

乳酸菌發酵吳郭魚肉漿之抗氧化活性探討

陳玉真¹·吳建威¹·吳純衡¹·潘崇良^{2*}

¹行政院農業委員會水產試驗所 水產加工組

²國立台灣海洋大學 食品科學系

摘要

將吳郭魚肉漿分別以添加 *Pediococcus (Ped.) pentosaceus* MFL、MFS 及 *Lactobacillus (Lb.) plantarum* BCRC12250 三株乳酸菌混合搭配之菌醃及未添加菌種者進行發酵，24 hr 之後，添加乳酸菌醃組之 pH 值急速下降至 4.6 以下，其乳酸菌菌數可達至 8.30~8.85 log CFU/g，成為發酵吳郭魚食品中之優勢菌種，可抑制吳郭魚食品中雜菌生長。抗氧化試驗方面，以 MFL+MFS 及 MFL+MFS+12250 發酵之吳郭魚肉漿的萃取液 (50 mg/mL)，其清除 DPPH 自由基的能力均優於未經發酵之控制組 (40.12%) 及自然發酵之對照組 (75.83%)，分別達 94.93% 及 95.42%。在螯合亞鐵能力方面，二個實驗組的表現雖不及控制組 (98.86%) 與對照組 (96.30%)，但亦分別有 90.69% (MFL+MFS) 及 68.17% (MFL+MFS+12250) 的螯合能力。抑制血紅素催化亞麻油酸自氧化能力，MFL+MFS 之組合可達 81.44%，表現較為顯著；MFL+MFS+12250 組次之 (71.44%)，而控制組 (41.73%) 與對照組 (68.33%) 較差。在還原力方面亦有相同情形，添加乳酸菌菌醃組合之還原力仍有 $A_{700nm} = 0.85$ 。綜合上述，在抗氧化能力上，添加乳酸菌之實驗組的表現較均自然發酵之對照組及未經發酵之控制組為佳。

關鍵詞：乳酸菌、發酵、抗氧化活性、吳郭魚

前言

吳郭魚 (*Oreochromis hybrids*, Tilapia) 為台灣重要的養殖魚類，肉質鮮美，消費方式除少部分以生魚片方式外銷日本外，國內市場大都以生鮮銷售為主。近年來新型態之吳郭魚加工產品較缺乏，而未能吸引消費者購買與食用，若能有效利用吳郭魚加工成高附加價值或多種新型態之產品如魚漿製品、發酵產品、蛋白質濃縮物等，不但可拓展國內外的銷售市場，並提供豐富蛋白質之便利食品 (Venugopal and Shahidi, 1995)，因為吳郭魚肉質鮮美、細刺少、富含蛋白質，且價格低廉，是鮮食或水產加工的良好材料之一 (柯，1998)。

乳酸菌和人類飲食生活關係密切且歷史悠久，如發酵乳、肉製品、蔬果製品等各種加工食品中，乳酸菌扮演重要角色，長久以來人類即會巧妙地利用乳酸發酵來保存食品或修飾食品風味 (蔡，1998)。迄今，乳酸菌屬已被公認為食品級之安全物質 (Generally recognized as safe, GRAS) (Ross *et al.*, 2002)，其中有些乳酸菌會產生的胞外黏性物質 (Extracellular adhesive substance, EAS)，大多屬於胞外多醣類 (Exopolysaccharide, EPS)，可應用於許多不同產品中，可提供增黏、穩定、膠化和乳化的特性，並可改善離水現象 (Syneresis) (Vuyst and Degeest, 1999)。此外有些乳酸菌尚能產生過氧化氫、雙乙醯、細菌素等以抑制食品腐敗菌或病原菌生長之產物，故能延長產品的儲存期限 (Gibbs, 1987)。乳酸菌及製成發酵乳後的抗氧化性做一研究，發現乳酸菌本身及其發酵乳均具有清除超氧陰離子的能力，同時也能抑制脂質過氧化物的產生，乳酸菌能抑制脂質過

*通訊作者 / 基隆市北寧路二號, TEL: (02) 2462-2192
轉 5116; FAX: (02) 2463-1070; E-mail: B0037@mail.ntou.edu.tw

氧化物的發生可能來自於其具有清除超氧陰離子和螯合亞鐵離子的能力 (Ahotupa *et al.*, 1996)。

潘等 (2000) 自新竹食品工業研究所菌種保存中心購得之 20 株乳酸菌中，篩選出四株產 EAS 乳酸菌並接種至吳郭魚肉漿中進行發酵，發酵 12 hr 後 pH 值即由 6.1 下降至 4.5-4.9，發現這些乳酸菌的添加有抑制吳郭魚肉漿中雜菌生長之作用，其中以添加 *Lactobacillus (Lb.) plantarum* BCRC12250 之吳郭魚發酵肉漿經 24 hr 發酵之後具有較佳膠強度且可減緩揮發性鹽基態氮含量的增加，於發酵 36 hr 後仍在新鮮的標準範圍內 (< 25 mg/100 g)。潘等 (2000) 經由豬肉製品篩選分離 *Pediococcus (Ped.) pentosaceus* MFL 與 *Ped. pentosaceus* MFS 二株乳酸菌，並做為發酵菌醃，可有效抑制發酵與貯藏過程中該吳郭魚發酵製品可能產生腐敗菌及病原菌之生長。

