (a) pH value and (b) soluble solid content ($^{\circ}$ Brix) of fish sauce samples produced from yellowfin tuna dark muscle with different salt concentrations and halophilus microorganism during fermentation for 90 days. LSC: low salt control, LSM: low salt microorganism, HSC: high salt control, HSM: high salt microorganism.

高於自家消化組，但仍低於 25 mg/100 g 限量值。另外，我國衛生法規現未對 TMA 制定限量標準，但魚肉之 TMA 含量若超過 6 mg/100 g 即被視為初期腐敗 (Sikorski *et al.*, 1990)。本實驗 TMA 在控制組為 0.69 mg/100 g；四組水解液為 2.77 - 3.46 mg/100 ml，各試驗組間無顯著差異，也皆低於 6 mg/100 g。pH 值在控制組值為 6.50；試驗組水解液則為 6.44 - 6.56，自家消化組的 pH 值隨著水解時間延長略為上升至 6.56；但酵素添加組的 pH 值則呈現先降後升之趨勢。洄游性紅肉魚類如鮪魚，含有大量的游離組胺酸 (Histidine)，於生理上扮演緩衝溶液 (Biochemical buffer) 的角色，利於魚類在劇烈運動 (游泳或死前掙扎) 後，使肌肉 pH 值不致於急速下降，故水解液之 pH 介於 6.44 - 6.56，應與組胺酸之含量有關 (Konosu and Yamaguchi, 1982)。

醬油主要的風味來源在於胺基酸與胜肽的多寡，傳統利用自家消化進行水解所需的釀造時間約為 6 個月以上。然利用酵素先行水解產生大量胺基酸則有助縮短釀造時間，此後再利用豆麩進行發酵則可增加醬油的芳香成份，並產生醬油應有的琥珀色，使製品達到色、香、味兼具的高品質醬油。因此，綜合以上的實驗結果，胜肽量在控制組為 159 mg/100 g；而 Alcalase 水解 2 hr 後，再加入 Flavozyme 作用 4 hr (A2F4 組) 可達 4,704 mg/100 g，故以二階段複合酵素 (A2F4) 組之水解液作為後續魚醬油發酵之原料，以獲得

較佳的總氮、胜肽及水解率，期以縮短後續魚醬油釀造時間。

三、黃鰭鮪血合肉水解液釀造魚醬油及化學成分之分析

(一) pH 值、鹽含量及可溶性固形物之變化

將血合肉水解液 (A2F4)，分別加入 15% (w/v) 及 30% (w/v) NaCl，接種 10% (w/v) 豆麥麩視為對照組，而實驗組則另再添加 0.5% *Tetragenococcus halophilus* (BCRC 12550) 和 0.5% *Zygosaccharomyces rouxii* (BCRC 21486) 等耐鹽性微生物。醬油的食鹽濃度一般達 15% 才具有防腐抑菌的效果，但其 VBN 與 TMA 仍可隨發酵時間而上升，因此為探討高食鹽濃度是否具有抑制腥味的作用，故試驗中以 30% 食鹽的處理組來進行比較。另添加耐鹽性微生物進行後續發酵與熟成，目的除期望可提升魚醬油的香氣成分，另可透過有機酸的產生，促使發酵液的 pH 值下降，進而達到防腐的效果。試驗結果 Fig. 1a 顯示黃鰭鮪血合肉魚醬油釀造期間 pH 值之變化，釀造初期時，15% NaCl 組 (即 LSC、LSM 組) pH 值為 6.04，而 30% NaCl 組 (即 HSC、HSM 組) pH 值為 5.80 - 5.83；於釀造 15 天時發現 15% NaCl 組 pH 值大幅下降至 5.24，而 30% NaCl 組 pH 值略為上升至 5.83 - 5.86，之

