



1997

Characteristics of reaction between carbon monoxide gas and myoglobin in tuna flesh

Follow this and additional works at: <https://www.jfda-online.com/journal>

Recommended Citation

Chow, C.-J.; Liu, S.-M.; and Tsai, M.-L. (1997) "Characteristics of reaction between carbon monoxide gas and myoglobin in tuna flesh," *Journal of Food and Drug Analysis*: Vol. 5 : Iss. 3 , Article 4.
Available at: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2940>

This Original Article is brought to you for free and open access by Journal of Food and Drug Analysis. It has been accepted for inclusion in Journal of Food and Drug Analysis by an authorized editor of Journal of Food and Drug Analysis.



一氧化碳氣體與鮪肉中肌紅蛋白反應之特性

周照仁* 劉素梅 蔡美玲

國立高雄海洋技術學院水產食品工業科

摘 要

為瞭解一氧化碳 (CO) 氣體與鮪魚肉中肌紅蛋白 (Mb) 反應的特性，因此以黃鰭鮪魚肉片 (厚度1.5~2.0 cm) 為原料經CO氣體處理後，探討CO氣體與鮪肉中Mb結合後的吸收光譜及CO氣體對鮪肉片的滲透力。

將CO氣體直接灌入鮪肉Mb抽出液中10 sec，可以得到MbCO在可見光區域之特定吸收光譜，但經CO氣體處理30 min之鮪肉的Mb抽出液則無MbCO之吸收光譜。即使經120 hr之處理，其鮪肉之 Mb 抽出液並未顯現MbCO之吸收光譜。另外也發現CO氣體的滲透力極慢，需要1~4 hr才能滲透到表面下2~4 mm之中層部位，需要4~8 hr才能滲透到表面下4~6 mm之深層部位。經過CO氣體處理過之鮪肉的Mb抽出液，其570 nm的吸光值會大於580 nm的吸光值，可用來作為區別試樣有否經過CO氣體處理的定性方法。