本研究除了利用 *Lb. plantarum* BCRC12250、*Ped. Pentosaceus* MFL 及 *Ped. pentosaceus* MFS 等乳酸菌發酵來觀察吳郭魚肉漿在發酵過程中 pH 值、主要微生物菌相及游離胺基酸含量變化外，並針對該製品之抗氧化特性做一探討，以期利用乳酸菌發酵吳郭魚肉漿能製造出具有保健功能性的水產品，進而提升吳郭魚產品的附加價值。

材料與方法

一、材料

(一) 吳郭魚

購自基隆市仁愛市場，體長 25 ~ 30 cm，體重 600 ~ 800 g。

(二) 試驗菌株

Lactobacillus (Lb.) plantarum BCRC12250 購自新竹食品工業發展研究所 (Food Industry Research and Development Institute, FIRDI) 生物資源保存及研究中心 (Bioresources Collection and Research Center, BCRC)。*Pediococcus (Ped.) pentosaceus* MFL、*Ped. pentosaceus* MFS 由豬肉中篩出 (潘等，2000)。

試驗分為以下 4 組：

MFL + MFS：*Ped. pentosaceus* MFL 和 *Ped. pentosaceus* MFS

MFL + MFS +12250：*Ped. pentosaceus* MFL、*Ped. pentosaceus* MFS、*Lb. plantarum* BCRC12250

對照組 (Control)：未添加乳酸菌醃之自然發酵組
控制組 (Blank)：純吳郭魚肉漿

(三) 化學藥品

赤血鹽 (Potassium ferricyanide)、氯化鐵 (Ferric chloride)、六甲基四胺 (Hexamine)、硫酸銅 (Copper sulfate) 購自 Panreac 公司 (Panreac, Spain)。過硫酸鉀 (Potassium persulfate)、Folin-ciocalteus phenol reagent 購自默克公司 (Merck, Germany)。2,2-azono-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)、 α , α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH)、Tetramethyl murexide (TMM) 購自 Sigma 公司 (Sigma, USA)。

二、實驗方法

(一) 吳郭魚肉漿之製備與發酵

依據潘等 (2000) 之吳郭魚肉漿製法，自市場購得之活體吳郭魚，經採肉並以碎肉乳化機 (UM-12, Stephan, Germany) 於 26 °C 下高速運轉 2 min 細碎至肉漿狀。將製備好的吳郭魚肉漿添加 2% NaCl、1% Glucose、4% Sucrose、50% Distilled water 調勻，分別接種 1% MFL+MFS 及 MFL+MFS+12250 之混合發酵菌醃，接種濃度約為 10⁵ CFU/g，對照組則採自然發酵，不添加任何菌種。將樣品分別置入已滅菌之 1,000 mL 玻璃燒杯中，杯口以鋁箔覆蓋後，移入 37 °C、85% RH 之恆溫恆濕培養箱 (TC-120HD, Tungtec Instruments Co., LTD, Taiwan) 中進行發酵，培養 24 hr 後取出進行各項試驗。

(二) 主要微生物菌相之計數

微生物的計數以 Drop method 法 (DIN, 1984) 測定，首先分別秤取 10.0 g 實驗組及對照組至無菌拍打式均質袋中 (Stomacher 400 bags, Seward, London, U. K.)，加 90.0 mL 的稀釋液 (含 0.85% NaCl 與 0.1% agar 之生理食鹽水)，置於拍打式均

Table 1 Media and incubation conditions of selected testing microorganism

Microorganism	Medium	Culture condition	Origin
Aerobic bacteria	PCA Agar	37°C culture 48 hr	Plate Count Agar (Oxoid, CM325)
Lactic acid bacteria	MRS Agar	37°C culture 48 hr	Man Rogosa Sharpe (Oxoid, CM361)
Enterobacteriaceae	VRBD Agar	37°C anaerobic culture 48 hr	Violet-Red-Bile-Dextrose-Agar (Merck, No. 10275)
<i>Staphylococcus</i>	BPA Agar	37°C culture 48 hr	Baird Parker Agar (Merck, No. 5406)
<i>Pseudomonas</i>	GSP Agar	26°C culture 72 hr	<i>Pseudomonas-Aeromonas</i> -Selective-Agar-Base (Merck, No. 10230)

質機中 (Stomacher Model 400, Seward, London, England)，以中等速度均質 2 min 後，取 1.0 mL 均質液，以稀釋液做 10 倍連續稀釋，再取 0.05 mL 各稀釋倍數稀釋液，滴於已劃分四區域之選擇性培養基表面上，分別於各自最適培養溫度下培養 (Table 1)。另外，黴菌及酵母菌則參考 Mislivec *et al.* (1992) 之方法計數，取 10.0 g 實驗組及對照組與 90 mL 0.85% NaCl 之稀釋液混合，裝入無菌拍打式均質袋中，置於拍打式均質機中，以中等速度均質 2 min 後，取 1 mL 上層液經連續稀釋，塗抹於 Potato Dextrose Agar (PDA, Difco)，於 26 °C 下培養 48 hr。

(三) pH value 之測定

取上述之均質液以 pH 測定儀測定。

(四) 吳郭魚肉漿及發酵肉漿之游離胺基酸 (Free amino acid; FAA) 分析

1. 製備三氯醋酸 (Trichloroacetic acid, TCA) 抽出物

依照 Konosu *et al.* (1974) 方法，各取 10 g 實驗樣品於預冷之 7% TCA 中，以均質機均質 2 min 後，於 4 °C，5,000 x g 下離心 30 min，取上澄液，沈澱部份再加入 7% TCA 重複以上步驟操作二次，萃取全部所得之上澄液以 7% TCA 定容至 100 mL。取 40 mL TCA 抽出液於分液漏斗中，加入等體積之乙醚振盪處理去除 TCA，