後隨釀造時間延長，四組製品 pH 值皆呈緩慢下降之趨勢，於醱酵終點可測得 pH 值介於 4.94-5.41，符合國際食品法典委員會 (Codex Alimentarius Commission, CAC) 規定魚醬油標準之 pH 值不得低於 4.5，此結果亦與卓 (2006) 之結果相似，其中以 15% NaCl 組較低，推測原因為 15% NaCl 組之環境較有利於麴菌蛋白酶及澱粉酶作用，生成游離胺基酸及醣類可供耐鹽性微生物生長，而產生較多的有機酸而造成 pH 值下降。一般下缸之食鹽水鹽分含量約為 16-20%，鹽分含量若高於 20% 時，醬醪中耐鹽性乳酸菌和酵母菌生長則受抑制，麴菌之酵素作用亦受影響，其製品之醬香風味較差 (卓, 2006)。Sanchez (2008) 亦提到魚醬油中某些耐鹽性乳酸菌較適鹽濃度範圍為 10-18%，高鹽環境可能會影響乳酸菌的生長，同時也抑制酵素活性。試驗過程中，15% NaCl 組與 30% NaCl 組之鹽分含量於醱酵初期約 13% 及 23%，期間無顯著變化，故以 pH 值變化趨勢推測 15% NaCl 之醱酵條件較適合耐鹽性乳酸菌及酵母菌的生長。

Beddows *et al.* (1979) 指出魚醬油可溶性固形物 (soluble solid content) 主要來自蛋白質水解後釋放的游離胺基酸 (free amino acid, FAA) 及小分子肽，因此，可溶性固形物含量的高低，反映出醬油的品質差異，若可溶性固形物含量較低，則可能是製品釀造過程不佳所致。由 Fig. 1b 發現釀造 15 天內，四組魚醬油之可溶性固形物皆迅速增加，之後呈緩慢上升趨勢直至 75 天後下降，綜合結果顯示，魚醬油中固形物含量以 15% NaCl 組高於 30% NaCl 組，且皆以未添加耐鹽性微生物之處理組較佳。

(二) 總氮、甲醛態氮、氨態氮、及胺基態氮之變化

總氮 (total nitrogen, TN) 包含胺基態氮及非胺基態氮，其中胺基態氮是以甲醛態氮扣除氨態氮所得，而這些測定指標皆與醬油品質有關 (莊, 2001)。醬油總氮量越高，代表原料的蛋白質含量越高，則醬油品質越好，等級也越高。如 Fig. 2 所示，四組魚醬油製品之總氮量隨醱酵時間而漸增加，於醱酵至 45 天內快速增加並於 60 天達

最高值後再呈緩慢下降之趨勢，其中以 15% NaCl 組 (LSC、LSM) 之總氮量較高，此可能與豆麥麴的蛋白酶活性有關，當醬醪食鹽濃度高於 20% 時，抑制麴菌之酵素活性 (Trang *et al.*, 2005)，也降低對蛋白質的利用率，進而減少總氮溶出率，導致 30% NaCl (HSC、HSM) 製品之總氮含量比 15% 處理組低。

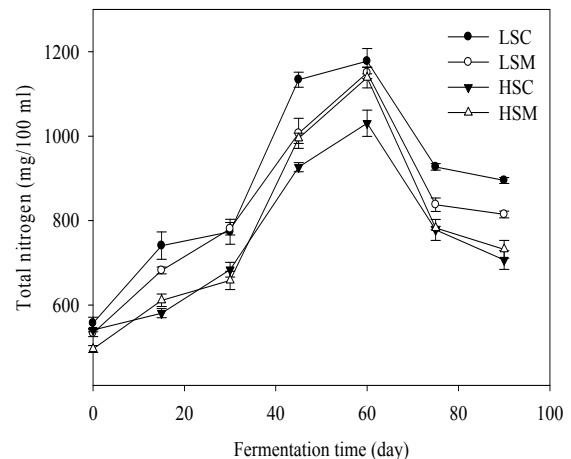


Fig. 2 Changes in total nitrogen (mg/100 ml) of fish sauce samples produced from yellowfin tuna dark muscle with different salt concentrations and halophilus microorganism during fermentation for 90 days.

魚醬油中的甲醛態氮是代表所有含有胺基的化合物；而氨態氮則表示肽分解產生之游離胺基酸或揮發性氮類 (Chaveesuk *et al.*, 1994; Lopetcharat *et al.*, 2001)，係以 NH_3 或 NH_4^+ 狀態存在之氮，由各種胺類 (Amines) 及 NH_3 所構成，當氨態氮含量過高時，代表發酵過程可能遭受腐敗菌之污染 (黃, 2010)。由 Fig. 3a 與 Fig. 3b 顯示，甲醛態氮及氨態氮於醱酵 15 天內呈快速增加，之後上升的幅度趨緩，且至 60 天後開始下降，其中又以 15% NaCl 組之魚醬油，明顯高於 30% NaCl 處理組，推測原因為魚醬油製品鹽濃度低於 16% 以下，較容易因微生物 (如醋酸菌等) 的生長旺盛而產生腐敗物質 (闕和鄧, 1976)。