關鍵詞：鮪魚，一氧化碳，吸收光譜，定性分析。

前 言

近幾年來，本省外銷之冷凍吳郭魚片及部分切成淨肉之鮪肉塊多先經一氧化碳 (CO) 氣體處理使其血合肉或紅色的普通肉呈安定之紅色後再真空包裝、凍結^(1,2)。

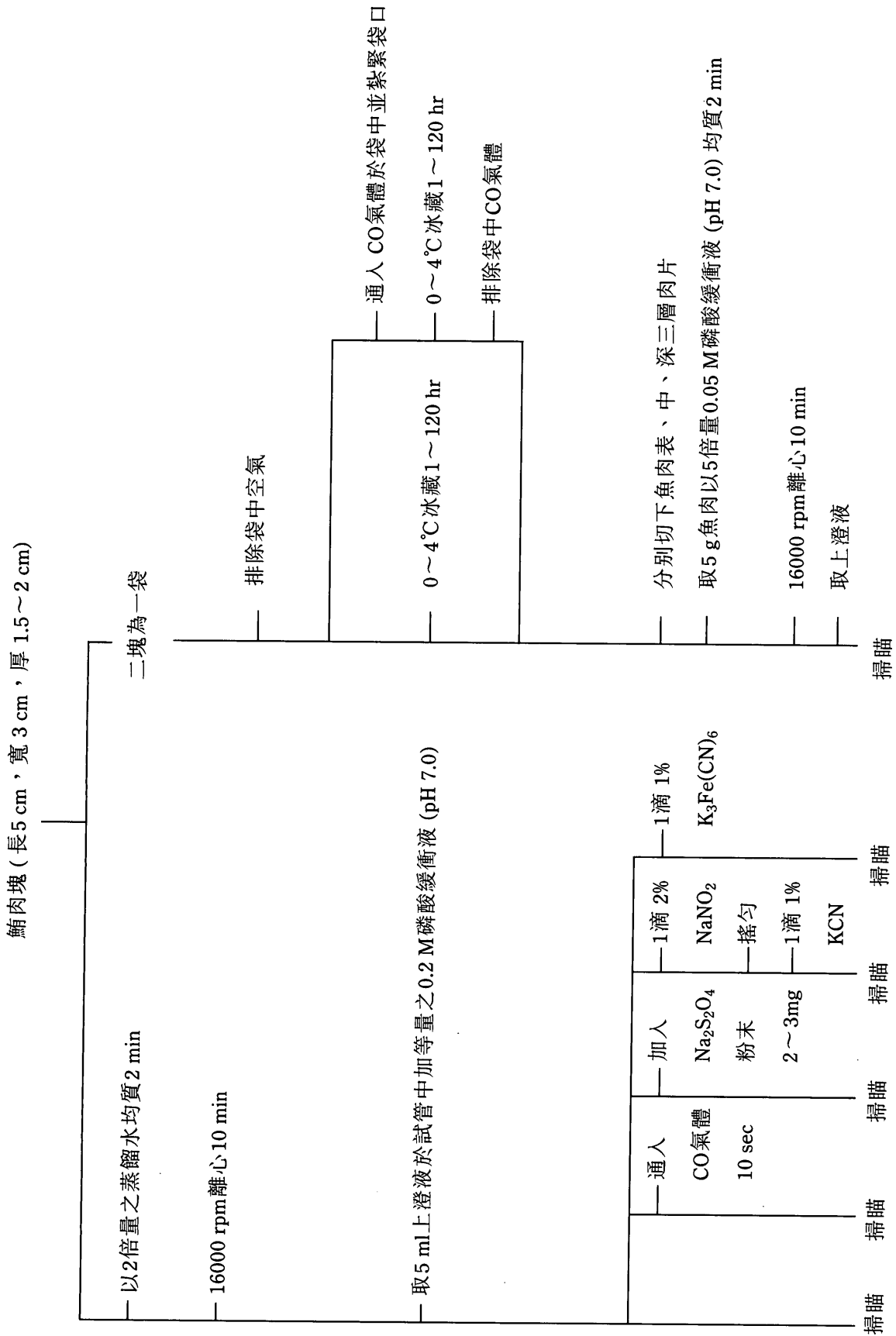
CO氣體對於血紅蛋白 (hemoglobin, Hb) 及肌紅蛋白 (myoglobin, Mb) 均具有極強的親和力，為氧氣的250倍⁽³⁾，所以極易取代 Hb、Mb中的氧氣而形成CO型Hb (HbCO) 或CO型Mb (MbCO)。HbCO與MbCO的顏色為鮮紅色，一旦形成後則不易氧化成褐色之氧化型Mb (metMb)，因此較與空氣接觸後所產生之紅色氧合型Mb (oxyMb) 安定。HbCO與 MbCO之顏色即使於常溫下儲藏或於-20°C下凍藏，均可維持長時間的鮮紅色澤，可有效延長商品之銷售期限。

當CO與Hb或Mb結合時，其原血紅素 (heme) 的可見光區域之吸收光譜會由還原型 (deoxyHb, deoxyMb) 之555 nm最大單吸收波

峰，或由氧合型(oxyHb, oxyMb) 之575 nm 及 540 nm之最大雙吸收峰轉變為CO型 (HbCO, MbCO) 之568 nm及538 nm之最大雙吸收峰⁽³⁾，利用HbCO與MbCO具有特定雙吸收峰之特性，可以掃描吸光法來定量CO氣體中毒者之血液中的HbCO的濃度^(4,5)，或是用來定性鮪肉是否有經過CO氣體的處理⁽⁶⁾。

CO氣體與血液中Hb的結合速率並不快，必須將CO氣體通入圓底燒瓶中之血液15~30min才可得到百分之百的HbCO⁽⁴⁾。因此，以CO氣體處理固態之鮪肉塊，其CO與鮪肉中之Mb的結合速率應該會較CO與血液中之Hb的結合為慢。有關CO與鮪肉中之Mb的結合情形至今仍未有任何報告加以探討，因此，本研究以掃描吸光法來探討鮪肉的抽出液及鮪肉片以CO氣體處理時之Mb光譜圖的變化，嘗試瞭解鮪肉中Mb與CO結合的反應情形。

