

公開

不公開

執行機關識別碼：090402F101

行政院農業委員會漁業署 93 年度科技研究計畫 研究報告

資訊庫編號：931685

計畫名稱：改善魚油品質與氣味之修飾方法

Aroma Modification and Quality Improvement of Fish Oil

計畫編號：93 農科-9.4.2-漁-F1(1)

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫主持人：孫寶年

研究人員：劉誌成、蔡政融

執行機關：海洋大學食品科學系

目 錄

摘 要.....	a
Abstract.....	b
壹、前言.....	1
一、魚油.....	4
二、石蓴.....	4
三、脂肪酸分析.....	4
四、石蓴脂氧合酶之萃取.....	5
五、硫酸銨分割.....	5
六、石蓴脂氧合酶固定化之製備 - 共價鍵法.....	5
七、脂氧合酶比活性測定.....	6
八、固定化酵素反應時間之測定.....	6
九、魚油修飾後之香氣品評.....	7
十、香氣成分之鑑定.....	7
1. 氣味化合物之萃取.....	7
2. 揮發性化合物之濃縮.....	7
3. 氣相層析.....	7
4. 氣相層析嗅聞法 (GC-sniffing).....	8

參、結果與討論	9
一、市售魚油脂肪酸之分析	9
1. 魚油產品的分類	9
2. 魚油脂肪酸之組成	13
3. 市售魚油產品中脂肪酸主要的型態	17
二、固定化脂氧合酶	18
1. 黃豆脂氧合酶固定化	18
2. 石蓴脂氧合酶之固定化	19
三、石蓴脂氧合酶對魚油氣味之修飾	23
1. 石蓴粗酵素液	23
2. 固定化石蓴脂氧合酶	24
肆、參考文獻	26

摘要

台灣產飼料用及工業用魚油抽樣 2 種品牌，EPA 與 DHA 之總合佔脂肪酸總量介於 1-10 %。市售食用魚油膠囊抽樣共 23 種品牌，美國產 13 件，日本產 9 件，加拿大產 1 件，其 EPA 與 DHA 之總合佔其脂肪酸總量之 15-75 %。魚油以 TMAH 及 BF_3 甲酯化，產品之脂肪酸為三酸甘油酯 (TG) 型態，美國產魚油樣品膠囊中含 TG 及乙酯化態之 EPA 及 DHA 兩種型態。膠囊內之魚油具魚腥味，且氣味強度差異甚大，複方魚油氣味強度較單方魚油高。

以石蓴脂氧合酶修飾魚油氣味，故採集 8 月至 12 月之葉狀體製成粗酵素液，其脂氧合酶比活性範圍在 1.14 - 4.59 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ ，以颱風後採集之石蓴，酵素活性最高。採集退潮後水面下之石蓴，其活性範圍介於 1 - 2.50 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ 。石蓴脂氧合酶 (LOX) 以硫酸銨部分純化，在飽和濃度 40-60 % 的劃分範圍具有活性；在透析液中添加 0.2 mM Ca^{2+} 可以提升酵素的活性，回收率為 13.7 %。以固定化處理石蓴 LOX，部分純化者，酵素反應 3 小時達平衡，以粗酵素液固定化後酵素活性低於部分純化者。

固定化石蓴 LOX 與魚油於 25°C、75 rpm 震盪反應 3 小時後，好的氣味如甜瓜味、鮮魚味等均增加。

Abstract

The odor of fish oil limits its food application. As an attempt to reduce the undesirable odor, fish oil was treated with lipoxygenase (LOX) to produce desirable volatile compounds. In this study, the aroma of fish oil was modified with immobilized LOX from a green macroalga (*Ulva lactuca*). An extract of *Ulva lactuca* which was sampled between August and December showed LOX activities being 1.14 to 4.59 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$. It reached 4.59 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ when ulva was harvested after a typhoon. In average, activities measured ranged between 1 to 2.50 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ at low tide. The crude extract partially purified was using 40-60% saturation of ammonium sulfate fractionation and 0.2 mM calcium was mixed in dialyzed buffer. Algae LOX immobilized on oxirane acrylic beads needed 3 hours to reach maximal activity ($A_{234\text{nm}}/\text{mg}$ protein). Fish oil treated with LOX produced odor notes of melon and fresh fish.

壹、前言

魚的內臟中含有豐富的油脂，具有經濟價值及開發潛力，台灣的加工業者利用自家消化法提煉魚油，但是油脂色澤深且酸價高，僅能做為飼料用（溫等，1988）。近年來，超臨界二氧化碳廣泛應用於各種食品萃取系統中（Panlmer and Ting, 1995），此法可以直接萃取魚油或製成精製魚油（楊，2001）。目前國內製造之魚油以飼料用為主，作為營養補充劑之魚油有製成膠囊型態，廠商與產品如表一。

鮫魚內臟油，為國產粗製的魚油，由於遠洋漁業的成長，91年的產量達147,565公噸（漁業署，2002），大量的鮫魚經過加工後，內臟廢棄物可萃取出27-35%的粗脂肪（溫等，1988），多為飼料使用，而粗脂肪中約含有15-30%的EPA和DHA，利用濃縮分離超臨界二氧化碳技術，可以提高EPA和DHA的含量，合計達50%，而增加產品的價值（Liang *et al.*,1991; Liang and Hwang, 2000；Hwang and Liang, 2001）；經過老鼠試驗，已證明食用的安全性（賴等，1986）。

鯖、鱈是大型圍網主要的漁貨物，91年鯖魚每產量為34,950公噸（漁業局，2002）。鯖魚和鱈魚內臟油作為養殖用，以超臨界萃取法得到的魚油餵食老鼠，其食用安全性高於自家消化法和有機溶劑萃取所得（潘，1995）。

虱目魚91年產量為72,435公噸，多為內陸養殖（漁業署，2002）。虱目魚內臟油，可製成膠囊（吳等，1993）。

海鱸肝臟油，來自未被利用的海鱸肝臟，魚體肌肉部分已製成冷凍生魚片及味增海鱸浸漬產品（朱，2001），由於海鱸為漁政單位推動箱網養殖的重要魚種，91年產量達2,852公噸（漁業署，2002），推估一年約有84公噸之肝臟可以利用（林，2003）。

國內市場的魚油來自魚體內臟，萃製後多為飼料用，市面上保健食品的魚油以膠囊型態包裝，可減少服用時魚腥味所造成的不悅。魚腥味主要來自魚油中多元不飽和脂肪酸 (PUFA) 的氧化，其氧化產物裂解後會產生不好的氣味，因此使魚油在食品添加上的應用。為增加魚油的使用價值受限制，須降低魚腥味。

影響水產品氣味生成的酵素以脂氧合酶 (E.C.1.13.11.12, lipoxygenase, LOX) 為主 (Cadwallader, 2000)，LOX 作用於多元不飽和脂肪酸產生氫過氧化物，再經過裂解形成具揮發性的風味物質。利用黃豆中的 LOX 修飾海鱸肝臟油，僅需消耗少量的多元不飽和脂肪酸，即可產生閾值很低的香氣化合物 (林, 2003)；石蓴中的 LOX 修飾含有高度不飽和脂肪酸的魚油產品，可增加甜瓜味、青草味、蘋果味等良好氣味 (Hu and Pan, 2000)。然而 LOX 與油脂作用後成乳化狀，酵素回收困難，因此將 LOX 以固定化處理，可增加酵素的重複利用性 (侯, 2002)。

固定化酵素的方式包括吸附法、包埋法、交聯法、共價鍵法。其中黃豆 LOX 以化學鍵固定於 Oxirane acrylic beads，與基質作用重複 8 次後，酵素相對活性不會下降 (侯, 2002)。因此本實驗的目的為利用固定化石蓴 LOX 增加酵素穩定性和可利用性，並以氣相層析儀嗅聞裝置 (GC-Sniffing) 及氣相層析質譜儀 (GC-MS) 探討魚油經過固定化石蓴 LOX 作用前後脂肪酸量和香味化合物的種類及量的變化，期能增加魚油在食品添加上的應用。