重複上述步驟四次後，收集於濃縮瓶中，以真空濃縮機濃縮，所得之濃縮液以二次離子水定容至 25 mL，在 -20 °C 下保存，供作游離胺基酸分析用。

2. 分析游離胺基酸

取處理好之 TCA 抽出物 1 mL 以 0.02 N HCl 適當稀釋及 0.2 μm 濾膜過濾後，以胺基酸分析儀分析 (Hitachi L-8500 Amino Acid Analyzer, Japan) (Konosu *et al.*, 1974)。

(五) 抗氧化活性測定方法

1. 清除 α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力之測定

參考 Gyamfi *et al.* (1999) 方法，分別取 50 μL 之實驗組、對照組及控制組之冷水萃取液 (50 mg/mL)，加入 1 mL 0.1 mM 之 DPPH 溶液 (溶於 95% 酒精) 及 450 μL 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)，混合均勻後，置於室溫 (25 ~ 27 °C) 反應 30 min，空白組則與 50 μL 蒸餾水混合。以分光光度計測 OD_{517nm}，吸光值愈低即表示清除 DPPH 自由基能力愈強。分別計算各組之清除效應 (Scavenging effect) = [(空白組吸光值 - 樣品吸光值) / 空白組吸光值] x 100%。實驗中以濃度 100 ppm 維生素 C (L-ascorbic acid) 當作正對照組 (Positive control)。

2. 抑制血紅素催化亞麻油酸自氧化之測定

參考 Kuo *et al.* (1999) 方法並加以修飾, 取實驗組、對照組及控制組冷水萃取液 (50 mg/mL) 各 50 μ L, 加入 20 μ L 100 mM 之亞麻油酸與 0.3 mL 0.05 M 磷酸緩衝液 (含 0.04% Tween 20, pH 7.0), 置於 37 $^{\circ}$ C 下反應 3 min, 加入 50 μ L 現配 0.003% 的血紅素 (Hemoglobin, Hb), 置於 37 $^{\circ}$ C 下反應 10 min, 分別加入 5 mL 0.6% HCl-ethanol、現配 0.1 mL 0.02 M FeCl₂ 與 0.1 mL 30% NH₄SCN, 再置於 37 $^{\circ}$ C 下反應 5 min, 以分光光度計於 OD_{480 nm} 下測其吸光值, 實驗中以濃度 1000 ppm 維生素 E 做正對照組, 其表示方式如下:

抗氧化能力 (Antioxidant activity) = $[1-(As-Ao)/(Ah-Ao)] \times 100$

As: 樣品及 Hb 之吸光值。

Ao: 不含樣品及 Hb 之吸光值。

Ah: 不含樣品但含 Hb 之吸光值。

3. 螯合亞鐵離子能力之測定

參照 Dinis *et al.* (1994) 方法, 取 1 mL 的實驗組、對照組及控制組之冷水萃取液 (50 mg/mL), 加入 3.7 mL 的甲醇及 0.1 mL FeCl₂·4H₂O (2 mM), 反應 30 sec 後再加入 0.2 mL 的 Ferrozine (5 mM), 反應 10 min 後, 測 OD_{562nm}。實驗中以濃度 100 ppm EDTA 當做正對照組。吸光值越低表示樣品螯合亞鐵離子能力越強, 其表示方法如下:

螯合能力百分比 (Chelating effects %) = $[1-(\text{樣品之吸光值})/(\text{未添加樣品之控制組之吸光值})] \times 100$ 。

4. 還原力之測定

參照 Oyaizu (1988) 方法, 取 2 mL 之實驗組、對照組及控制組之冷水萃取液 (50 mg/mL), 加入 2 mL 之 0.2 M Phosphate buffer (pH 6.6) 及 2 mL 1% 赤血鹽 (Potassium ferricyanide), 於 50 $^{\circ}$ C 水浴 20 min 後迅速冷卻, 再加入 2 mL 10% Trichloroacetic acid 溶液變性後, 離心 (10,000 rpm, 10 min) 取上層液 2 mL, 加入 2 mL 蒸餾水及 0.4 mL 0.1% 氯化鐵 (Ferric chloride) 溶液混合均勻, 反應 10 min 後以分光光度計下測

OD_{700 nm} 其吸光值, 吸光值愈高代表還原力愈佳。實驗中以濃度 1,000 ppm 維生素 C 當作正對照組。

(六) 統計分析

實驗數據以 SAS (Statistical analysis system) 套裝 GLM (General linear model procedure) (SAS, 1999) 軟體作單向變異數分析 (One-way analysis of variance), 並以鄧肯式多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 測定各處理組間之差異, 顯著水準定在 0.05。

結果與討論

一、發酵期間 pH 值及主要微生物菌相的變化

添加 MFL + MFS 與 MFL + MFS + 12250 乳酸菌菌醃之二組實驗組, 置於 37 $^{\circ}$ C 下發酵 24 hr 後, 其 pH 值由 6.67 快速下降至 4.17 ~ 4.65。未添加菌醃之對照組在相同溫度下於自然發酵 12 hr 後, 其 pH 則僅下降至 6.08 (Table 2)。