材料與方法



實驗流程圖

一、材料

(一) 鮪肉

本實驗之原料均購自東港漁市場。將新鮮且未經冷凍的黃鰹鮪(*Thunnus albacares*)，重量約25~35 kg，攜回研究室後，即予以除臟、去頭、去骨、剔除血合肉，以靠近脊椎骨顏色較紅也較均勻之普通肉部位供做實驗用材料。先將魚肉切成長約5 cm、寬約3 cm、厚約1.5~2 cm的魚肉塊。將每塊魚肉塊分別以PE (polyethylene)袋包裝後排盤，置於-60℃的超低温冷凍櫃中，使其迅速凍結，經過36小時後予以脫盤，任取2塊為一組予以分裝，再置於-60℃冷凍櫃中保存，隨時供下列實驗之用。使用前，魚肉塊連同包裝袋置於流水中解凍，至完全解凍後使用。

(二) 氣體及藥品

本實驗所用之CO氣體係由高雄互成氣體

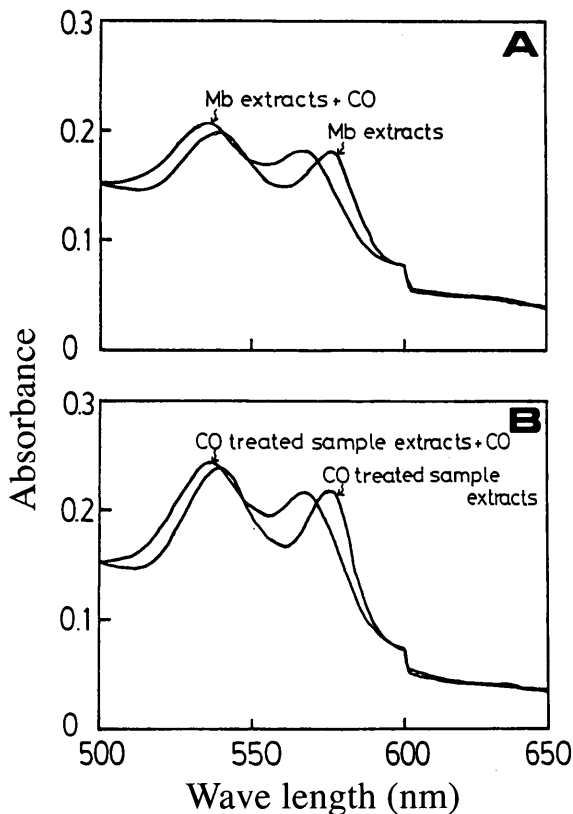


Figure 1. (A) Absorption spectra of yellowfin tuna Mb extracts, before and after CO gas treatment of the Mb extracts. (B) Absorption spectra of the Mb extracts from CO gas-treated yellowfin tuna flesh, before and after further treatment of the Mb extracts with CO gas.