表一、市售魚油產品標示之 EPA 和 DHA 含量

廠商	產品 ⁽¹⁾	EPA	DHA
		(mg / g oil)	
國產品牌			
永信藥品工業	悠康深海純化魚油	420	220
嘉新	深海魚油軟膠囊	180	120
三多	濃縮深海魚油	180	120
味全	深海魚油 EPA 300	180	120
雅芳	魚油軟膠囊	111	124
統一	極品深海魚油	50	330
山海冷凍	鮫魚油 (飼料用)	-	-
蘇澳魚油	魚油 (工業用)	-	-
進口廠牌			
巧康	Super EPA 2000	534	356
Evergrowth	高莉絲軟膠囊	360	240
麗多國際	Fish Oil Softgel	300	200
馨燕企業	Heamasinton	300	200
竹源實業	Epagin Softgels	279	186
捷安司國際	Figin Capsules	225	150
富亨企業	Alaska Deep Sea Salmon Oil	180	120
安得利	Andery Super Can	128	85
力申	DHA Health Oil	50	270
絲丹寇國際	Kokino Eyebow	30	460

⁽¹⁾ 飼料和工業用，餘為食用魚油。

-:未標示含量。

貳、材料方法

一、魚油

國產與進口市售食用與飼料用魚油，於表一中的商品進行分析。

二、石蓴

石蓴 (*Ulva lactuca*) 採集自基隆市中正區濱海沿岸，藻體草綠色，薄葉狀，邊緣波狀有缺刻或不規則裂開，但不縱裂至基部。基部由兩層細胞間向下延伸出許多假根狀細胞絲組成盤狀附著器。採集後置於海水中運回實驗室，進行脂氧合酶的製備。

三、脂肪酸分析

參照李等 (1990) 以 TMAH (tetramethylammonium hydroxide) 轉酯化魚油脂肪酸之方法。取 0.1 g 油與 3 mL 乙醚混合，再添加 1 mL 溶於甲醇中的 TMAH (TMAH: methanol=1:5, v/v)，反應 10 分鐘後加水終止反應，添加 0.5 mL 內標準品 (C13:0, 20 mg/mL)，分離有機層，以無水硫酸鈉脫水，氮氣吹乾，加入 0.5 mL hexane 溶解甲基酯化的油脂。

參照 A.O.A.C (1995) 的方法進行脂肪酸的甲基酯化。取魚油 0.1g 與內標準品 0.5 mL (C_{13:0}, 20 mg/mL) 混合，加入 0.5 N NaOH/methanol 5 mL，於沸水中迴流 10 分鐘，14% BF₃-CH₃OH 5 mL 迴流 2 分鐘，heptane 3 mL 迴流 2 分鐘，再添加飽和 NaCl 溶液，靜待分層，冷卻後取上層液，經無水硫酸鈉脫水過濾，再以氮氣吹乾，加入 0.5 mL hexane 溶解甲基酯化的油脂。

酯化的脂肪酸以氣液相層析儀 (Shimadzu GC-14A, Kyoto, Japan) 分析。液相為 Rtx-2330 (10% cyanopropylpheny, 90% biscyanopropyl polysiloxane, RESTEK, Bellefonte, PA, U.S.A) 毛細管柱 (30 m × 0.25 mm I.D.)，遞送氣體為氮氣，流速為 3 mL/min。初溫為 130 °C，

以 4 °C/min 線性升溫至 230 °C 後保持 10 分鐘，注射器及 FID 偵測器溫度均為 250 °C。以脂肪酸 C13:0 (Nu-Chek, Elysian, MI, U.S.A) 為內標準品，與脂肪酸標準品 (GLC-461, Nu-Chek) 之氣液相層析圖譜的滯留時間比對定性，並與內標準品的尖峰面積比對，定各脂肪酸之含量。

四、石蓴脂氧合酶之萃取

取新鮮的石蓴以淡水清洗，擦乾剪碎後與 0.05 M 磷酸緩衝溶液 (1 mM glutathione, 0.025% Triton X-100, pH 7.5) 混合 (w/v = 1/5)，於冰浴中以 Polytron (PT2000, Kinematica, Littau, Switzerland) 8500 rpm 均質 5 分鐘；為避免酵素受熱及機械攪拌的破壞，每均質 1 分鐘，暫停 30 秒；均質液於 4 °C 以 20,000 × g 離心 20 分鐘，取上層液即為粗酵素液。

五、硫酸銨分劃

參考硫酸銨飽和濃度表，取定量的硫酸銨粉末緩慢地加入石蓴粗酵素液中 (約 500 mL)，攪拌至硫酸銨完全溶解，靜置 10 分鐘，再以 20,000 g 離心 15 分鐘，將上清液與沉澱分離，上清液再進行下一個濃度的硫酸銨分劃。將各分劃區間的沉澱物以少量的 0.05 M 磷酸緩衝溶液 (pH 7.5) 溶解，再以含 0.2 mM Ca^{2+} 之磷酸緩衝溶液 (0.05 M, pH 7.5) 為透析液，進行透析 12 小時。透析完成後分別測定蛋白質濃度與酵素活性，計算各分劃之回收率及純化倍率。

六、石蓴脂氧合酶固定化之製備 - 共價鍵法

參照 Pinto (1997) 化學共價鍵固定化之方法。將 1 mL 以 0.05 M 磷酸緩衝溶液 (pH 7.5) 膨潤的 oxirane acrylic beads 與石蓴脂氧合酶 2 mL (0.05 M potassium phosphate, pH 7.5) 混合，在 25 °C 進行偶合反應 (coupling reaction) 24 小時。先以 10 倍 (v/v) 含 0.5 M NaCl 之

0.05 M phosphate (pH 7.5) 沖洗載體，再以 30 倍 (v/v) 含 0.125 M NaCl 之 0.05 M phosphate (pH 7.5) 沖洗出未與載體結合的酵素蛋白質，至洗液於 280 nm 不吸光為止。固定於載體的脂氧合酶，即用酵素蛋白質的量與洗液中蛋白質含量之差異計算。

七、脂氧合酶比活性測定

依 Kuo *et al.* (1996) 方法，取 100 μ L 石蓴脂氧合酶液加入 0.9 mL 的 0.05 M 磷酸緩衝溶液 (0.02% Tween-20, pH 7.5)，再添加 1 μ L 溶於 95 % 酒精的亞麻油酸 (100 mM)，於 26 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘。亞麻油酸氧化後的氫過氧化物含有共軛雙鍵，因此以分光光度計 (Hitachi U-2000, Tokyo, Japan) 測量吸光值 $A_{234\text{ nm}}$ 的變化並計算酵素活性。

$$\text{Total activity (} \mu\text{mol/min)} = (\Delta A / \Delta T) \div \epsilon \times V_f \times 1000 \times (V_t / V_s)$$

($\Delta A / \Delta T$) = 取單位時間呈線性的吸光值變化量。

ϵ = 莫耳吸光係數，以 25000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 計算。(Vick, 1991)

V_f = 反應的總體積 = 1 mL。

V_t = 粗酵素液的總體積 (mL)。

V_s = 粗酵素液參與反應的體積 = 50 μ L。

$$\text{Specific activity (} \mu\text{mol/min-mg)} = \text{Total activity} / \text{Total protein}$$

八、固定化酵素反應時間之測定

固定化後石蓴脂氧合酶，取載體 1 mL，加入含 0.02 % Tween-20, 0.05 M 磷酸緩衝溶液 (pH 7.5) 4.95 mL，再與 50 μ L 溶於 95 % 酒精的亞麻油酸 (10 mM) 作為基質，於 25 $^{\circ}$ C、75 rpm 震盪反應，測反應液的 $A_{234\text{ nm}}$ ，計算氫过氧化物的生成量與固定化石蓴脂氧合酶的活性。

九、魚油修飾後之香氣品評

參考 Hu and Pan (2000) 的方法，取魚油 0.1 g，添加固定化石萹脂氧合酶，再添加磷酸緩衝溶液 (0.05 M, 0.01% Tween 20, pH 7.5) 定容至 50 mL；控制組為添加脂氧合酶抑制劑 0.2 mM SnCl₂；兩組於 25°C、75rpm 震盪，暗處反應 3 小時後，對氣味特徵描述性品評試驗。