由 Table 2 中發現經 24 hr 發酵後, 乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 菌數皆達到 8.00 ~ 8.85 log CFU/g; 好氣性生菌 (Aerobic bacteria) 菌數則在 24 hr 內由 4.90 log CFU/g 增殖至 8.48 ~ 8.85 log CFU/g, 與乳酸菌生長趨勢相當, 因此推斷吳郭魚肉漿發酵過程中, 以乳酸菌為優勢菌種。對照組經 24 hr 發酵後, 黴菌/酵母菌 (Mold/Yeast) 菌數為 6.90 log CFU/g、葡萄球菌屬 (*Staphylococci*) 7.70 log CFU/g、假單胞菌屬 (*Pseudomonas*) 7.85 log CFU/g 及腸內細菌科 (*Enterobacteriaceae*) 7.70 log CFU/g。實驗組經 24 hr 發酵後, 其 Mold/yeast 數為 3.30 log CFU/g、*Staphylococcus* 數 4.00 ~ 5.48 log CFU/g、*Pseudomonas* 數 3.30 ~ 5.48 log CFU/g、*Enterobacteriaceae* 數 2.38 ~ 3.57 CFU/g。由此可見乳酸菌於發酵 24 hr 後, 可有效抑制吳郭魚肉漿中 *Pseudomonas*、*Staphylococcus*、Mold/Yeast、及 *Enterobacteriaceae* 等菌屬之生長, 推測其原因可能是因為乳酸菌發酵過程中 pH 值下降, 不利於其他菌生長; 此外乳酸菌亦會產生乳酸或其他抑菌物質 (如細菌素) 來抑制這類微生物的生長

Table 2 The changes in pH value and microbial counts during 24 hr fermentation

	Fermentation Time (hr)	pH value	Microbial counts (log CFU/g)*					
			APC	LAB	<i>Pseudo.</i>	M/Y	<i>Entero.</i>	<i>Staph.</i>
MFL + MFS	0	6.67±0.01 ^a	5.16±0.02 ^g	5.15±0.01 ^h	4.70±0.02 ^d	<2.00±0.00 ^e	3.95±0.04 ^e	4.66±0.02 ^d
	12	4.96±0.01 ^d	7.60±0.01 ^e	7.79±0.01 ^f	4.56±0.02 ^e	<2.00±0.00 ^e	<2.00±0.02 ⁱ	4.50±0.01 ^f
	24	4.65±0.01 ^e	8.48±0.01 ^d	8.60±0.01 ^b	5.48±0.01 ^c	3.30±0.03 ^d	3.48±0.03 ^g	5.48±0.02 ^c
MFL+ MFS+ 12250	0	6.32±0.01 ^b	6.57±0.01 ^f	6.19±0.02 ^g	3.70±0.02 ⁱ	<2.00±0.00 ^e	4.38±0.01 ^c	4.11±0.03 ^h
	12	4.67±0.03 ^e	8.85±0.01 ^a	8.30±0.01 ^c	4.00±0.01 ^h	4.26±0.04 ^c	4.00±0.03 ^d	4.56±0.01 ^e
	24	4.17±0.02 ^f	8.70±0.02 ^b	8.85±0.02 ^a	4.18±0.02 ^g	<2.00±0.00 ^e	3.00±0.02 ^h	4.32±0.01 ^g
Control	0	6.59±0.02 ^a	4.90±0.02 ^h	4.48±0.01 ⁱ	4.41±0.01 ^f	<2.00±0.00 ^e	3.78±0.01 ^f	4.32±0.02 ^g
	12	6.08±0.01 ^c	8.60±0.02 ^c	8.20±0.02 ^d	6.18±0.01 ^b	6.48±0.03 ^b	6.70±0.02 ^b	7.85±0.01 ^a
	24	5.00±0.01 ^d	8.48±0.02 ^d	8.04±0.01 ^e	7.85±0.01 ^a	6.90±0.04 ^a	7.70±0.01 ^a	7.70±0.02 ^b

*LAB: lactic acid bacteria; APC: aerobic bacteria; *Pseudo.*: *Pseudomonas*; M/Y: Mold/Yeast; *Entero.*: *Enterobacteriaceae*; *Staph.*: *Staphylococcus*. Values in this table are mean ± SD from 3 replicates; value with different superscripts alphabet in the same column differ significantly against fermentation time ($p < 0.05$).

所致。實驗結果與 Yin and Jiang (2001) 及 Yin *et al.* (2002) 利用乳酸菌做為發酵菌醃發現可有效抑制 *Pseudomonas*、*Staphylococcus*、Mold/Yeast、及 *Enterobacteriaceae* 等菌屬之生長吻合。Sakhare and Narasimha (2003) 更進一步測試分別添加 5 log CFU/g *Salmonella (Sal.) typhimurium*、*Staphylococcus (S.) aureus* 及 *Escherichia (E.) coli* 之病原菌於 37 °C、碎攪肉乳酸發酵製品中，由結果顯示在發酵進行中，乳酸菌發酵能夠很明顯抑制 *Sal. typhimurium*、*S. aureus* 及 *E. coli* 生長，且乳酸菌在發酵期間急速的生長與增殖造成大量有機酸（如乳酸與醋酸等）的產生與 pH 值的下降，此對抑制食品中不良微生物於發酵及貯藏期間的增殖與生長及毒素之產生具有重要的意義（黃，1995）。

