

行政院農業委員會公告

中華民國 103 年 6 月 16 日

農牧字第 1030042848 號

主 旨：訂定「冷藏與冷凍解凍豬肉酵素活性檢驗方法」，並自即日生效。

依 據：「農產品生產及驗證管理法」第十六條。

公告事項：訂定「冷藏與冷凍解凍豬肉酵素活性檢驗方法」如附件。

主任委員 陳保基

冷藏與冷凍解凍豬肉酵素活性檢驗方法

- 1、適用範圍：適用於判定塊狀冷藏與冷凍解凍豬肉。
- 2、原理：凍結處理會破壞肌肉細胞之粒線體，解凍時粒線體中之酵素會釋放至肌漿中，因此測定肌漿中粒線體 β -羥基醯輔酶 A 去氫酶 (β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, HADH) 之活性，即可瞭解豬肉是否經過冷凍處理。
- 3、儀器設備及藥品
 - 3.1 試藥
 - 3.1.1 磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)：試藥級。
 - 3.1.2 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)：試藥級。
 - 3.1.3 Ethylene-dianitrilo-tetra-acetic acid (EDTA)：試藥級。
 - 3.1.4 還原型菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸 (β -NADH Sigma-Aldrich)：對照用標準品。
 - 3.1.5 乙酸乙醯基輔酶 A (Acetoacetyl-CoA Sodium, Sigma-Aldrich)：對照用標準品。
 - 3.2 去離子水：比電阻於 25°C 可達 18M Ω .cm 以上。
 - 3.3 儀器設備及器材
 - 3.3.1 分光光度計：波長 340 nm。
 - 3.3.2 搾肉汁器：2 塊厚 1.5 cm 之壓克力板，搾取肉汁。
 - 3.3.3 利刀。
 - 3.3.4 塑膠培養皿。
 - 3.3.5 漏斗。
 - 3.3.6 濾紙：Whatman No.2。
 - 3.3.7 定量瓶：25 mL。
 - 3.3.8 塑膠試管：5 mL。
 - 3.3.9 塑膠離心管：50 mL。
 - 3.3.10 石英管：3 mL，1 cm \times 1 cm 管徑。
 - 3.4 試劑配製
 - 3.4.1 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 5.5)：秤取 K_2HPO_4 17.4 g 及 KH_2PO_4 13.6 g，分別以蒸餾水溶成 1 L 後，混合兩種溶液調整至 pH 5.5，置於 4 °C 冰箱備用。

3.4.2 26.9 mM EDTA 溶液：100 mg EDTA 溶於 10 mL 蒸餾水後冷藏備用。

3.4.3 7.1 mM 還原型菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸 (β -NADH, SIGMA-ALDRICH) 溶液：5 mg NADH 溶於 1 mL 蒸餾水冷藏備用。

3.4.4 5.9 mM 乙酸乙醯基輔酶 A (Acetoacetyl-CoA Sodium, SIGMA-ALDRICH) 溶液：5 mg 之 Acetoacetyl CoA 溶於 1 mL 蒸餾水後冷藏備用。

4、操作流程

4.1 肉汁製備

4.1.1 冷凍塊狀豬肉於試驗前 48 小時取出置於 4°C 冷藏櫃中解凍，以利刀取下約 2-3 g 肉 (1.5 × 1.5 cm)，切口表面以 0.1 M 磷酸緩衝液沖洗，再以紙巾擦乾表面。

4.1.2 將肉放在兩塊厚約 1.5 cm 之壓克力板間，旋緊螺絲以搾取肉汁，並以塑膠培養皿收集肉汁。

4.1.3 肉汁以 0.1 M 磷酸緩衝溶液稀釋 200 倍，並經濾紙 (Whatman No.2) 過濾後備用。

4.2 酵素活性測定步驟

4.2.1 取 2.6 mL 0.1 M 磷酸緩衝溶液加入 1 cm × 1 cm 管徑之石英管中。

4.2.2 加入 0.2 mL 26.9 mM 之 EDTA 溶液。

4.2.3 加入 0.05 mL 7.1 mM 之 β -NADH 溶液。

4.2.4 加入 0.1 mL 稀釋 200 倍之肉汁後混合均勻；對照組加入 0.1 mL 去離子水。

4.2.5 加入 0.05 mL 5.9 mM 之 Acetoacetyl-CoA，立刻混勻並置入分光光度計 (Spectrophotometer, SHIMADZU, UV-1800 型；Beckman Coulter, DU 700)，以波長 340 nm 測定反應 0、1、2 及 3 分鐘之吸光值 (O.D.)，扣除對照組之吸光值後，計算每分鐘 NADH 之降解速率 ($\Delta E/\text{min}$)。

5、HADH 酵素活性之計算

$$\text{Units/mL 肉汁} = (\Delta E/\text{min} \times 3 \times \text{肉汁稀釋倍數}) / (6.3 \times 0.1)$$

$\Delta E/\text{min}$ ：平均每分鐘吸光值之差值

3：石英管中混合液之總體積 (mL)

6.3：在波長 340 nm 下 β -NADH 消失係數

0.1：添加稀釋肉汁 mL 數

備註：判定標準以 HADH 酵素活性 5.5 Unit/mL 為界，當測值低於 5.5 Unit/mL 以下者，可判定樣品為冷藏豬肉；測值高於 5.5 Unit/mL 以上者，可判定豬肉為經過冷凍處理。