十、香氣成分之鑑定

1. 氣味化合物之萃取

參照 Hu and Pan (2000)、侯 (2002) 及 Ma *et al.*, (2004) 之方法。取 20 g 魚油與固定化脂氧合酶 0.1 mL 混合於圓底瓶中，在 25°C 避光反應 2 小時，添加內標準品 C₁₃H₂₈ 1 mg (Sigma)，於 60°C 減壓濃縮 (Rotavapor R-114/C, Büchi, Posthach, Schweiz)，調整真空度為 25-35 mmHg，抽取揮發性成分，並以液態氮冷凝收集 2 小時，用乙醚/正戊烷(1/1；v/v) 沖洗玻璃管柱，洗下揮發性物質成分，以等體積再蒸餾之乙醚/正戊烷 (1:1；v/v) 萃取。萃取液與飽和 KCl 溶液充分混合，除去萃取液中微量之極性成分，取出上層之有機層，於-20°C 冷凍，待萃取液中微量水分結成冰晶後，將萃取液經無水硫酸鈉脫水。

2. 揮發性化合物之濃縮

除去微量水分後的萃取液，以分子蒸餾器 (spinning band distillation apparatus) 濃縮至約 3 mL，再分裝於單封口的毛細管 (8 cm × 3 mm I.D.)，於 40°C 加熱繼續濃縮至 3 μL。

3. 氣相層析

取 1 μL 揮發性化合物濃縮液，以氣液相層析儀 (Shimadzu GC-14A, Kyoto, Japan) 分析。層析條件：液相 CP WAX 52CB 毛細管柱 (Chrompack, Middelburg, Netherlands)，遞送氣體為氮氣，流速為 1.6 mL/min。初始溫度為 50°C，以 1.5 °C/min 線性升溫至 200 °C 後保

持 70 分鐘，注射器及 FID 偵測氣溫度均為 250 °C。

依 Schomburg 和 Deilman (1973) 的方法，測定各種化合物在管柱層析中的滯留指數 (R.I.)。將含 6 碳到 26 碳的正烷類混合液，以氣液相層析儀分析，線性升溫時 R.I. 的計算方式如下：

$$R.I. = 100 \left(\frac{\log(tr)^x - \log(tr')^n}{\log(tr')^{n+1} - \log(tr')^n} \right) + 100n$$

$tr' = tr - rm$ ，每種化合物之校正滯留時間。

tm = 甲烷的滯留時間。

tr = 化合物的滯留時間。

$n, n+1$ = 正烷類之碳數。

$100 n$ = 碳數為 n 的正烷類之 R.I.

x = 未知化合物。

4. 氣相層析嗅聞法 (GC-sniffing)

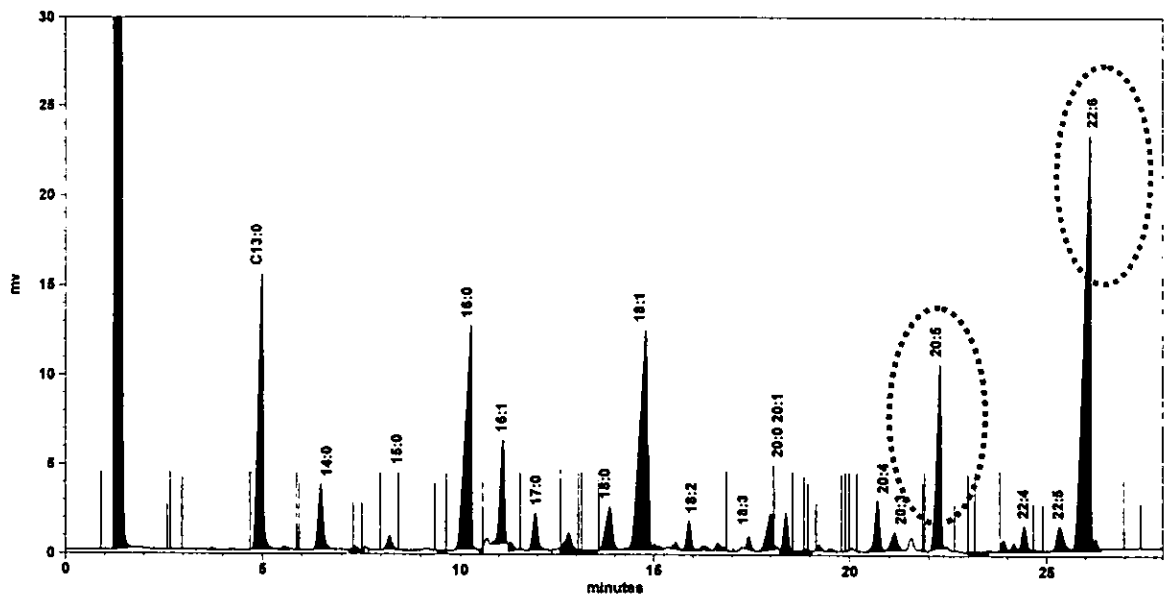
在毛細管層析管柱之出口連接分流器 (Adjustable Splitter, SGE, Austin, Tx) 及聞香裝置 (Olfactory deviec, SGE)，調整遞送氣體的分流比例為 1:8 (FID : sniffing, v/v)，由品評員於聞香裝置描述各種化合物之氣味。

參、結果與討論

一、市售魚油脂肪酸之分析

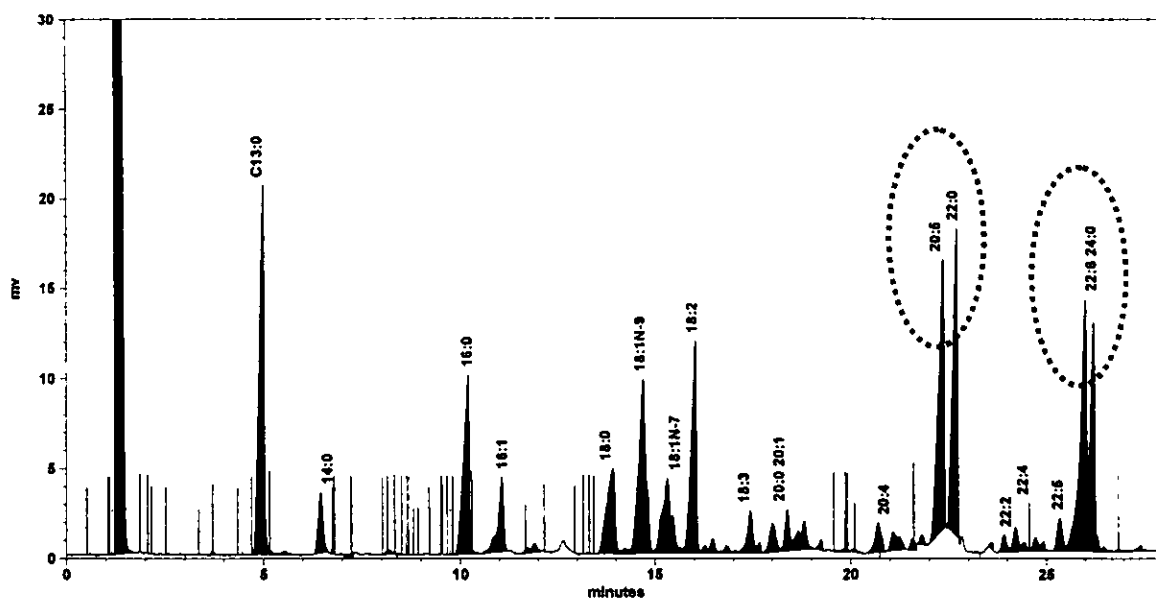
1. 魚油產品的分類

市售魚油產品，抽樣 23 件以氣相層析法分析，依脂肪酸層析圖譜將魚油分成兩大類，第一類產地主要為日本與加拿大，樣品合計 10 件，以 TMAH 及 BF_3 分別甲酯化，圖譜中 EPA (20:5) 與 DHA (22:6) 均分別呈現單峰 (圖一)。