從 Fig. 4 之結果得知，胺基態氮含量之變化與甲醛態氮相似，四組魚醬油之胺基態氮在釀造 15 天內生成最迅速，之後趨於平緩，此與初期下缸釀造時蛋白酶作用有關，造成胺基態氮大幅增加，之後隨著醱酵時間之增長，醬醪中蛋白酶活

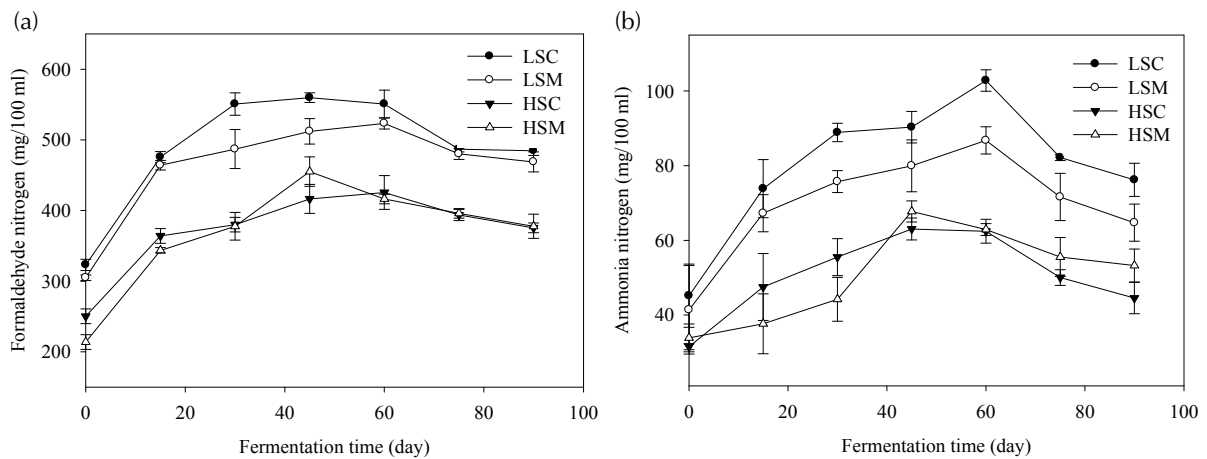


Fig. 3 Changes in (a) formaldehyde nitrogen (mg/100 ml) and (b) ammonia nitrogen (mg/100 ml) of fish sauce samples produced from yellowfin tuna dark muscle with different salt concentrations and halophilus microorganism during fermentation for 90 days.

性逐漸降低，其胺基態氮之增幅也漸趨平緩 (闕和鄧, 1976)。

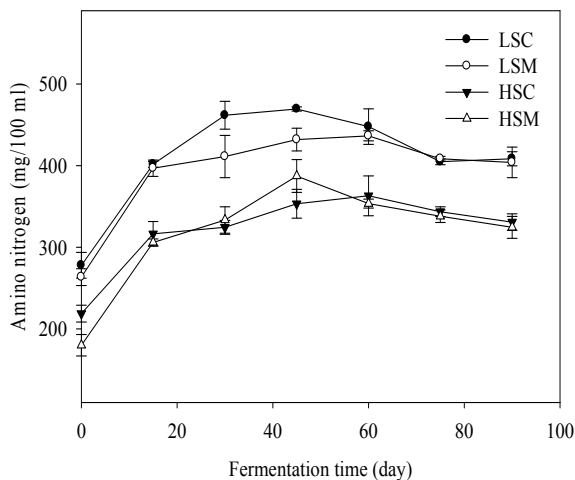


Fig. 4 Changes in amino nitrogen (mg/100 ml) of fish sauce samples produced from yellowfin tuna dark muscle with different salt concentrations and halophilus microorganism during fermentation for 90 days.