二、發酵期間游離胺基酸之變化

由 Table 3 得知控制組、2 組吳郭魚乳酸菌發酵實驗組及未種菌吳郭魚發酵對照組等 4 組樣品之游離胺基酸變化情形，吳郭魚肉經乳酸菌發酵後產生許多甜味胺基酸，如 Glycine、Alanine、Leucine、Valine、Serine、Threonine、Aspartic acid、Glutamic acid 及 Methionine，以及具有加強呈味效果之 Arginine 等這些含量皆高於控制組。而吳郭魚肉漿經發酵 24 hr 後，麩胺酸含量均可被檢測出，尤其以 MFL + MFS 組發酵 24 hr 後，其含量可高達至 155.53 mg/100 g (Table 3)。以麩胺酸鈉 (Monosodium glutamate, MSG) 及肌昔酸 (Inosine monophosphate, IMP)、鳥嘌呤核苷單磷酸 (Guanosine monophosphate, GMP) 等核苷酸鈉鹽

Table 3 The changes in free amino acid (mg/100 g) of tilapia meat with and without fermentation

Free amino acid	Blank	Starter		Control
		MFL+MFS	MFL+MFS+12250	
Taurine	37.75	34.69	23.19	49.13
Urea	–	–	–	–
Aspartic acid	3.97	3.97	9.44	–
Threonine	5.72	4.53	8.48	5.03
Serine	2.19	–	–	3.19
Glutamic acid	138.06	155.53	81.78	23.75
α -amino adipic acid	–	–	–	–
Glycine	80.75	73.69	48.28	94.97
Alanine	22.97	19.28	13.97	11.16
Citrulline	–	–	–	3.34
α -amino-n-butyric acid	–	–	–	–
Valine	5.25	7.38	3.66	11.16
Cystine	2.84	3.50	5.78	3.38
Methionine	–	2.69	2.66	6.88
Isoleucine	–	1.84	–	4.44
Leucine	7.13	5.38	4.44	13.31
Tyrosine	2.53	2.81	–	–
Phenylalanine	4.84	4.41	–	5.69
β -Alanine	32.59	1.66	69.47	15.47
γ -Amino butyric acid	1.63	–	–	95.22
Ammonia	4.53	8.34	2.78	8.94
Ornithine	7.84	7.78	4.44	10.16
Lysine	11.41	8.66	6.69	13.59
Histidine	9.38	8.66	4.88	3.31
Carnosine	–	61.34	52.03	–
Arginine	–	–	–	–
Total	381.38	416.13	341.95	382.09

可表現出鮮味，鮮味並非本身即是鮮美的味道，而是鮮味的成分具有提高美味的作用，所有的魚介類都含有麩胺酸，只是含量大多低於 MSG 的閾值 (Threshold) 0.03% (吳和邱，1996)，而吳郭魚肉經發酵 24 hr 後，麩胺酸含量均高於對照組數倍，由此顯見經乳酸菌發酵時，游離胺基酸含

量增加，有助於風味的改善或提升 (Kato *et al.*, 1990)。Yin *et al.* (2002) 添加不同菌屬 *Lb. plantarum* CCRC10069、*Lb. helveticus* CCRC14092 及 *Lactococcus (L.) lactis* subsp. *lactis* CCRC12315 之乳酸菌進行發酵鯖魚肉漿，結果發現發酵 72 hr 之後，乳酸發酵鯖魚肉漿之游離胺基酸明顯增

加。Yin *et al.* (2002) 認為這不只是自家消化的作用，可能也是由於魚肉發酵中乳酸菌菌株之代謝產生者，且游離胺基酸可以豐富的增加發酵鯖魚肉漿之風味。吳郭魚肉經乳酸菌醱發酵 24 hr 後之肌肽 (Carnosine, β -Alanyl-L-histidine) 的含量由發酵前未檢測出提高至 52.03 ~ 61.34 mg/100 g (Table 3)。

三、抗氧化能力

(一) 清除 DPPH 自由基之能力

探討未發酵之控制組及未添加菌醱對照組與 2 組吳郭魚乳酸菌發酵實驗組 (MFL + MFS 及 MFL + MFS + 12250) 等 4 組樣品之冷水萃取物 (50 mg/mL) 對 DPPH 自由基清除效應，結果發現 2 組實驗組之吳郭魚肉漿清除 DPPH 自由基能力較為顯著 (94.93 ~ 95.42%)，對照組次之 (75.83%)，而控制組表現則是最低 (40.12%) (Table 4)。

Table 4 Scavenging effect on DPPH free radicals

Sample	DPPH scavenged (%)**
Blank	40.12 ± 9.44 ^c
MFL+MFS	94.93 ± 0.74 ^a
MFL+MFS+12250	95.42 ± 0.56 ^a
Control	75.83 ± 4.58 ^b
Vitamin C (100 ppm)*	97.00 ± 1.73

*Vitamin C: positive control.

**Data were shown as the mean ± SD of three replicates. Data bearing different alphabetic superscript in the same column are significant different ($p < 0.05$).