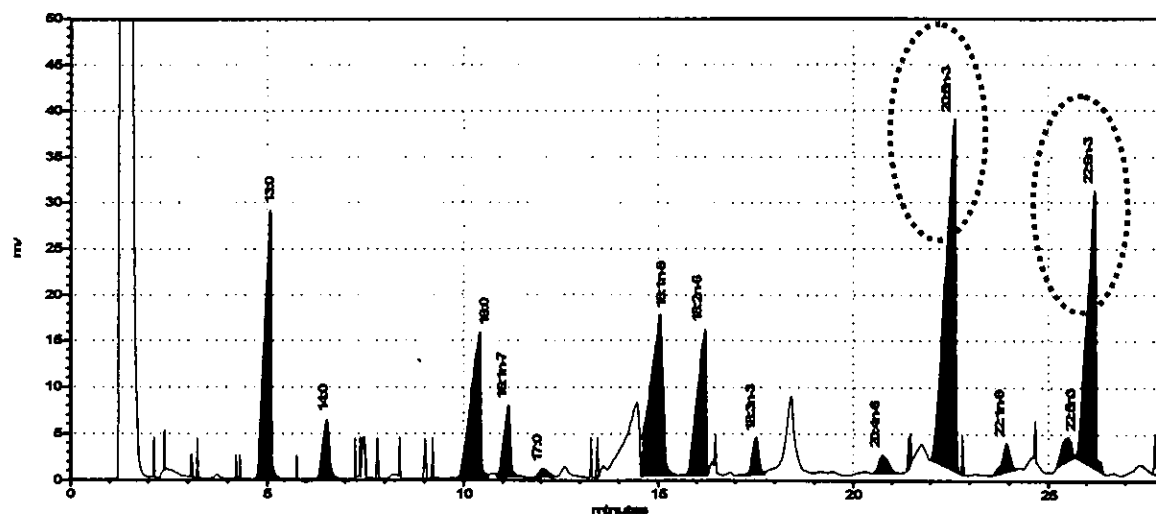


圖一、日本與加拿大產魚油以 TMAH 甲酯化後之脂肪酸氣相層析圖譜，以 C13:0 為內標準品。

第二類產地主要為美國，樣品合計 13 件，以 TMAH 甲酯化後之圖譜，EPA (20:5) 及 DHA (22:6) 均呈雙峰 (圖二)，緊鄰 EPA 與 DHA 的波峰其滯留時間分別與甲酯化之 Behenic acid (22:0) 及甲酯化之 Lignoceric acid (24:0) 相同，但在以 BF_3 甲酯化後，圖譜上 EPA 及 DHA 均呈單峰 (圖三)。

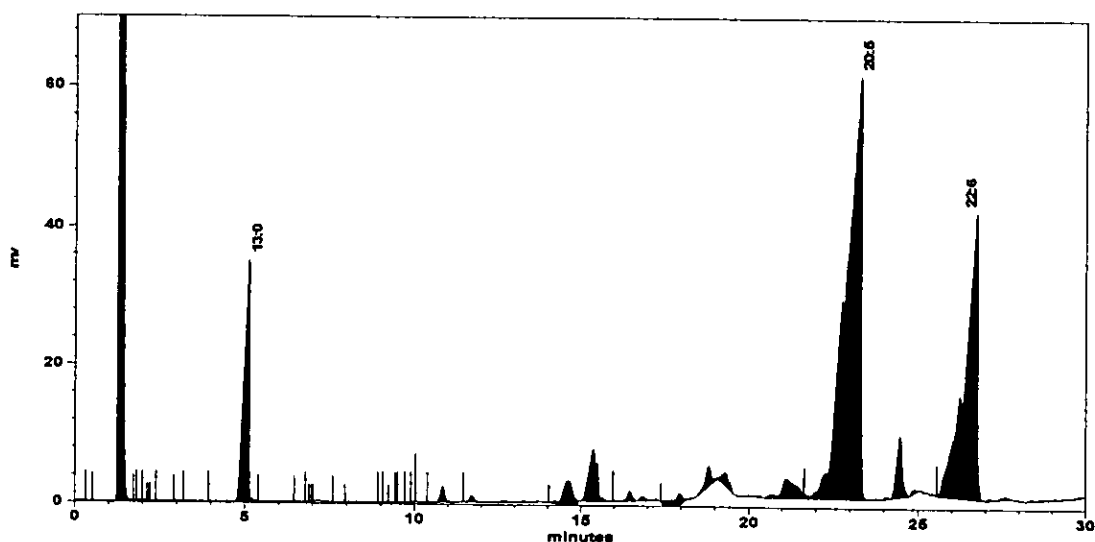


圖二、美國產魚油以 TMAH 甲酯化後之脂肪酸氣相層析圖譜，以 C13:0 為內標準品。



圖三、美國產魚油以 BF_3 甲酯化後之脂肪酸氣相層析圖譜，以 C13:0 為內標準品。

美國產魚油，分別以 TMAH 與 BF_3 甲酯化後之氣相層析圖譜與標準品比對，滯留時間 (RT) 為 22.3 與 22.6 分鐘之雙峰均為 EPA，25.8 與 26 分鐘之雙峰均為 DHA。美國產魚油中有添加乙酯態 (acetylated) 之 EPA 與 DHA，而且 BF_3 甲酯化較 TMAH 甲酯化反應劇烈，將 TG 及酯化之 EPA 與 DHA 分解成游離態脂肪酸，同時再甲基酯化，所以與甲酯化之標準品比對後，判定 EPA 與 DHA 的含量較以 TMAH 甲酯化者高。再者為確定美國產魚油中含乙酯化態之 EPA 與 DHA，因此將魚油添加內標品 (C13:0) 後，直接以層析儀分析得之圖譜 (圖四)。由圖四可知其確實為乙酯化之脂肪酸，經比對產品中乙酯化之 EPA 與 DHA 滯留時間與甲酯化脂之 Behenic acid 與 Lignoceric acid 時間相同，可知 EPA 與 DHA 以 TMAH 甲酯化後呈現成雙峰現象，分別為甲酯態及乙酯態之同一脂肪酸。



圖四、美國產魚油未甲酯化處理之脂肪酸氣相層析圖譜，以 C13:0 為內標準品。

分析美國產魚油分別以 TMAH、BF₃ 甲酯化及未甲酯化處理，EPA 與 DHA 的測定量與標示量比較如表二。以 TMAH 甲酯化與標準品比對得到的 EPA 與 DHA 含量比使用 BF₃ 與未甲酯化處理低，若將與 EPA 及 DHA 緊密相鄰的乙酯化 EPA 與 DHA 合併計算，可得較高的含量，且與標示量較為一致。以 BF₃ 甲酯化與未酯化處理所得 EPA 與 DHA 含量及比例相近。所以為避免判定錯誤，分析魚油以 BF₃ 甲酯化處理為佳。

表二、美國產魚油所得測定量與標示量之比較

脂肪酸型態	EPA	DHA
	mg / g oil	
標示量	420	220
測定量		
TG ⁽¹⁾	176	129
TG+乙酯態 ⁽²⁾	355	179

(1) 魚油分別以 TMAH 法、BF₃ 法甲酯化及未經酯化處理後之氣相層析結果。

(2) 將 EPA 及 DHA 各別之雙峰合併計算。

2. 魚油脂肪酸之組成

市售魚油產品的脂肪酸組成如表三，魚油之 PUFA 佔總脂肪酸量 36 - 89 %，EPA 佔 7-71 %，DHA 佔 11-31 %，EPA 與 DHA 合計佔總脂肪酸量 29 - 81 %，EPA 與 DHA 脂肪酸量合計介於 219-601 mg/g oil。其中添加複方之配方包括銀杏、金盞花、紅花油、植醇、卵磷脂、紅麴、米麥芽抽出物、大蒜油等，其魚油產品組成如表四。複方魚油之 PUFA 佔總脂肪酸量 32-85 %，EPA 佔 5-43 %，DHA 佔 8-31 %，EPA 與 DHA 合計佔總脂肪酸量 9 - 65 %，EPA 與 DHA 脂肪酸量合計介於 68 - 497 mg/g oil。顯示魚油產品的 PUFA 佔總脂肪酸總量的 32 % 以上，隨魚油加工處理不同，最高可達 89 %，而 EPA 可達 71 %、DHA 達 31 %。