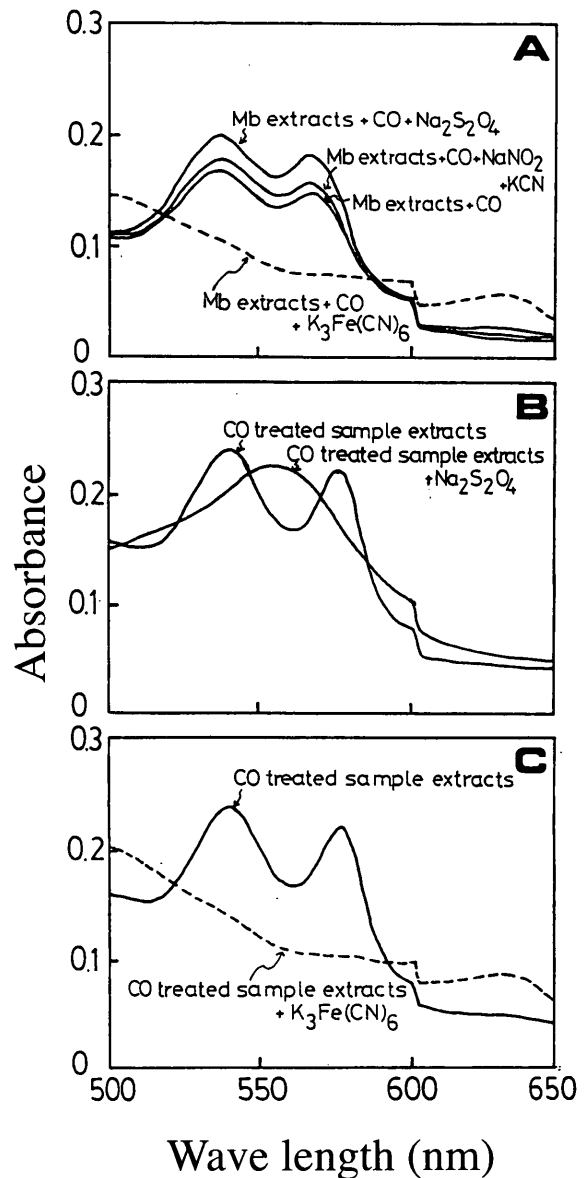


Figure 2. (A) Absorption spectra of yellowfin tuna Mb extracts, after further treatment of the Mb extracts with CO gas, with or without additional treatment of the Mb extracts with a reductant (Na₂S₂O₄ or NaNO₂ + KCN), or an oxidant (K₃Fe(CN)₆). (B) Absorption spectra of the Mb extracts from CO gas-treated yellowfin tuna flesh, before and after further treatment of the Mb extracts with a reductant (Na₂S₂O₄). (C) Absorption spectra of the Mb extracts from CO gas-treated yellowfin tuna flesh, before and after further treatment of the Mb extracts with an oxidant (K₃Fe(CN)₆).

公司所提供由國外原裝進口之CO氣體 (CP級，純度在99.5%以上)。本實驗所使用之化學藥品均為試藥特級及一級， $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 則為工業級。

二、方法

本實驗之架構如「實驗流程圖」，分述如下。

(一)CO 氣體之處理：

將完全解凍之鮭肉塊，平鋪置於乾淨之PE袋中，每袋放置二塊鮭肉，先排除袋中之空

氣後，將CO氣體以細管插入袋子底部，使袋子充滿氣體後抽出細管，以橡皮筋紮緊袋口。為防CO氣體滲漏，其外再套二層PE袋，同樣以橡皮筋紮緊袋口後，置於已鋪有碎冰的保溫箱中保存，並將保溫箱置於冷房(4°C)，隨時注意添加碎冰以保持鮭肉溫度在4°C以下。鮭肉塊在袋中保持單面朝上的方式，經1~120 hr不同時間處理後，間隔一段時間任取一袋供分析之用。

上述鮭肉塊在進行CO氣體處理時，均以同樣大小之鮭肉塊同時做對照實驗，將袋中空氣排除後紮緊袋口，於保溫箱中之碎冰上貯放，每個測試點任取一袋，每袋中均有兩塊魚肉供做比較之用。至於鮭肉的Mb抽出液的處理，則將抽出液置於50 ml之有蓋離心管中，於冰浴狀態下，將CO氣體以玻璃管直接通入離心管液體底部，使CO的氣泡激烈地與溶液直接作用10 sec後，抽出玻璃管並迅速加蓋，供下述實驗或掃描之用。

(二)鮭肉Mb抽出液的製備及掃描

將鮭肉塊直接以2倍量的冰冷蒸餾水均質2 min後抽出，以離心機 (Hitachi refrigerated centrifuge, PR20B2) 於16,000 rpm下離心10 min後，取部份Mb抽出液之上澄液5 ml加等量之0.2 M磷酸鈉緩衝液 (pH 7.0)後，直接以分光光度計 (Hitachi spectrophotometer, U-2000) 掃描；另取部份上澄液5 ml則在加入等量之0.2 M磷酸鈉緩衝液 (pH 7.0) 後，先通入CO氣體10 sec後再用分光光度計掃描。此外，取部份上澄液5 ml，在加等量之0.2 M磷酸鈉緩衝液之後，加入粉末狀 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 少許(2~3mg) 後搖勻、掃描；或直接加1滴 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 後搖勻、再掃描。另有部份上澄液則同樣在加入等量緩衝液後，先滴入1滴 2% Na_2NO_2 搖勻後靜置1 min再加1滴 1% KCN後搖勻、再掃描。

(三)鮭肉片之各層肉的切取及掃描

將鮭肉塊由上而下分別切取正上方的表面約2 mm厚之肉片為表層肉 (surface layer)，其次切取表面下約2~4 mm厚之肉片為中層肉 (middle layer)，再其次為切取表面下約4~6 mm厚之肉片為深層肉 (deep layer)。將三層鮭肉片分別在冰冷之研钵中磨碎之後，取5 g鮭肉以5倍量的0.05 M磷酸鈉緩衝液 (pH 7.0) 抽出，經過離心 (16,000 rpm, 15 min) 後，取其上澄液供分光光度計掃描，並記錄其在525 nm至585 nm之間的吸光值。