本次實驗中正對照組抗壞血酸在濃度 100 ppm 時，其清除 DPPH 自由基之能力為 97.00%。Aruoma *et al.* (1989) 指出 Carnosine、Homocarnosine 及 Anserine 具有良好清除 Hydroxyl radical (OH) 之能力。Wade and Tucker (1998) 也提出 Anserine 與 Carnosine 具有清除 Hydroxyl radical 的能力，可藉此減少脂質過氧化作用的發生。由上述之結果可明瞭，2 組乳酸菌

發酵吳郭魚肉漿之 Carnosine 含量較對照組及控制組高 (Table 3)，因此 2 組乳酸菌醱對清除 DPPH 自由基能力較顯著。此外 Chen *et al.* (1998) 亦發現大豆蛋白水解物中 Histidine 相關胜肽具有清除 DPPH 自由基能力。Lin and Yen (1999) 證實部分乳酸菌屬具有清除羥基自由基之能力。Suetsuna *et al.* (2000) 利用分解牛奶中之酪蛋白 (Casein) 行成許多小分子胜肽 Glu-leu 與 Tyr-phe-tyr-pro-glu-leu 的衍生物具有抗氧化效果，由此顯示蛋白質水解物的抗氧化活性會與游離胺基酸和低分子量的胜肽有密切關係。

(二) 抑制血紅素 (Hemoglobin) 催化亞麻油酸自氧化能力之測定

Table 5 為本實驗各組樣品之冷水萃取物 (50 mg/mL) 對抑制血紅素催化亞麻油酸自氧化的變化。實驗結果顯示，2 組實驗組抑制血紅素催化亞麻油酸自氧化能力比對照組與控制組為佳，尤其以 MFL+MFS 組最為顯著 (81.44%)，而另一組添加乳酸菌醱組之抑制率達至 70.00% 以上，而控制組與對照組分別為 41.73% 與 68.33%。實驗結果顯示，當 Vitamin E 濃度為 1,000 ppm，其抑制率可達 99.77%。因吳郭魚經乳酸菌醱發酵後，會產生 Carnosine 含量為 52.03 ~ 61.34 mg/100 g，相對控制組與對照組並未偵測出 (Table 3)。Kansci *et al.* (1997) 指出 Carnosine 具抑制丙二醛 (Malonaldehyde) 生成能力，並隨著濃度增加而升高，Carnosine 具有抗氧化之主要作用部位應是組成中 Histidine 所含之 Imidazole group，具有螯合和捕捉因脂肪自氧化所產生的自由基之能力。此外 Yamaguchi *et al.* (1975) 亦指出雙胜肽中若有 Histidine 存在時，對亞麻油酸之自氧化具抑制能力，但抑制力之高低隨鍵結部位的不同而有所差異。Lin and Yen (1999) 證實 *Bifidobacterium (B.) longum* B6 與 15708 的胞內萃取物可抑制亞麻油酸過氧化反應發生，其每毫升的抑制率可達 30 ~ 40% 左右。由上述結果與文獻，推測本實驗發酵吳郭魚對亞麻油酸過氧化反應可能來自於因吳郭魚經乳酸菌醱發酵後，所產生的 Carnosine 以及一些雙胜肽所導致之抗氧化能力。

Table 5 The inhibition on hemoglobin catalysis in the oxidation of linoleic acid

Sample	Antioxidative activity (%)**
Blank	41.73 ± 0.89 ^d
MFL+MFS	81.44 ± 0.81 ^a
MFL+MFS+12250	71.44 ± 0.71 ^b
Control	68.33 ± 0.68 ^c
Vitamin E (1000 ppm)*	99.77 ± 0.78

*Vitamin E: positive control

**Data were shown as the mean ± SD of three replicates. Data bearing different alphabetic superscript in the same column are significant different ($p < 0.05$).

(三) 螯合亞鐵離子之測定

對螯合亞鐵離子能力之影響如 Table 6 所示，各組在 50 mg/mL 濃度下具有螯合亞鐵離子之能力，其中以 MFL+MFS 組之發酵吳郭魚肉漿其螯合能力可達 90.69%，與對照組 (96.30%) 及控制組 (98.86%) 之螯合表現無統計上差異，但卻顯著高於 MFL + MFS + 12250 組之乳酸菌醃發酵吳郭魚肉漿 (68.17%)。當以 EDTA 為標準品，結果顯示，在濃度為 100 ppm 時，其螯合鐵離子能力則為 84.49%。

Table 6 A chelating effect on ferrous ion

Sample*	Chelating effect (%)**
Blank	98.86 ± 0.87 ^a
MFL+MFS	90.69 ± 4.42 ^a
MFL+MFS+12250	68.17 ± 8.21 ^b
Control	96.30 ± 0.51 ^a
EDTA (100 ppm)*	84.49 ± 2.13

*EDTA: positive control

**Data were shown as the mean ± SD of three replicates. Data bearing different alphabetic superscript in the same column are significant different ($p < 0.05$).

Lin and Yen (1999) 發現 *Lb. acidophilus* 4356、*Lb. bulgaricus* 11842、*Streptococcus (Str.) thermophilus* 821 及 *B. longum* B6 等菌屬均有螯合

亞鐵與亞銅離子，清除羥基自由基之能力及抑制亞麻油酸過氧化反應之發生，並具有極高還原能力。殷 (2003) 以 *Lb. lactis subsp. lactis* CCRC 12315、*Lb. plantarum* CCRC 10069 及 *Lb. helveticus* CCRC 14092 混合鯖魚發酵 24 hr 後之肉漿螯合亞鐵能力達到 90% 以上，作者認為鯖魚肉經乳酸菌發酵後產生甲肌肽 (Anserine)、Carnosine 及總游離胺基酸的含量增加，是可能促進抗氧化能力的原因。然而本實驗結果顯示 MFL + MFS 組的總游離胺基酸及其中的 Carnosine 上升，但螯合鐵能力的結果與控制組並無顯著差異，因此總游離胺基酸或 Carnosine 對螯合亞鐵的影響仍有待商榷。