單方魚油中 ω -3 與 ω -6 的比值介於 5-33，複方魚油則介於 0-13，顯示單方魚油含 ω -3 比例略高於複方魚油。在台灣常見魚類之可食部份的脂肪酸組成， ω -3 與 ω -6 的比值介於 0-9 (Chao *et al.*, 1996)，因此可藉由攝取 ω -3 與 ω -6 的比值較高的魚油產品來補充體內 ω -3 脂肪酸，對於不喜歡吃魚的人，可藉此補充之。編號 10 與 11 的層析圖譜重疊，推測兩產品的魚油原料來自同一處。

表三、單方魚油脂肪酸組成

脂肪酸	4		2		3		7		1		22		10		11		15		5		6		17	
	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%
Saturated FA	48	6	105	13	121	12	72	10	346	36	273	36	301	32	301	32	393	44	221	27	263	32	257	33
C14:0	0	0	22	3	0	0	0	0	86	9	62	8	77	8	77	8	75	8	29	3	30	4	33	4
C15:0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0	5	1	5	1	5	1	6	1	9	1	9	1
C16:0	12	1	46	6	8	1	7	1	174	18	143	19	165	17	165	17	165	18	124	15	154	19	148	19
C17:0	0	0	5	1	18	2	0	0	14	1	12	2	13	1	13	1	11	1	18	2	20	2	21	3
C18:0	15	2	21	3	0	0	33	5	46	5	13	2	29	3	29	3	34	4	25	3	37	4	47	6
C20:0	21	2	12	2	95	9	31	4	21	2	45	6	11	1	11	1	51	6	20	2	13	2	0	0
Monoenoic FA	46	5	196	25	82	8	78	11	252	26	190	25	239	25	239	25	226	25	212	26	217	26	176	23
C14:1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C16:1n-7	8	1	33	4	25	2	0	0	96	10	76	10	95	10	95	10	89	10	40	5	48	6	53	7
C17:1n-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	2	0	0	0	0	9	1
C18:1n-7	0	0	67	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C18:1n-9	38	4	79	10	42	4	78	11	119	12	114	15	113	12	113	12	123	2	160	19	164	20	115	15
C20:1n-9	0	0	17	2	0	0	0	0	37	4	0	0	31	3	31	3	0	0	13	2	6	1	0	0
C22:1n-9	0	0	0	0	15	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PUFA	778	89	493	62	803	80	557	79	361	38	292	39	406	43	406	43	326	36	396	48	343	42	339	44
ω-6	23	3	34	4	99	10	23	3	42	4	53	7	46	5	46	5	34	4	53	6	59	7	33	4
C18:2n-6	10	1	7	1	39	4	7	1	15	2	10	1	12	1	12	1	17	2	12	1	14	2	14	2
C18:3n-6	0	0	0	0	26	3	5	1	0	0	5	1	0	0	0	0	10	1	0	0	0	0	4	1
C20:2n-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C20:3n-6	0	0	0	0	20	2	0	0	0	0	11	2	0	0	0	0	8	1	0	0	0	0	15	2
C20:4n-6	13	1	8	1	0	0	0	0	12	1	26	3	15	2	15	2	0	0	22	3	21	3	0	0
C22:2n-6	0	0	6	1	0	0	0	0	10	1	0	0	14	1	14	1	0	0	11	1	6	1	0	0
C22:4n-6	0	0	12	2	14	1	0	0	4	0	0	0	5	1	5	1	0	0	9	1	18	2	0	0
ω-3	755	87	459	58	704	70	534	76	319	33	239	32	360	38	360	38	292	33	343	41	285	35	306	40
C18:3n-3	0	0	7	1	0	0	0	0	15	2	0	0	9	1	9	1	0	0	5	1	7	1	10	1
C20:5n-3	527	60	257	32	407	40	346	49	177	18	138	18	203	21	203	21	288	18	71	9	57	7	54	7
C22:5n-3	0	0	13	2	0	0	0	0	19	2	20	3	23	2	23	2	0	0	15	2	8	1	0	0
C22:6n-3	228	26	181	23	298	30	188	27	108	11	81	11	125	13	125	13	160	15	253	30	213	26	243	31
ω-3/ω-6	33		13		7		24		8		5		8		8		9		6		5		9	
Total	872	100	794	100	1006	100	706	100	959	100	754	100	946	100	946	100	894	100	830	100	824	100	772	100

表四、複方魚油脂肪酸組成

脂肪酸	8		14		13		23		12		20		18		9		16		19		21	
	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%	FA/g oil	%
Saturated FA	123	18	248	30	110	14	283	35	115	13	231	29	263	29	221	24	106	15	187	21	110	27
C14:0	21	3	65	8	6	1	69	9	2	0	26	3	60	7	42	5	0	0	42	5	28	7
C15:0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
C16:0	76	11	133	16	40	5	148	18	37	71	84	10	140	16	117	13	95	13	70	8	67	17
C17:0	5	1	0	0	3	0	11	1	0	0	3	0	11	1	11	1	0	0	3	0	4	1
C18:0	21	3	23	3	29	4	15	2	17	0	0	0	0	0	31	3	0	0	2	0	0	0
C20:0	0	0	24	3	32	4	40	5	20	42	116	14	52	6	16	2	10	1	71	8	12	3
Monoenoic FA	147	22	216	26	89	12	226	28	89	76	138	17	329	37	185	20	0	0	436	48	107	27
C14:1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	0
C16:1n-7	26	4	75	9	11	1	87	11	4	4	33	4	83	9	54	6	0	0	160	18	34	8
C17:1n-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	1	0	0
C18:1n-7	109	16	0	0	78	10	0	0	64	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C18:1n-9	0	0	114	14	0	0	130	16	0	0	101	12	235	26	112	12	0	0	257	28	73	18
C20:1n-9	12	2	27	3	0	0	0	0	22	22	0	0	10	1	19	2	0	0	2	0	0	0
C22:1n-9	0	0	0	0	0	0	9	1	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PUFA	408	60	365	44	364	47	298	37	721	79	437	54	309	34	503	55	611	85	287	32	184	46
ω-6	76	11	114	14	25	3	26	3	396	43	302	37	69	8	79	9	160	22	103	11	89	22
C18:2n-6	66	10	58	7	11	1	9	1	314	34	172	21	20	2	27	3	133	19	20	2	74	18
C18:3n-6	0	0	0	0	4	1	0	0	9	1	12	1	6	1	0	0	17	2	9	1	8	2
C20:2n-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	58	6	0	0
C20:3n-6	0	0	0	0	0	0	9	1	45	5	10	1	7	1	0	0	8	1	5	1	5	1
C20:4n-6	10	2	17	2	10	1	0	0	9	1	104	13	27	3	23	3	0	0	0	0	3	1
C22:2n-6	0	0	31	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	1	0	0	5	1	0	0
C22:4n-6	0	0	9	1	0	0	8	1	19	2	6	1	10	1	15	2	3	0	6	1	0	0
ω-3	332	49	251	30	543	71	273	34	326	36	135	17	239	37	424	47	451	63	184	20	95	24
C18:3n-3	14	2	11	1	0	0	8	1	11	1	0	0	0	0	10	1	379	53	0	0	0	0
C20:5n-3	183	27	139	17	329	43	151	19	169	19	46	6	47	5	117	13	38	5	66	7	58	14
C22:5n-3	13	2	15	2	0	0	17	2	32	3	8	1	62	7	18	2	7	1	42	5	0	0
C22:6n-3	122	18	86	10	214	28	97	12	114	12	81	10	131	15	279	31	30	27	75	8	37	9
ω-3/ω-6	4		2		13		11		1		0		3		5		3		2		1	
Total	678	100	830	100	767	100	807	100	913	100	807	100	901	100	909	100	716	100	910	100	401	100

魚油產品 EPA 和 DHA 的標示量以及 EPA/DHA 的比值與分析結果比較如表五，顯示單方魚油中僅有 4 件未達標示量，而複方魚油則有 6 件，並且與標示量差異較大。推測複方魚油因產品訴求不同，添加他物而改變膠囊中油脂脂肪酸的組成。

表五、魚油產品 EPA 和 DHA 盒裝之標示與測定量 (mg/ g oil)