四組魚醬油於醱酵 45 - 60 天時其胺基態氮達最大值，其中又以 15% NaCl 魚醬油組含有較多的胺基態氮，推測 15% NaCl 較有利於麴菌蛋白酶作用，以分解蛋白質產生較多的游離胺基酸，因而呈現較高的胺基態氮量。此外 Besas and Dizon (2012) 亦指出水解液中胺基態氮濃度的增加，與蛋白質分解後產生的胺基酸有關。

根據 CAC 制訂之魚醬油標準，其總氮含量需高於 10 g/L，胺基態氮不得低於總氮量的 40%，亦即不得低於 400 mg/100 ml。就上述試驗結果而言，醱酵 60 天時，其總氮與胺基態氮含量以 15% NaCl 組之製品符合 CAC 魚醬油之標準。

(三) L, a, b 值

Figure 5 顯示，四組魚醬油亮度 L 值皆隨著醱酵時間，呈下降趨勢，而紅色度 a 值和黃色度 b 值則逐漸增加。醱酵期間紅褐色之產生係麴菌產生的酵素，分解原料中澱粉後產生還原糖，經由梅納反應 (Maillard reaction) 產生如類黑色素 (melanoidins)，使製品褐變程度增加所致 (Ames, 1992; Takeshima *et al.*, 2001)。Yaylayan *et al.* (1992) 也指出食物中的還原糖、胺基酸、或蛋白質，經加熱後發生褐變反應並產生類黑色素。試驗中四組製品之色澤皆呈澄清琥珀色，然不同鹽濃度及有無添加耐鹽性微生物對製品色澤無顯著差異，因此推測魚醬油的琥珀色主要係由水解液中酵素失活所進行之高溫加熱處理所致。