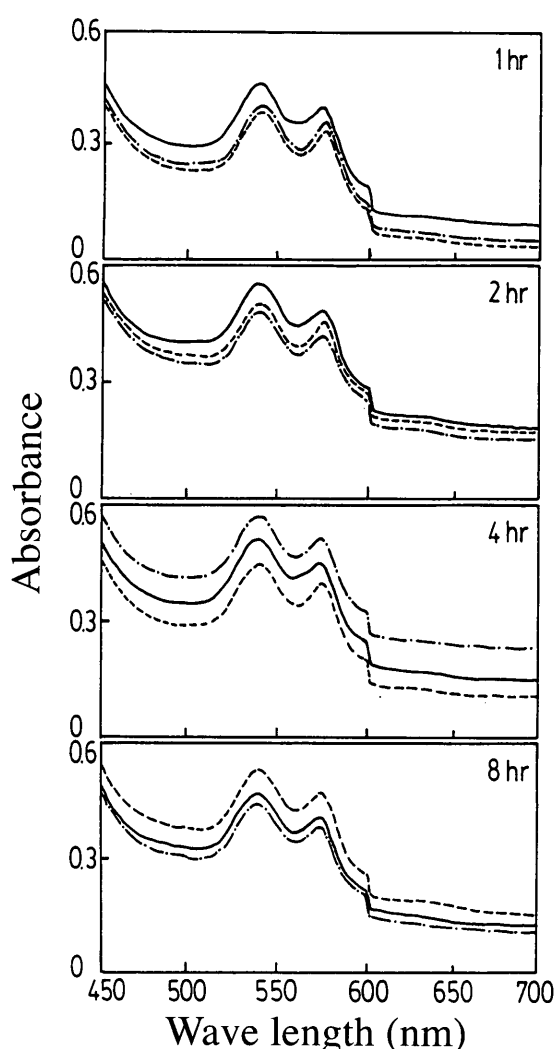


Figure 3. Absorption spectra of the Mb extracts from the superficial, middle, and deep layers of yellowfin tuna steaks during treatment with CO gas for 1~8 hr.

—— surface layer, 0~2 mm from the surface;
- · - Middle layer, 2~4 mm from the surface;
----- Deep layer, 4~6 mm from the surface.

結果與討論

一、CO氣體對鮪魚Mb抽出液及鮪魚肉塊中Mb之影響

將黃鰹鮪魚肉塊之Mb抽出液於分光光度計下掃描，其所得圖型如圖一A所示，在540 nm及575 nm處各有一個吸收峰，屬於oxyMb之吸收光譜，可能是在抽出過程中吸收氧氣而幾乎全部轉成氧合型之故。將該抽出液直接通入CO氣體10 sec後，則顯現出MbCO在538 nm及568 nm處雙吸收峰之吸收光譜。若將黃鰹鮪魚肉塊先經CO氣體處理30 min，再將整塊魚肉塊以2倍水抽出後做成Mb抽出液，則其於分光光度計下之吸收圖型仍屬於oxyMb（圖一B），必須將其Mb抽出液再通入CO氣體後才出現MbCO之吸收光譜。所以由圖一之結果顯示以CO氣體處理鮪肉塊時，CO與Mb的結合速率遠不及以CO氣體直接處理Mb抽出液的速率，鮪魚經過30 min的處理後，所抽出之Mb仍多屬於oxyMb型，並未顯現MbCO之吸收光譜。