樣品編號	標示量				測定量				測定量與標示量差 %
	EPA	DHA	EPA/DHA	EPA+DHA	EPA	DHA	EPA/DHA	EPA+DHA	△(EPA+DHA)
單方									
4	420.00	220.00	1.91	640	355.05	187.39	1.90	524	-15
2	360.00	240.00	1.50	600	257.15	181.32	1.42	438	-27
3	300.00	200.00	1.50	500	350.62	250.35	1.40	601	20
7	300.00	200.00	1.50	500	345.64	226.05	1.53	572	14
1	180.00	120.00	1.50	300	177.38	108.12	1.64	285	-5
22	180.00	120.00	1.50	300	138.44	80.58	1.72	219	-27
10	180.00	120.00	1.50	300	202.64	124.90	1.63	328	9
11	180.00	120.00	1.50	300	202.64	124.90	1.63	328	9
15	180.00	120.00	1.50	300	288.20	236.85	1.22	655	118
5	50.00	330.00	0.15	380	70.63	525.90	0.13	597	57
6	50.00	270.00	0.19	120	56.55	212.60	0.27	270	125
17	24.00	112.00	0.21	136	53.56	242.71	0.22	297	118
複方									
8	534.00	356.00	1.50	890	190.97	173.19	1.10	364	-59
14	279.00	186.00	1.50	465	139.20	86.11	1.62	225	-52
13	225.00	150.00	1.50	375	298.12	199.44	1.49	497	33
23	180.00	120.00	1.50	300	151.20	96.52	1.57	248	-17
12	128.00	85.00	1.51	213	160.51	115.72	1.39	277	30
20	111.00	124.00	0.90	235	45.65	80.99	0.56	127	-46
18	72.73	142.42	0.50	214	46.71	130.80	0.36	178	-17
9	30.00	460.00	0.07	490	116.94	278.71	0.42	396	-19
16	25.00	16.00	1.50	41	38.46	30.48	1.26	68	66
19	15.20	17.80	0.85	33	66.47	75.04	0.89	141	327
21	-	-	-	-	57.77	36.73	1.57	95	

-: 產品無標示。

3. 市售魚油產品中脂肪酸主要的型態

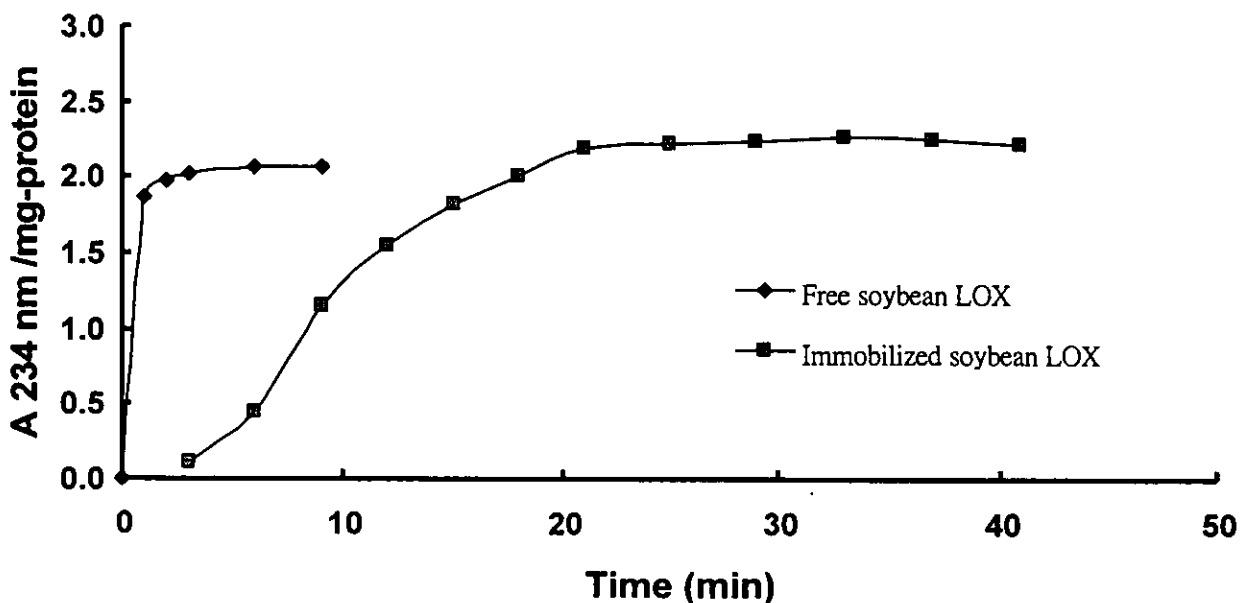
天然魚油是以三酸甘油酯存於魚體中，但其高度不飽和脂肪酸，約只佔其中三分之一，為提高 EPA 及 DHA 之含量，此高濃度之 EPA 及 DHA 再酯化，稱之為 re-esterfied fish oil，此次分析之魚油產品即一半為此種形態。

天然魚油三酸甘油酯水解後，即以乙酯化 (acetylated) 方式酯化脂肪酸，再分離出 EPA 及 DHA，即包裝上市，此次分析之魚油產品亦有一半為此種形態。

二、固定化脂氧合酶

1. 黃豆脂氧合酶固定化

以 75 rpm、25°C、24 小時固定化黃豆脂氧合酶，再以 75 rpm、25°C 為反應條件，每 4 分鐘取出反應液測 A_{234nm} (圖五)。固定化酵素無法自由移動，需藉震盪方式使基質克服外部沉散阻力，及載體內部擴散限制酵素作用，而產物又需由顆粒內部擴散釋出，因此與基質作用平衡時間較游離態酵素長，若要與基質反應完全需確定其最適反應時間。10 mM 亞麻油酸 50 μ L 分別與游離態 (0.174 mg protein/mL) 及固定化 LOX (0.203 mg protein) 作用，隨反應時間產物量之變化如圖一。顯示游離態與固定化黃豆 LOX 反應平衡各約需 3 分鐘及 20 分鐘，可達相同之產物量 (侯，2002)。



圖五、游離態 (0.174 mg protein) 與固定化 (0.203 mg protein) 黃豆脂氧合酶催化亞麻油酸氧化隨反應時間活性變化。

2. 石蓴脂氧合酶之固定化

(1) 石蓴粗酵素液製備

採集 8 月至 12 月新鮮的石蓴製成的粗酵素液，其脂氧合酶比活性範圍為 1.14 - 4.59 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ ，而造成石蓴脂氧合酶活性改變主要是受環境緊迫因子，包括水溫、光照、波浪等，都可能誘發酵素活性表現（陳，2001），脂氧合酶也是植物在抵抗外來環境改變時，啟動防禦機制表現的酵素之一（Farmer and Ryan, 1992）。在水溫 20-23 $^{\circ}\text{C}$ 時，酵素活性在 1.88-4.59 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ 範圍，而 24-28 $^{\circ}\text{C}$ 時，酵素活性則在 1.28 - 1.54 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ ，顯示水溫較低時，石蓴脂氧合酶活性較高。在颱風後採集之石蓴，測得最高活性 4.59 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ （表六），推測颱風來襲時，因為浪潮的衝擊使藻體受到緊迫而提高酵素活性。潮汐的變化可分為大潮、中潮、小潮和長潮；大潮為當月潮差較大時期，其次為中潮、小潮；長潮為低潮至滿潮時間較長，當天可能僅有一次滿潮與低潮；藉陰曆可表示潮汐的差異，在大潮（16、17 日）、中潮（6、21 日）、小潮的（8、24、10 日）測得的酵素活性與潮汐變化無明顯的相關性。採集石蓴時選擇退潮後水面下的藻體，脂氧合酶活性表現約為 1-2.50 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ 之間，顯示採樣地點的藻體活性表現穩定，有利於酵素的利用。

表六、自 2004 年 8 月至 12 月採集之石蓴石蓴脂氧合酶活性

solar	Date		Water temp (°C)	Air temp (°C)	Weather	Time		Specific activity ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)
	lunar					Low tide	Harvest	
08/31	07/16		28	28	sunny	17:30	18:00	1.38
09/29	08/16		25	25	sunny	15:30	16:00	1.54
09/30	08/17		26	25	sunny	16:30	17:00	1.14
10/07	08/24		24	22	cloudy	09:30	10:00	1.28
10/21	09/08		23	24	sunny	09:00	09:40	1.95
10/28	09/15		22	21	cloudy	15:33	16:20	4.59*
11/17	10/06		21	21	cloudy	06:17	07:00	1.88
11/21	10/10		21	19	cloudy	11:06	12:00	2.16
12/02	10/21		19	20	cloudy	06:22	07:00	2.47