(四) 還原力之測定

對還原力之影響方面如 Table 7 所示，控制組與對照組之還原力表現以吸光值 OD_{700 nm} 表示 0.9 以上，而 2 組實驗組之吸光值卻只有 0.85。因此發現添加乳酸菌醃之發酵吳郭魚肉漿未提升還原力表現。以抗壞血酸為標準品，當濃度為 1,000 ppm 時，其還原能力會達 1.17。林 (1999) 對照還原力與游離胺基酸 (Free amino acid, FAA) 可發現，當同種魚肉水解液中之總 FAA 含量較高時，其還原力也相對較高，但與本實驗結果顯示當 2 組實驗組經 24 hr 乳酸菌發酵後之總 FAA 含量有增加 (34.75 mg/100 g) 或減少 (39.43 mg/100 g)，還原力表現上卻相同 ($A_{700nm} = 0.85$)，此結果與林 (1999) 不符，因此還原力與總 FAA 含量之多寡是否有關仍需進一步探討。饒與柯 (2001) 測定鮭魚水解物之還原力，發現以 Protease XXII 水解者，其還原力高於以 Orientase 90N 或 Papain 水解者，因此得知蛋白質經蛋白質分解酵素水解後會產生具有還原性的胨狀物質所致。王 (2002) 利用蛋白分泌酵素水解鹹鴨蛋蛋白質 24 hr 後，其胺肌態氮之含量會提高，故推測水解物之還原力除了與游離胺基酸含量有關外，亦可能含有具有還原性之胨狀的作用，而本實驗組還原力下降原因可能是這類胨狀被水解而導致的，但真正機制仍有待探討。

Table 7 Comparison of reducing power

Sample	Reducing power (OD _{700 nm})**
Blank	0.97 ± 0.02 ^a
MFL+MFS	0.85 ± 0.01 ^c
MFL+MFS+12250	0.85 ± 0.01 ^c
Control	0.92 ± 0.02 ^b
Vitamin C (1,000 ppm)*	1.17 ± 0.06

*Vitamin C: positive control.

**Data were shown as the mean ± SD of three replicates. Data bearing different superscript in the same column are significant different ($p < 0.05$).

結 論

乳酸菌做為菌醃發酵吳郭魚肉漿能使 pH 值急速下降至 4.6 以下，成為發酵食品中之優勢菌醃，其可抑制雜菌的生長，且增加游離胺基酸含量，改善風味及提高營養價值，並且產生具功能性的肌肽 (Carnosine)，顯見以乳酸菌做為發酵魚肉製品之菌醃具有高度發展潛力。此外評估乳酸菌發酵吳郭魚肉漿之抗氧化能力影響試驗，結果顯示控制組與對照組之抗氧化能力較不顯著，但經由乳酸菌發酵吳郭魚肉漿 (2 組實驗組) 之後，其抗氧化效果具有增加能力，其中 2 組實驗組之清除 DPPH 自由基能力 (90% 以上) 與還原力 ($A_{700nm} = 0.85$) 之表現效果相同，而抑制血紅素催化亞麻油酸自氧化能力及螯合亞鐵能力，以 MFL+MFS 組之表現較佳分別為 81.44% 及 90.69%，但 MFL+MFS+12250 組表現較差之主要原因與上述所提及可能經由發酵過後所產生之 Carnosine 含量較低有關或具有還原性之胍肽被水解所導致，總之整體上而言，實驗組比較對照組與控制組之抗氧化表現，顯示吳郭魚可研發出具保健功能之新型態發酵食品。

參考文獻

王朝富 (2002) 電透析鹼鴨蛋蛋白酵素水解物之抗氧化能力的探討. 國立臺灣嘉義大學食品科學研究所碩士論文。
吳清熊, 邱思魁 (1996) 水產食品學. 國立編譯館出版, 臺北。

林玫欣 (1999) 鯖魚肉與內臟水解物之抗氧化性研究, 國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。
施康潔 (2000) 生產胞外黏性物質 (EAS) 乳酸菌應用於吳郭魚肉漿發酵食品可行性之探討, 國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。
柯文慶 (1998) 珍珠煙燻吳郭魚加工品之製造與品質評定. 87 年度水產加工研究成果彙編, 食品工業發展研究所編印, 新竹, 126-142。
殷儷容 (2003) 探討以魚肉為基質之乳酸菌發酵新加技術. 國立臺灣海洋大學食品科學系博士學位論文。
黃加成 (1995) 發酵肉製品之製造技術. 中國畜牧雜誌, 27(3): 132-136。
潘崇良, 施康潔, 汪復進 (2000) 乳酸菌處理即食鯖魚食品之開發研究. 88 年度水產加工研究成果彙編, 食品工業發展研究所編印, 新竹, 15-39。
蔡英傑 (1998) 乳酸菌與其應用特輯序. 生物產業, 9(2): 95-97。
饒家麟, 柯文慶 (2001) 鮪魚蒸液蛋白質水解物之抗氧化性. 台灣農業化學與食品科學, 39: 363-369。
Ahotupa, M., M. Saxelin and R. Korpela (1996) Antioxidative properties of *Lactobacillus* GG. Nutr. Today, 31: 51S-52S。
Aruoma, O. I., M. J. Laughton and B. Halliwell (1989) Carnosine, homocarnosine and anserine: Could they act as antioxidants in vivo? Biochem. J., 264: 863-869。
Chen, H. M., K. Muramoto, F. Yamauchi, K. Fujimoto and K. Nokihara (1998) Characterization of antioxidative peptides from soybean. In Food Factors for Cancer Prevention (H. Ohigashi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe and T. Yoshikawa eds.), Springer-Verlag, Tokyo, 639-641。
Decker, E. A. (1995) Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. Meat Sci., 34: 245-253。
DIN (1984) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach 35 LMBG. Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, Kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen, Beuth, Koln, 1980 bis 1984。
Dinis, T. C. P., V. M. C. Madeira and L. M. Almeida (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Archives Biochem. Biophys., 315: 161-169。
Gibbs, P. A. (1987) Novel uses of lactic acid fermentation in food preservation. J. Appl. Bacteriol. Sym. Suppl., 51S-58S。
Gyamfi, M. A., M. Yonamine and Y. Aniya (1999) Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on