其次為瞭解CO與Mb結合後之安定程度，以及其受氧化劑或還原劑的影響，首先以未經CO氣體處理之鮪肉塊的Mb抽出液，於通入CO氣體10 sec使其轉成MbCO後，分別加入還原劑 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ，或加入 NaNO_2 與KCN，結果顯示Mb抽出液仍顯示MbCO型（圖二A）；但在加入氧化劑 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 後，則Mb抽出液顯示出metMb型。此結果意味著，MbCO型相當安定，即使加入還原劑 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 或 NaNO_2 ，仍維持其MbCO型，而所加入還原劑將部份metMb還原成deoxyMb，deoxyMb又與CO氣體結合成MbCO，因此其吸收光譜較未加入還原劑者為強。但MbCO溶液一旦接觸氧化劑 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 則會被氧化成為metMb，因而消失其MbCO型的吸收光譜（圖二A）。若將已經過CO氣體處理30 min之鮪肉塊，以水抽出後，所得之Mb抽出液屬於oxyMb（圖二B及二C）；因此在分別加入還原劑 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 及氧化劑 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 之後，會分別各顯示出deoxyMb型及metMb型之吸收光譜，尤其圖二B中未見有MbCO型之光譜，可以瞭解鮪肉塊中之Mb仍多屬deoxyMb或oxyMb，也顯示CO氣體對鮪肉的滲透能力相當緩慢。

二、CO氣體對鮪肉塊之滲透力

將鮪肉塊（5×3×2 cm）以CO氣體處理1

~8 hr時，鮪肉塊之表層、中層及深層肉分別萃取，所得Mb抽出液之吸收光譜如圖三所示，以CO氣體處理鮪肉塊1 hr，僅有表層肉之Mb抽出液之吸收光譜略顯不同，其短波長（540 nm）之吸收峰仍與oxyMb一致，但長波長（574 nm）之吸收峰則有較oxyMb略為偏左之現象，而與中層肉、深層肉之吸收峰（576 nm）略顯不同。

CO氣體處理鮪肉塊2 hr後，其表層、中層及深層肉之Mb抽出液之吸收光譜仍與1 hr處理肉相似，但以CO氣體處理鮪肉塊4 hr後，其表層肉及中層肉之吸收光譜均顯示在長波長（574 nm）之吸收峰有較oxyMb之長波長（576 nm）略為偏左之現象，而與深層肉之吸收峰不同。

鮪肉塊經過CO氣體處理8 hr後，其深層肉之吸收光譜也與表層肉、中層肉相似，其長波長之吸收峰已偏左至574 nm處。而表層肉與中層肉在此階段的處理過程中，並無任何進一步之變化，與圖一或圖二中Mb抽出液MbCO型之吸收峰有明顯之不同。

為了進一步瞭解更長的CO氣體處理時間是否可以得到如圖一、二中之MbCO型的538 nm及568 nm吸收峰，將鮪肉塊經過120 hr之CO氣體處理，結果如表一所示。表一中之對照組在5天的放置過程中，其表層肉、中層肉及深層肉的Mb抽出液均顯示在540 nm（數據未列）及576 nm附近有明顯的吸收峰，而表層肉並無明顯之metMb的500 nm及630 nm的吸收峰，顯示鮪肉塊仍以oxyMb為主。而以CO氣體處理之鮪肉塊，其表層肉由處理1 hr開始，中層肉由處理1~2 hr開始，深層肉則由處理4~8 hr開始至120 hr為止，均只顯現在540 nm（數據未列）及574 nm有吸收峰，其後再無明顯之變化，並無如圖一、二中MbCO型在538 nm及568 nm之吸收峰。

由以上圖三及表一之結果可以得知CO氣體滲透入鮪肉塊的速度相當緩慢，處理1 hr僅及表層2 mm處，處理約2 hr才滲透到表層下2~4 mm，處理約4 hr以上才能到達表層下4~6 mm處。圖三中樣品之滲透速度與表一中之樣品略顯不同，可能與肉中油脂含量多寡或採樣切下2 mm厚之肉片的均勻度不同所造成。其次，CO氣體滲透入魚肉塊內部時，其與Mb結合後，並未顯現出MbCO型應有之吸收光譜，即使以CO氣體長時間處理魚肉仍未能得到MbCO型之光譜。因此，推測此種現象產生的

Table 1. Wave length of maximal absorption and absorbance at 570 and 580 nm of Mb in the aqueous extracts from yellowfin tuna steaks during treatment with CO gas