(*): 颱風後三天採集之石蓴。

(2) 石蓴脂氧合酶之部分純化

石蓴粗酵素液中添加硫酸銨粉末，製成飽和度 0 - 20 %、20 - 40 %、40 - 60 %、60 - 80 % 的分劃，在 40 - 60 % 的回收率為 13.7 %，在其他的分劃區間所得脂氧合酶回收率為 0 %，40 - 60 % 所得之酵素比活性為粗酵素液的 1.13 倍，表示石蓴粗酵素液經過硫酸銨分劃後，主要活性在此分劃區間內（表七），與綠藻類的脂氧合酶之硫酸銨分劃區間相近，如石髮藻 (*Enteromorpha intestinalis*) 具有活性的區間在 40 - 60 % (Kuo *et al.*, 1996)，石蓴 (*Ulva lactuca*) 40 - 55 % (Kuo *et al.*, 1997)，其他植物如馬鈴薯為 15 - 45 % (Pinto *et al.*, 1997)、黃豆葉 35 - 65 % (Baracat-Pereira *et al.*, 2001)、番茄 35 - 60 % (Suurmeijer *et al.*, 1998)，因植物種類不同而異。

酵素回收率低於 50 %，推測在純化處理時，酵素液可能含有水解脂氧合酶的蛋白質酵素或具有還原脂氧合酶活性中心 Fe^{3+} 的多酚化合物存在，使酵素的總活性降低。因此可進一步添加蛋白酶抑制劑 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 和多酚類吸附劑 (polyvinyl-pyrrolidone, PVP) 於酵素液中，減緩酵素的失活。

表七、石蓴脂氧合酶粗酵素液之硫酸銨分劃

(NH ₄)SO ₄ (%)	total activity ($\mu\text{mol mg}^{-1}$)	total protein (mg)	specific activity ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	recovery (%)	purification (fold)
crude enzyme	158.55	105.00	1.51	100.00	1.00
0-20	0	9.20	0	0	0
20-40	0	22.92	0	0	0
40-60	21.35	12.56	1.70	13.47	1.13
60-80	0	12.40	0	0	0
80 supernatant	0	42.00	0	0	0

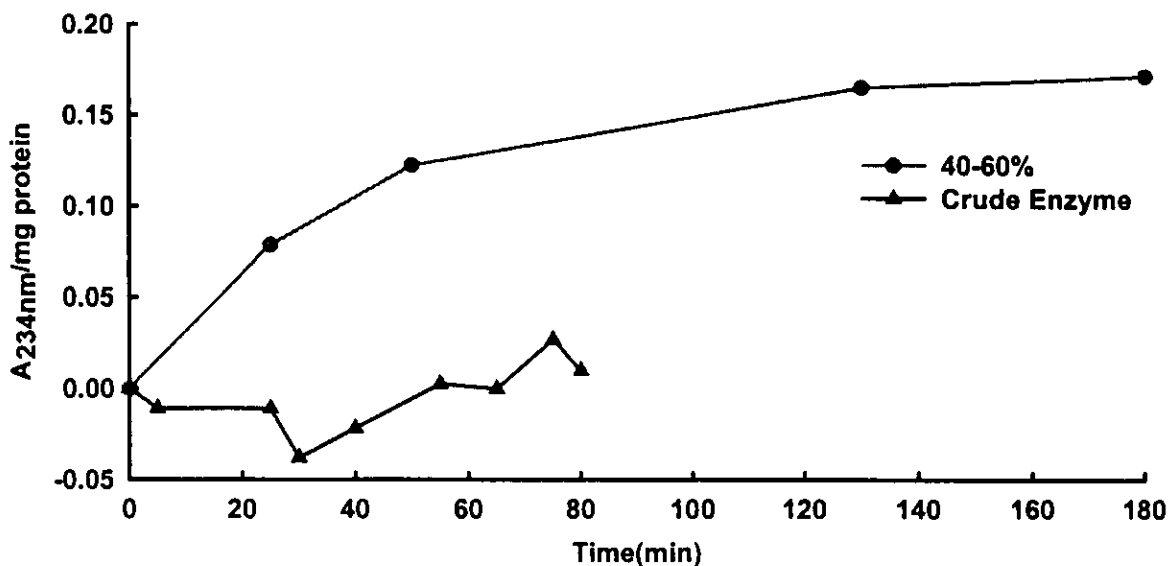
粗酵素液以硫酸銨部分純化之離心沉澱物，以少量的緩衝溶液溶解後，因含有硫酸銨會影響酵素的利用和分析，所以必須以透析方式減少鹽類的殘留，而透析過程中可能同時也減少酵素液中原有 Ca^{2+} 的濃度。文獻指出 Ca^{2+} 可以激發黃豆脂氧合酶 (Restrepo *et al.*, 1973)，而且在純化石蓴脂氧合酶時， Ca^{2+} 可激發石蓴脂氧合酶活性高達 8.8 倍 (Kuo *et al.*, 1997)，實驗中以未添加 Ca^{2+} 的透析液進行透析後，幾乎無法測量到酵素活性，而在含有 Ca^{2+} 的透析液可提升脂氧合酶活性並測得之 (表八)。

表八、透析液中添加 Ca^{2+} 對脂氧合酶活性的影響

Treatment	LOX activity ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)
Algal extract	1.51
Dialyzed algal extract (40 – 60 %)	undetectable
CaCl_2 – treated extract (40 – 60 %)	1.70

(3) 固定化石蓴脂氧合酶

相同固定化黃豆脂氧合酶與反應條件，固定化經過硫酸銨飽和濃度 40 - 60 % 分割後的石蓴酵素液 (2.62 mg) 與 10 mM 亞麻油酸 50 μL 作用，隨反應時間產物量 ($A_{234\text{nm}}$) 之變化結果顯示，固定化石蓴脂氧合酶反應平衡時間約需三小時 (圖六)。而未經過部分純化之固定化石蓴酵素 (0.37 mg)， $A_{234 \text{ nm}}$ 有不規則的跳動，推測載體可能與其他粗酵素液中的雜蛋白質 (酵素) 結合，影響脂氧合酶催化亞麻油酸或是其催化產物 (氫氧化物) 裂解破壞，因此造成吸光值的跳動 (圖六)。石蓴粗酵素液經過硫酸銨分割後，進行固定化石蓴脂氧合酶處理，其酵素表現活性較固定化粗酵素液者高，推測載體接上其他雜蛋白質的情形減少，酵素的表現受到其他雜蛋白質的影響比粗酵素低，酵素活性 ($A_{234\text{nm}}/\text{mg protein}$) 表現反應隨時間增加而達到平衡。



圖六、固定化石蓴粗酵素液 (0.37 mg protein) 與硫酸銨部分純化之酵素液 (2.62 mg protein)，其脂氧合酶催化亞麻油酸氧化隨時間的變化。

三、石蓴脂氧合酶對魚油氣味之修飾

1. 石蓴粗酵素液

石蓴粗酵素液與魚油混合反應 3 小時，對照組為僅有添加石蓴粗酵素液。發現實驗組修飾魚油後有甘蔗味，而對照組則有青草味，表示石蓴粗酵素液中的脂氧合酶與內生性的脂肪酸作用，即可產生好的氣味；石蓴粗酵素液的脂肪酸組成如表九；而添加魚油則增加酵素的反應基質，可使好的氣味增加。

表九、石蓴萃取液所含粗脂肪之脂肪酸組成

fatty acid	mg/g oil	Conc. %
C15:0	14.03	3.37
C16:0	83.86	20.15
C17:0	5.54	1.33
C18:0	6.57	1.58
C16:1	25.06	6.02
C18:1	28.23	6.78
C18:2	6.69	1.61
C18:3	8.69	2.09
Unknown 1	92.23	22.16
Unknown 2	66.46	15.97
Total	416.20	81.86