- experimentally-induced liver injuries. *Gen. Pharmacol.*, 32: 661-667.
- Kansci, G., C. Genot, A. Meynier and G. Gandemer (1997) The antioxidant activity of carnosine and its consequences on the volatile profiles of liposomes during iron/ascorbate induced phospholipids oxidation. *Food Chem.*, 60(2): 165-175.
- Kato, T., T. Tahara, M. Sugimoto and Y. Sato (1990) Proteolysis in semi-dry fermented sausage. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37: 715-721.
- Konosu, S., Watanabe, K. and T. Shimizu (1974) Distribution of nitrogenous constituents in the muscle extracts of eight species of fish. *Jap. Soc. Fish. Sci.*, 40: 909-914.
- Kuo, J. M., D. B. Yen and B. S. Pan (1999) Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plant material. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3206-3209.
- Lin, M. Y. and C. L. Yen (1999) Antioxidation ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1460-1466.
- Lin, M. Y. and C. L. Yen (1999) Antioxidation ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1460-1466.
- Mislivec, P. B., M. E. Stack, H. A. Koch and R. Bandler (1992) Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins. *In FDA Bacteriological Analytical Manual (7th ed.)*, Food and Drug Administration, AOAC Int., Arlington, 227-235.
- Oyaizu, M. (1988) Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35: 771-775.
- Ross, P. P., S. Morgan and C. Hill (2002) Preservation and fermentation: Past, present and future. *Int. J. Food Microbio.*, 79: 3-16.
- Sakhare, P. Z. and D. R. Narasimha (2003) Microbial profiles during lactic fermentation of meat by combined starter cultures at high temperatures. *Food Control*, 14: 1-5.
- SAS (1999) SAS User's Guide: Basic Statistical Analysis. SAS Inst. Inc., Cary, North Carolina, USA.
- Suetsuna, K., H. Ukeda and H. Ochi (2000) Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.*, 11: 128-131.
- Venugopal, V. and F. Shahidi (1995) Value-added products from underutilized fish species. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 35: 431-453.
- Vuyst, L. D. and B. Degeest (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23: 153-177.
- Wade A. M. and H. N. Tucker (1998) Antioxidant characteristics of L-histidine. *J. Nutr. Biochem.*, 9: 308-315.
- Yamaguchi, N., Y. Yokoo and M. Fufimaki (1975) Studies on antioxidative activities of amino compounds of fats and oils. Part II. Antioxidative activities of dipeptides and their synergistic effects on tocopherol. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 22: 425-430.
- Yin, L. J. and S. T. Jiang (2001) *Pediococcus pentosaceus* L and S utilization in fermentation and storage of mackerel sausage. *J. Food Sci.*, 66: 742-746.
- Yin, L. J., C. L. Pan and S. T. Jiang (2002) Effect of lactic acid bacterial fermentation on the characteristics of minced mackerel. *J. Food Sci.*, 67: 786-792.

Studies of the Anti-oxidation Activities on Lactic Acid Bacteria Fermented Tilapia

Hu-Chen Chen¹, Chien-Wei Wu¹, Chun-Heng Wu¹ and Chorng-Liang Pan^{2*}

¹Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

²Department of Food Science, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

The tilapia was fermented with two combinations of three lactic acid bacteria (LAB) strains: *Pediococcus (Ped.) pentosaceus* MFL, *Ped. pentosaceus* MFS and *Lactobacillus (Lb.) plantarum* BCRC12250, and non-starter as a control group. After 24 hr fermentation, pH value of LAB added groups rapidly declined to under 4.6 and the cell count can get up to 8.30-8.85 log CFU/g, which became the predominant strains, and other microorganisms were inhibited. In antioxidative experiment, compare with the scavenge DPPH free radical ability of blank and control group was shown 40.12% and 75.83%, respectively, LAB added groups have a better activity (94.93-95.42%). However the chelating Fe²⁺ efficiency of LAB added groups were inferior to blank (98.86%) and control group (96.30%), but they still had 68.17-90.69% ability. In the inhibition of hemoglobin-induced linoleic acid oxidation assay, MFL+MFS group exhibited 81.44% inducing activity and followed with the MFL+MFS+12250 group (71.44%), control group (68.33%) and blank (41.73%). A same tendency in the reducing power, LAB added groups were A_{700 nm} = 0.85. Overall, LAB added groups displayed a higher antioxidative ability.

Key words: lactic acid bacteria, fermentation, antioxidative activities, tilapia

*Correspondence: Department of Food Science, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan. TEL: (02) 2462-2192 ext. 5116; FAX: (02) 2463-1070; E-mail: B0037@mail.ntou.edu.tw