Treatment time (hr)	Sample ^a parts	Control			CO gas treated sample		
		λ max(nm)	Absorbance		λ max(nm)	Absorbance	
			570nm	580nm		570nm	580nm
0	S	576,577	0.445	0.462	-	-	-
	M	577	0.465	0.484	-	-	-
	D	477	0.450	0.468	-	-	-
1	S	576,577	0.373	0.395	574,575	0.419	0.404
	M	576,577	0.382	0.402	575,576	0.427	0.423
	D	576,577	0.350	0.370	576,577	0.422	0.438
2	S	577	0.416	0.435	574	0.497	0.469
	M	576,577	0.352	0.370	575	0.463	0.455
	D	576,577	0.477	0.495	576,577	0.467	0.475
4	S	576,577	0.381	0.401	573,574	0.469	0.438
	M	576,577	0.378	0.397	575	0.517	0.497
	D	577	0.357	0.377	575	0.412	0.404
8	S	576,577	0.438	0.456	574	0.435	0.409
	M	577	0.426	0.441	574	0.425	0.401
	D	576,577	0.403	0.418	575	0.483	0.462
24	S	576,577	0.293	0.313	575	0.345	0.336
	M	577	0.328	0.346	575,576	0.291	0.288
	D	576,577	0.297	0.314	575	0.327	0.322
48	S	576,577	0.401	0.415	575	0.575	0.562
	M	576,577	0.374	0.390	575	0.583	0.570
	D	576	0.327	0.340	574,575	0.519	0.492
72	S	576	0.553	0.565	574,575	0.658	0.627
	M	576,577	0.410	0.426	575	0.414	0.394
	D	576	0.385	0.393	574,575	0.609	0.583
96	S	576,577	0.410	0.426	575	0.414	0.394
	M	576	0.363	0.378	574,575	0.401	0.381
	D	576,577	0.445	0.458	574,575	0.425	0.402
120	S	576,577	0.475	0.490	574,575	0.450	0.427
	M	577	0.385	0.397	575	0.418	0.404
	D	576,577	0.399	0.410	574,575	0.349	0.332

^a S: surface layer, 0~2 mm from the surface; M: Middle layer, 2~4 mm from the surface; D: deep layer, 4~6 mm from the surface.

可能原因有下列三個：(1) CO氣體在溶入肌肉細胞液中並逐漸擴散入內部的過程中，只能與肌漿中部份之Mb結合，亦即僅有少量Mb可與CO結合而產生MbCO，絕大部份之Mb仍處於deoxyMb或oxyMb之狀態，因此所得之吸收

光譜幾乎以oxyMb為主，而少量MbCO的存在使光譜略向左偏移。(2) CO氣體在擴散進入肌肉的細胞液後，由於CO必須以溶解於液體中之狀態才能與Mb結合，所以其與CO氣體直接大量灌入Mb溶液與Mb結合而生成MbCO型之

結合方式有所不同，亦即前者的結合狀態可能為疏鬆之結合，呈現產生540 nm處之吸收峰不變，只有長吸收峰處產生輕微之偏移(如圖三)，而後者的結合狀態較緊密，所以有明顯之MbCO型之吸收光譜。(3) CO氣體與Mb結合屬於可逆性的反應，雖然CO氣體對Mb的結合能力為氧氣的250倍⁽³⁾，但是在Mb被抽出的過程中，再度又與空氣中大量的氧氣接觸，其CO氣體又被氧氣取代置換出來，所以在抽出後無法顯出MbCO型吸收光譜，反而顯現接近oxyMb型之吸收光譜。唯，上述三種可能的原因仍有待進一步之探討與證明。

由圖三及表一之結果可以發現由於CO氣體處理肉之圖譜與對照肉之圖譜的差距極小，實難分辨CO氣體處理肉與未處理肉之差別。惟，表一中，隨著CO氣體處理時間的延長，鮪肉各層Mb抽出液在570 nm及580 nm處之吸光度會有明顯改變，當以CO處理鮪肉塊1 hr與對照肉相比較，其570 nm吸光值也轉而大於580 nm吸光值，而其中層肉、深層肉Mb抽出液則仍處於570 nm吸光值小於580 nm吸光值之狀態，當以CO處理鮪肉塊2 hr，則表層肉與中層肉Mb抽出液之570 nm的吸光值大於580 nm吸光值，而深層肉Mb抽出液仍處於570 nm吸光值小於580 nm吸光值之狀態；當以CO處理鮪肉塊8 hr，則表層、中層及深層肉Mb抽出液均顯示570 nm的吸光值大於580 nm吸光值之現象。此種吸光值之改變與圖三中之吸收圖譜比較，應可推斷為Mb與CO結合之後，原來應有之568 nm吸收峰處吸光度會略為增強，因而導致570 nm處的吸光值提高；反之，未與CO結合的Mb，不論deoxyMb或oxyMb，在抽出過程中會與氧氣結合，因此在575 nm處有oxyMb的吸收峰，則其580 nm處的吸光值便會較570 nm處的吸光值為高。因此，利用此種吸光值的差異似可做為鮪肉有否經過CO氣體處理的定性方法，亦即只要將鮪肉用中性磷酸緩衝液抽出，離心後測定其上澄液之570 nm與580 nm的吸光值，若570 nm吸光值等於或小於580 nm吸光值，應可推斷為CO氣體未處理肉，反之，若570nm吸光值大於或580nm吸光值，則可推斷為CO氣體處理肉。此外，由於表層肉與CO氣體的反應最快，因此試料的採樣似以表層肉的部位為宜，其可靠性也最高。