(四) VBN 和 TMA 之變化

四組魚醬油製品之 VBN 和 TMA 含量隨著醱酵時間延長而增加，釀造初期 15% NaCl 組

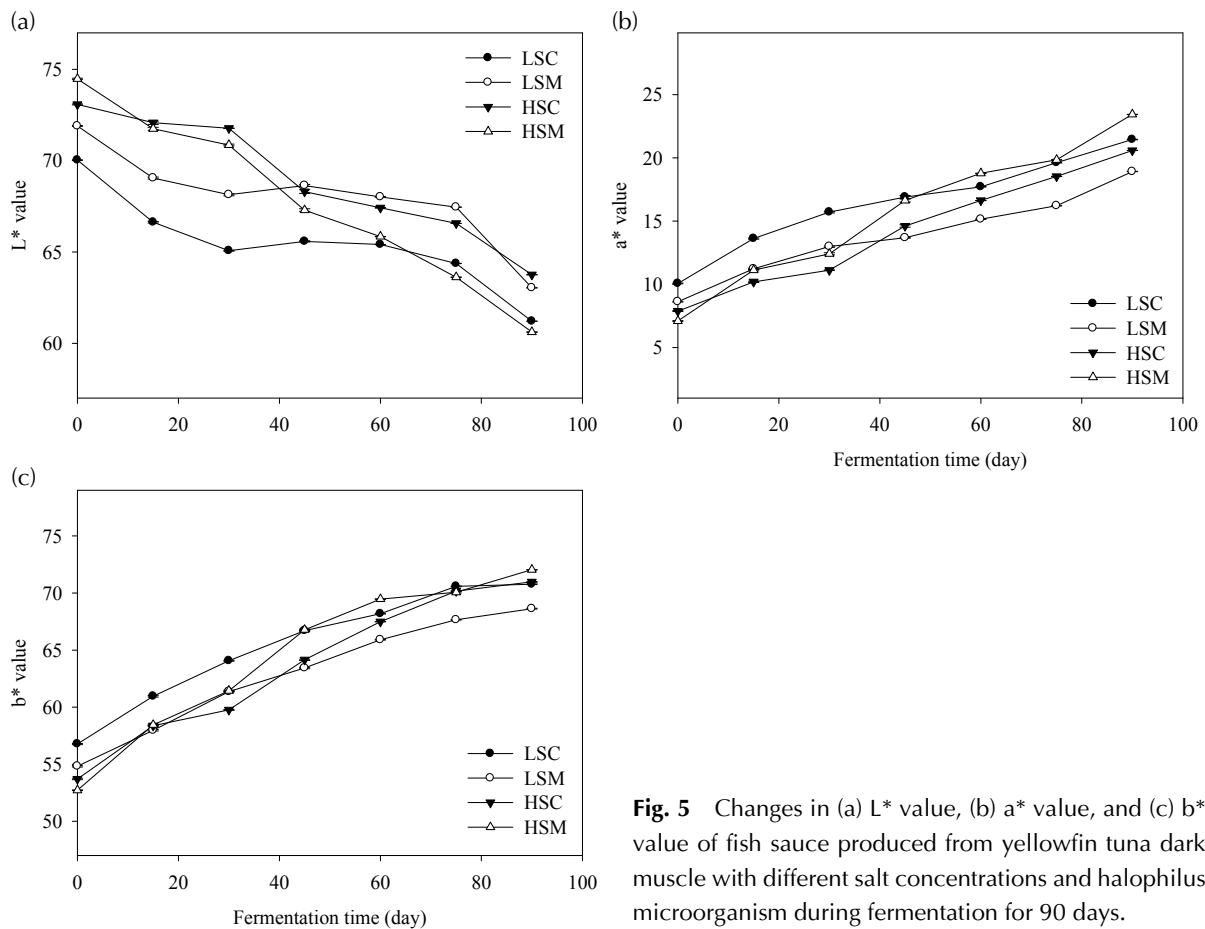


Fig. 5 Changes in (a) L* value, (b) a* value, and (c) b* value of fish sauce produced from yellowfin tuna dark muscle with different salt concentrations and halophilus microorganism during fermentation for 90 days.

與 30% NaCl 組之 VBN 含量相近，為 34.3 - 43.6 mg/100 ml (Fig. 6)；醱酵 15 天後，15% NaCl 組產生高量 VBN 達 81.3 - 86.7 mg/100 ml，而 30% NaCl 組則可明顯抑制 VBN 之生成，其量為 51.2 - 53.4 mg/100 ml。另於 90 天醱酵終點，15% NaCl 組之 VBN 高達 109 - 114 mg/100 ml；30% NaCl 組則為 64.7 - 66.3 mg/100 ml，顯示 15% NaCl 組之魚醬油製品其 VBN 含量遠高於 30% NaCl 組，此結果與 Besas and Dizon (2012) 指出黃鰭鮪內臟醱酵製品其 VBN 含量隨著鹽濃度降低而提升的研究相似。

釀造初期四組製品 TMA 含量相近，為 3.12 - 3.29 mg/100 ml，醱酵 15 天後 15% NaCl 組之 TMA 增至 4.67 - 4.93 mg/100 ml，30% NaCl 組則略升至 3.29 - 3.63 mg/100 ml，之後皆呈逐漸下降之趨勢。於醱酵後期，則無論 15% 和 30% NaCl 組皆略增至 4.50 與 3.81 - 3.89 mg/100 ml，其中以 15% NaCl 組較高。

VBN 及 TMA 為魚腥味之指標，法規限量標準值分別為 50 mg/100 g 及 6 mg/100 g (卓, 2006)。以醱酵終點 90 天而論，四組製品之 VBN 含量皆超過 50 mg/100 g，但 TMA 含量則低於 6 mg/100 g 之標準值。藤井與戶沢 (1980) 分析菲律賓之魚醬油中鹽分含量達 29.1%；VBN 為 151 mg/100 ml；TMA 為 14.9 mg/100 ml，由此可見 VBN 及 TMA 含量不適合做為魚醬油品質之品質指標，因為製程中添加豆麥麴與耐鹽性微生物，其本身含蛋白質同時也於釀造期間發酵原料產生胺類化合物，而增加 VBN 及 TMA 含量。

(五) 組織胺之變化

四組魚醬油之組織胺含量於釀造期間變化如 Table 3 所示，30% NaCl 組之組織胺在醱酵期間皆未檢出。15% NaCl 組之組織胺量隨釀造

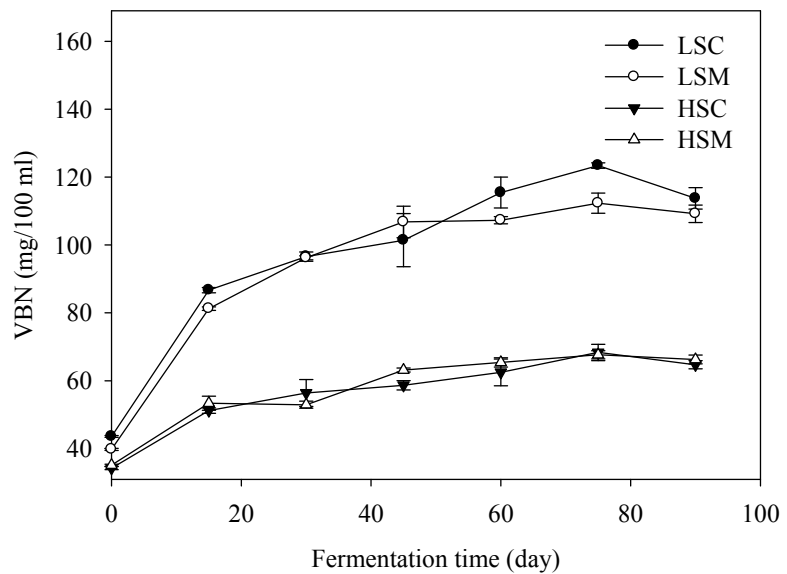


Fig. 6 Changes in volatile basic nitrogen (VBN) content (mg/100 ml) of fish sauce samples produced from yellowfin tuna dark muscle with different salt concentrations and halophilus microorganism during fermentation for 90 days.