2. 固定化石蓴脂氧合酶

魚油具有魚腥味，與固定化的石蓴脂氧合酶混合於反應三小時後，魚腥味仍存在，但是出現未添加脂氧合酶者所無之鮮魚味(表十)，對照組加入脂氧合酶特異性抑制劑 SnCl_2 ，使脂氧合酶失活，而鮮魚味也消失，證實好的鮮魚味來自脂氧合酶與魚油的作用。這種鮮魚味可能是由高度不飽和脂肪酸經脂氧合酶作及 hydroperoxide lyase 作用而生成 5、6、8 或 9 個碳的醇類或醛類。魚油經過石蓴酵素作用後，揮發性氣味中，令人喜好的氣味增加 54.2%，不好的氣味下降 7.2% (表十一)。

表十、魚油經粗酵素液和固定化石萼脂氧合酶修飾後產生的氣味

Treatment	Odor
fish oil	fishy
crude enzyme	grass ⁽¹⁾
fish oil + crude enzyme	light fishy
fish oil + immobilized algae lipoxygenase	light fishy and fresh fish ⁽²⁾
fish oil + immobilized algae lipoxygenase + SnCl ₂	fishy

⁽¹⁾ 1-Penten-3-ol and Ethyl hexanoate

⁽²⁾ E,Z-2,6-Nonadienal

表十一、石萼脂氧合酶作用前後氣味之改變

Volatile compounds	before	after	Change (%)
Total volatile (ppb)	3477	3787	8.9
Odorous volatile (ppb)	1355	1384	2.1
Desirable	533	822	54.2
Undesirable	822	763	-7.2
Odorous/total volatile (%)	39	42	7.7

肆、參考文獻

- 李敏雄、王美苓、閔丙宇。1990。甲基酯化方法對脂肪酸分析結果之影響。食品科學。17:1-10。
- 林志城。1992。魷魚內臟油氧化安定性之研究。國立台灣海洋大學水產食品科學研究所博士論文。基隆。
- 林安琪。2003。以固定化脂氧合酶及石蓴氫過氧化物解離酶修飾海鱸肝臟油之氣味。國立台灣海洋大學食品科學研究所碩士論文。基隆。
- 侯秀儀。2002。利用固定化脂氧合酶修飾雞油氣味之可行性。國立台灣海洋大學食品科學系碩士論文。台灣。基隆。
- 胡生沛。1998。石蓴脂氧合酶對魚油氣味的修飾作用。國立台灣海洋大學食品科學研究所碩士論文。基隆。
- 孫寶年、蕭泉源、許登基。1991。魷魚加工。國立台灣海洋大學水產食品科學叢書。pp.200-210。
- 劉昌樹。1999。鯖魚眼窩油之超臨界二氧化碳萃取及其氧化安定性之探討。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。
- 楊志頌。2001。鯖魚蒸煮油之超臨界二氧化碳精製。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。
- 蔡政融。1994。烏魚鰓中脂氧合酶之特性與水產風味形成之關係。國立台灣海洋大學。食品科學研究所博士論文。基隆。
- 潘憶文。1995。鯖、鰹魚內臟油脂之製備、濃縮及生理活性之研究。國立台灣海洋大學食品科學研究所碩士論文。基隆。
- 彭清勇、孫寶年、吳淳美。1995。阿根廷魷魚肝臟油在儲藏中揮發性化合物之變化。食品科學。22(3):335-344。
- 賴永順、蔡慧君、王文政。1986。魷魚內臟油之酯化及以食用油為目標之安全性試驗。台灣省水產試驗所試驗報告。
- 吳清熊、邱思魁。1993。虱目魚之內臟及腹肉油脂之利用。台灣省漁業局計畫成果報告。
- 朱承天。2001。台北魚市示範推廣海鱸壽司現場製作。漁業推廣月刊。176:21-22。
- 溫惠美、陳景川、李敏雄。1988。魷魚內臟油脂之精製。中國農業化學會誌。26:210-218。

- 中山秀，1995。DHA 的近況和其利用分野。日本食品科學 34(1):52-56。
- 經濟部。2002。經濟部產業技術資訊服務推廣計畫。機能性油脂在加工食品的應用研究。pp.91-115。
- 行政院漁業署。2002。中華民國台灣地區漁業統計年報。台北。
- Chao, P.M. and S.M. Teng. 1996. Total lipids, fatty acid composition and cholesterol content of fifteen fish species common in Taiwan. *Nutritional Sciences Journal*. 21:147-159.
- Fujimoto, K. Min, 1998. Flavor chemistry of fish oils. Ch. 10, in *Flavor Chemistry of Lipid Foods*, D.B and T.H. Smouse (Eds.) pp.190-195. American Oil Chemists's Society, Champaign, Illinois.
- Farmer, E. E. and P. G. Ryan. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*. 4:129-134.
- Hwang, L.S. and J.H. Liang. 2001. Fraction of urea-pretreated squid visceral oil ethyl esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 78:473-476.
- Hu, Seng-Pei. And B.S. Pan. 2000. Modification of fish oil aroma using a macroalgal lipoxygenase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 77:343-348.
- Hsu, A.F., T.A. Foglia and G.J. Piazza. 1997. Immobilization of lipoxygenase in an alginate-silicate sol-gel matrix: formation of fatty acid hydroperoxides. *Biotechnology Letters*. 19:71-74.
- Kermasha, S., N. Dioum, B. Bisakowski and M. Vega. 2002. Biocatalysis by immobilized lipoxygenase in a ternary micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 19-20:305-317.
- Kou, J.M., A. Hwang, H.H. Hsu and B.S. Pan. 1996. Preliminary identification of lipoxygenase in *Alage* (*Enteromorpha intestinalis*) for aroma formation. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 44:2073-2077.
- Liang, J.H., and A.I. Yeh. 1991. Process Conditions for separating fatty acid esters by supercritical carbon dioxide. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 68:687-692.
- Liang, J.H. and L.S. Hwang. 2000. Fractional of squid visceral oil ethyl by short-path distillation. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 77:773-777.

- Lin, C.C. and L.S. Hwang. 2002. A comparison of the effects of various purification treatments on the oxidative stability of squid visceral oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 79:489-494.
- Messing, R.A. 1975. Introduction and general history of immobilized enzymes. Ch. 1. In *Immobilized enzymes for industrial reactors*, Messing, R.A. (Ed.), pp. 1-10. New York.
- Ma, N.T., C.C. Chyau and B.S. Pan. 2004. Fatty acid profile and aroma compounds of the lipoxygenase-modified chicken oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*. (in press).
- Pan, B.S., J.R. Tsai, L.M. Chen and C.M. Wu. 1997. Lipoxygenase and sulfur-containing amino acids in seafood flavor formation. Ch. 7. in *Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods*, Shahidi, F. and K.R. Cadwallader (Eds.), pp.64-75. American Chemical Society. Washington, DC.
- Palmer, M.V. and Ting, S.S.T. 1995. Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chemistry*. 52:345-352.
- Parra-Diaz, D., D.P. Brower, M.B. Medina and G.J. Piazza. 1993. A method for immobilization of lipoxygenase. *Biotechnology Application*. 18:359-367.
- Pinto, M.C., J.L. Gata and P. Macías. 1997. Immobilization of potato tuber lipoxygenase on oxirane acrylic beads. *Biotechnology Progress*. 13:394-398.
- Pong, C.C., B.S. Pan and C.M. Wu. 1995. Studies on volatile compounds of squid (*Illex argentinus*) liver oil. *Food Science*. 22:335-344.
- Rodriguez-Ruiz, J., E.H. Belarbi, J.L.G. Sánchez and D.L. Alnoso. 1998. Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnology techniques*. 12(9):689-691.
- Santano, E., M.C. Pinto and P. Macías. 2002. Xenobiotic oxidation by hydroperoxidase activity of lipoxygenase immobilized by adsorption on controlled pore glass. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:639-646.
- Toyoda T, K., I. Morita and S. Murota. 1996. Docosapentaenoic acid, an elongation metabolite of eicosapentaenoic acid, is a potent stimulator of endothelial cell migration on pretreatment in vitro. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 54:39-45
- Shahidi, F., J. Synowiecki, R. Amarowicz and U. Wanasundara. 1994. Omega-3 fatty acid composition and stability of seal lipids. Ch. 16. in *Lipids in food flavors*, C.T. Ho and T.G. Hartman. (Eds.), pp.233-243. American Chemical Society. Washington, DC.