阿部等⁽⁶⁾，利用MbCO具有雙吸收峰之特性來做為鮪肉的定性方法時，發現CO處理過

的試樣肉之Mb抽出液在538 nm及572 nm處有雙吸收峰，未處理肉之Mb抽出液則在540 nm及576 nm處有雙吸收峰，然後必須分別添加Na₂S₂O₄還原劑，再分別掃描，前者會轉為540 nm及566 nm處之雙吸收峰，而後者則變為552 nm之單吸收峰。亦即試樣肉經抽出Mb後需先掃描一次，經添加還原劑後再掃描一次，如此方可確認試樣有否經過CO的處理。所以與彼等的方法比較，本研究所採用的定性方法似乎較為簡單也較為迅速。

謝 辭

本研究計畫承蒙行政院農業委員會補助全部經費，計畫編號為84科技-2.8-糧-45，實驗期間承本校朱玉灼老師之協助，使實驗得以順利完成，僅此一併深致謝忱。

參考文獻

1. 行政院衛生署。1995。84.8.19衛署食字第84039148號公告。台北市。
2. 商品檢驗局。1995。銷日吳郭魚片不可使用一氧化碳處理。冷凍水產公會會訊58:7。
3. Di Iorio, E. E. 1981. Preparation of derivatives of ferrous and ferric hemoglobin. *Methods in Enzymology* 76: 57-72.
4. 黑岩幸雄。1994。有害性ガスおよび揮發性薬毒物の検索。裁判化學。49-80頁。吉村英敏編。南山堂。東京。日本。
5. 日本藥學會。1992。有害性ガス試験法。薬毒物化學試験法と注解。57-74頁。日本藥學會編。南山堂。東京。日本。
6. 阿部政夫、宮崎仁志、永井祐治、中島正博、宮部正樹。1994。ガスクロマトグラフによる魚肉中の一酸化炭素の分析。名古屋市衛生研究所報 40: 10-15。

Characteristics of Reaction between Carbon Monoxide Gas and Myoglobin in Tuna Flesh

CHAU-JEN CHOW*, SUE-MEI LIU AND MEI-LIN TSAI

National Kaohsiung Institute of Marine Technology, Kaohsiung, Taiwan, R. O. C.

ABSTRACT

In order to understand the characteristics of the reaction between carbon monoxide (CO) gas and myoglobin (Mb) in tuna flesh, yellowfin tuna steaks (thickness 1.5~2.0 cm) were treated with CO gas. After treatment, the absorption spectrum of the Mb and the penetration of CO gas into the tuna flesh were analyzed.

The specific spectrum of MbCO within the visible range was observed after bubbling CO gas directly into Mb extracts for 10 seconds. However, characteristic MbCO spectrum was not found for the Mb extracts from the tuna steaks treated with CO gas for 30 minutes. Neither was it found for the extracts from tuna steaks treated with CO for 120 hours. The penetration of CO gas into the tuna flesh was very slow. It took about 1~4 hours for CO to penetrate to 2 to 4 mm under the surface. The penetration time to reach 4 to 6 mm under the surface was about 8 hours.

The Mb extracts from tuna flesh treated with CO gas had higher absorbance at 570 nm than at 580 nm. This characteristic could be used to determine whether a sample had been treated with CO gas.

Key words: tuna, carbon monoxide, absorption spectrum, qualitative analysis.