Table 3 Changes in histamine content (mg/100 g) of fish sauce produced from yellowfin tuna dark muscle with different salt concentrations and halophilus microorganism during fermentation for 90 days

Fermentation day	15% NaCl		30% NaCl	
	LSC	LSM	HSC	HSM
0	- ¹	-	-	-
30	7.82 ± 0.25 ^{cB}	8.53 ± 0.08 ^{cA}	-	-
60	19.02 ± 1.06 ^{aA}	20.25 ± 0.77 ^{aA}	-	-
90	12.39 ± 0.02 ^{bB}	16.54 ± 0.30 ^{bA}	-	-

¹Not detectable.

Means followed by the same superscript within each row (A-C) are not significantly different ($p < 0.05$)

Means followed by the same superscript within each column (a-c) are not significantly different ($p < 0.05$)

日數而呈現先增再減的趨勢，於釀造 30 天時為 7.82 - 8.53 mg/100 g，60 天時達最高值 (19.02 - 20.25 mg/100 g)，而醱酵終點則降為 12.39 - 16.54 mg/100 g，但仍低於加拿大 (20 mg/100 g)、CAC (40 mg/100 g) 及泰國 (50 mg/100 g) 對魚醬油中組織胺之限量規定。Besas and Dizon (2012) 研究以黃鰭鮪內臟於室溫下醱酵 7 天，探討 10%、17.5%、25% 不同鹽濃度對組織胺形成之影響，發現組織胺含量隨鹽濃度之增加而降低，當鹽濃度為 10% 時，其組織胺含量高於美國 FDA (50 ppm) 之限量標準，反之當鹽濃度大於 17% 時，則抑制組織胺之產生。

另外 Udomsil *et al.* (2011) 研究鯷魚醬油接種 10% *T. halophilus* 菌醱，醱酵 180 天能降低

製品生物胺含量。Shozen *et al.* (2012) 以柳葉魚全魚混合大豆麩、蔗糖與 *T. halophilus* 釀造魚醬油，經 224 天醱酵後可抑制組織胺蓄積。但本研究接種耐鹽性微生物之組別其組織胺含量並未顯著減少降，推測可能與微生物接種量有關。故為提升魚醬油製品之安全性，未來可朝向增加耐鹽性微生物之接種量或於製程中添加營養源(如蔗糖)，以促進 *T. halophilus* 生長進而抑制組織胺生成來探討。

結 論

黃鰭鮪血合肉添加酵素水解者之胜肽含量高於自家消化組和控制組，其中又以添加酵素

0.25% Alcalase 分解 2 hr 再施以 0.5% Flavourzyme 分解 4 hr 之水解液,其胜肽量之增加最為顯著,且 VBN 值低於品質限量標準 25 mg/100 g。調整血合肉水解液之鹽度分為 15% 及 30% 後,再接種 10% 豆麥麴和添加耐鹽性微生物,於 35°C 下醱酵 90 天,魚醬油之 L 值降低、a、b 值增加、pH 值下降。另總氮、胺基態氮量以 15% 鹽度的水解液醱酵 60 天最高,且符合 CAC 魚醬油總氮與胺基態氮之標準。魚醬油中 VBN 和 TMA 隨醱酵時間而增加,但組織胺仍低於魚醬油之限量標準。醱酵期間添加耐鹽性微生物,對魚醬油之品質並無顯著影響。綜合以上結果,黃鰭鮪血合肉釀製魚醬油具可行性,其較適製造條件為:血合肉以兩段式蛋白酵素水解 (A2F4; 0.25% Alcalase 分解 2 hr; 再以 0.5% Flavourzyme 分解 4 hr) 之水解液,調整鹽濃度為 15% NaCl 並接種 10% 豆麥麴與 0.5% 耐鹽性微生物,於 37°C 醱酵 60 天。

參考文獻

- 王健銘 (2012) 添加茶葉對釀造醬油品質之影響. 國立臺灣海洋大學食品科學系 碩士論文, 基隆, 臺灣, 17-22.
- 卓雅怡 (2006) 鯖魚罐頭蒸煮液作為粉末調味料基質與魚醬油之探討. 國立臺灣海洋大學食品科學系 碩士論文, 基隆, 臺灣, 60-62, 67.
- 林泗潭, 林志誠 (1990) 罐頭製造業. 臺灣水產加工業現況專輯, 臺灣省漁業局.
- 邱秋霞, 謝寶全, 郭嘉信 (2007) 醱酵生產技術實習. 國立屏東科技大學.
- 莊朝凱 (2001) 添加鮪魚蒸煮汁試製魚醬油可行性之評估. 國立中興大學食品科學系 碩士論文, 台中, 臺灣, p. 62-70.
- 許鼎輝, 陳欽明 (1975) 甲醛用量對醬油中 Formal nitrogen 檢出之影響. 食品科學, 2: 39-40.
- 黃子瑜 (2010) 秋刀魚魚肉水解液之製備及應用. 國立高雄海洋科技大學水產食品科學系 碩士論文, 高雄, 臺灣, 20-23, 52.
- 漁業署 (2014) 中華民國台灣地區漁業年報. 行政院農業委員會漁業署.
- 標準檢驗局 (1997) 冷凍魚類檢驗法. 國家標準總號 1451, 類號 N 6029.
- 標準檢驗局 (2002) 醬油. 國家標準總號 423, 類號 N 5006.
- 闕文仁, 鄧世正 (1976) 實用醬油釀造學. 環宇出版社, 臺北, 86-88.
- 藤井建夫, 戸沢晴巳 (1980). フィリピン産魚醬油の化学組成および微生物相. 日本水産学会誌, 46: 1235-1240.
- A.O.A.C. (1998) Official Methods of Analysis (16th Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
- A.O.A.C. (2000) Official Methods of Analysis (17th Ed.). Association of Official Analytical Chemists, International, Maryland, USA.
- Ames, J. M. (1992) The Maillard reaction. *In Biochemistry of Food Proteins*, Elsevier Applied Science, Springer US, London, 99-153.
- Aristotelis, T. H., K. D. T. Anthony and J. M. Anne (2011) A study of the enzymatic hydrolysis of fish frames using model systems. *Food Nutri. Sci.*, 2: 575-585.
- Beddows, C. G., A. G. Ardeshir and W. J. B. Daud (1979) Biochemical changes occurring during the manufacture of Budu. *J. Sci. Food Agri.*, 30: 1097-1103.
- Besas, J. R. and E. I. Dizon (2012) Influence of salt concentration on histamine formation in fermented tuna viscera (*Dayok*). *Food Nutri. Sci.*, 3: 201-206.
- Brillantes, S. and W. Samosorn (2001) Determination of histamine in fish sauce from Thailand using a solid phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Fish Sci.*, 67: 1163-1168.
- Chaveesuk, R., J., P. Smith and B. K. Simpson (1994) Production of fish sauce and acceleration of sauce fermentation using proteolytic enzymes. *J. Aqua. Food Prod. Technol.*, 2: 59-77.
- Church, F. C., H. E. Swaisgood, D. H. Porter and G. L. Catignani (1983) Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 66: 1219-1227.
- Codex Alimentarius Commission (CAC) (2011) Standard for fish sauce. *Codex Stan*, 302-2011.
- Hasagawa, H. (1987) Laboratory manual on analytical methods and procedures for fish and fish products. Marine Fisheries Research Department, Southeast Asian Fisheries Development Center (SEAFDEC), Singapore.
- Konosu, S. and K. Yamaguchi (1982) The flavor components in fish and shellfish. *In Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products* (R. E. Martin, G. J. Flick and D. R. Ward eds.), AVI Publishing, New York, 367-372.
- Konosu, S., K. Watanabe and T. Shimizu (1974) Distribution of nitrogenous constituents in the muscle extracts of eight species of fish. *Bull. Jap.*

- Soc. Sci. Fish, 40: 909-914.
- Lopetcharat, K., Y. J. Choi, J. W. Park and M. A. Daeschel (2001) Fish sauce products and manufacturing: a review. *Food Res. Intl.*, 17: 65-88.
- Sanchez, P. C. (2008) Philippine fermented foods: principles and technology. The University of the Philippines Press, Quezon City.
- Shozen, K. I., M. Satomi, Y. Yano, M. Yoshida, Y. Fukui, T. Takano and Y. Funatsu (2012) Effect of sucrose and halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* on chemical characteristics and microbial proliferation during fish sauce fermentation. *J. Food Safety*, 32: 389-398.
- Sikorski, Z. E., A. Kolakowska, and J. R. Burt (1990) Postharvest biochemical and microbial changes. *In* Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation, 55-76.
- Takeshima, F., Y. Nabeshima, Y. Funatsu and K. Kawasaki (2001) Development of fish sauce produced from sexually matured chum salmon. *Bull. Toyama Food Res. Inst.*, 4: 1-8.
- Trang, N. H., Shimada, K., Sekikawa, M., Ono, T., & Mikami, M. (2005) Fermentation of meat with koji and commercial enzymes, and properties of its extract. *J. Sci. Food Agr.*, 85: 1829-1837.
- Udomsil, N., S. Rodtong, Y. J. Choi, Y. Hua and J. Yongsawatdigul (2011) Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. *J. Agr. Food Chem.*, 59: 8401-8408.
- Yaylayan, V. A., J. Fichtali and F. R. van de Voort (1992) Production of Maillard reaction flavour precursors by extrusion processing. *Food Res. Intl.*, 25: 175-180.
- Yoshikawa, S., H. Kurihara, Y. Kawai, K. Yamazaki, A. Tanaka, T. Nishikiori and T. Ohta (2010) Effect of halotolerant starter microorganisms on chemical characteristics of fermented chum salmon (*Oncorhynchus keta*) sauce. *J. Sci. Food Agr.*, 58: 6410-6417.

Studies on the Preparation of Fish Sauce from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Dark Muscle By-product

Ko-Liang Kuo¹, Han-Ting Yang², Chyuan-Yuan Shiau² and Huey-Jine Chai^{1*}

¹Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

²Department of Food Science, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

To increase the added value of tuna dark muscle by-product by altering its inclusion in fish sauce, the by-product was hydrolyzed as a raw material and then fermented with soy-wheat koji and salt-tolerant microorganisms. Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) contains 64.34% moisture, 16.89% protein, 12.62% fat, and 0.92% ash. In this study, 3 volumes (v/w) of distilled water were added to tuna dark muscle through autolysis or enzymatic hydrolysis with the protease (alcalase and flavourzyme), and then hydrolyzed for 4 or 6 hours, respectively. The enzymatic hydrolysis group had much higher peptide levels than the autolysis and control groups did; the alcalase 2 and flavourzyme 4 (A2F4) hydrolysis group demonstrated the greatest increase. The volatile basic nitrogen (VBN), trimethylamine (TMA), and hydrolysis ratio of autolysis or enzymatic hydrolysis are higher than the control group, and A2F4 was the highest. The VBN levels in all the groups were lower than the aquatic product quality limit standard of 25 mg/100 g. According to these results, the A2F4 hydrolysate produced using two-stage complex enzymes can greatly improve taste and functional components such as amino acids and peptides. Thus, this hydrolysate was selected as a raw material for the further fermentation of fish sauce. The salinity of the hydrolysate from the dark muscle was adjusted to 15% and 30%, the hydrolysate was inoculated with 10% soy-wheat koji, and then salt-tolerant microorganisms were added for fermentation at 35 °C for 90 days. The results showed that with prolonged brewing, the L values of the four fish sauces decreased, but the a and b values increased. The pH value slowly declined, and no significant change was observed in salt content. Furthermore, the VBN and TMA values increased with fermentation time, while the soluble solid content increased rapidly until Day 15 and then increased slowly until Day 75. The total nitrogen and amino nitrogen contents increased gradually until Day 60 and then decreased slowly thereafter. The total nitrogen and amino nitrogen of the 15% NaCl product met the fish sauce standards of the Codex Alimentarius Commission (CAC). Overall, the 15% NaCl fish sauce contained a higher amount of total nitrogen and amino nitrogen than did the 30% NaCl product. The histamine contents of the four products were lower than the 40 mg/100 g CAC standard. The addition of salt-tolerant microorganisms during fermentation showed no significant effect on the quality of the fish sauce products. The results revealed that inoculation with soy-wheat koji is a feasible method for making fish sauce from tuna dark muscle by-product.

Key words: *Thunnus albacares*, dark muscle, enzyme, fermentation, fish sauce

*Correspondence: 199 Hou-lh Road, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02)2462-2845 ; FAX: (02)2462-3306; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw