

## 牙鲆在保藏过程中影响ATP关联化合物降解的因素

吴依蒙<sup>1,2</sup>, 陈舜胜<sup>1\*</sup>, 今野久仁彦<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 日本北海道大学水产学部, 日本北海道 函馆 041-8611)

**摘要:** 为了深入了解牙鲆体内ATP关联化合物的变化, 尤其是肌苷酸(IMP)降解这一限速步骤, 利用高效液相色谱法(high efficiency liquid chromatography, HPLC)测定不同保藏条件下牙鲆体内ATP关联化合物和K值变化, 并探讨了影响其变化的因素。结果显示, 0 °C保藏条件下牙鲆体内ATP在1 d内迅速降解, 产生IMP作为初期的主要积累物质, 蓄积一段时间(10 d)后迅速降解为次黄嘌呤(Hx), IMP的降解过程呈现二相性; 鱼肉制成鱼糜形态保藏, ATP 0 d时几乎降解完全, 但IMP的降解过程仍旧呈现二相性; 加入抗菌素的鱼肉中微生物的生长得到有效抑制, 此时IMP降解缓慢并且呈线性下降, 原本的蓄积过程消失, K值的增长速率也随之减慢; 加入Tritonx-100破坏细胞膜结构发现, 牙鲆体内IMP的降解速率加快, 同时K值的增长速率也随之加快。结果表明, 牙鲆的保藏形态影响ATP的降解速率, 但几乎不影响其他关联产物的降解变化; 保藏后期外源微生物产生的酶与内源酶的叠加作用是导致保藏后期IMP加速降解、从而呈现二相性的原因, 微生物是影响ATP关联化合物降解的关键因素; 表面活性剂通过改变细胞膜结构也能够影响IMP的降解过程。

**关键词:** 牙鲆; ATP关联化合物; 外源IMP降解酶; K值

**中图分类号:** TS 254.4

**文献标志码:** A

鲜度是影响水产品品质的一项重要指标, 水产品的价值主要取决于鲜度的高低。冰藏是能够抑制微生物生长繁殖和生物自身酶系统催化等生化反应的有效手段之一<sup>[1]</sup>, 但低温保藏条件下鱼体内部仍会发生一系列的变化, 从而导致鱼肉质量与风味的改变<sup>[2-3]</sup>。目前主要用感官、微生物、蛋白质、物理方法、挥发性物质及K值等指标来评价鱼类的鲜度。其中, K值以ATP的降解为基础, 反映了鱼体死后早期阶段的生化进程, 保藏早期阶段灵敏度高且与感官评定相关性良好<sup>[4-5]</sup>, 可用作鱼类鲜度评价的良好指标。

鱼类死后体内ATP迅速经由二磷酸腺苷(ADP)、腺苷酸(AMP)降解为肌苷酸(IMP), IMP再降解为次黄嘌呤腺苷(HxR)和次黄嘌呤

(Hx)在体内累积, 这些核苷酸被统称为ATP关联化合物<sup>[6]</sup>。整个过程由鱼体内源酶系统催化<sup>[7]</sup>, 受到保藏时间、温度和微生物等因素的影响, 真实地反映了鱼肉鲜度的变化历程。其中, IMP降解生成HxR这一步骤进行十分缓慢, IMP在一段时期内保持高含量的积蓄状态, 被视为最关键的限速步骤<sup>[8]</sup>; 由于IMP是鱼肉中重要的鲜味呈味物质<sup>[9]</sup>, 因此, 阐明IMP保持在高含量的积蓄时间对于食用鱼肉的研究具有重要意义。Saito等<sup>[10]</sup>首次提出将HxR与Hx之和与ATP关联化合物之和的比值定义为K值, 作为衡量鱼类死后早期新鲜程度的重要化学指标, 受到国内外学者广泛应用。K值的测定方法主要有HPLC法、比色定量法<sup>[11]</sup>、酶法<sup>[12]</sup>、氧化还原法<sup>[13]</sup>和pH感应

收稿日期: 2016-02-29 修回日期: 2016-05-03

资助项目: 国家自然科学基金(31471685)

通信作者: 陈舜胜, E-mail: sschen@shou.edu.cn

器法<sup>[14]</sup>等。

Kamalakanth等<sup>[15]</sup>对黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)进行的研究表明, K值与微生物、感官、挥发性物质等指标具有较好的相关性。李燕等<sup>[16]</sup>研究了不同保藏温度下罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的鲜度变化, 结果表明低温保藏环境能够抑制细菌的繁殖并延长虾肉的保存时间, 但虾肉的质构会变软。然而, 关于不同保藏条件下鱼类ATP及其关联产物的含量变化规律, 尤其是关于对IMP降解这一关键步骤的研究探讨较少, 也未对鱼体内ATP及其关联产物的变化相关因素进行探讨。

本研究以牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)为研究对象, 采用高效液相色谱法(HPLC)探讨了不同保藏条件下牙鲆体内ATP关联化合物含量的变化以及影响其变化的因素, 对IMP的积蓄时间和降解阶段呈现的二相性进行了深入研究, 旨在为鱼类保藏保鲜提供科学有效的理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及处理

**实验材料** 牙鲆采购于日本生鲜市场, 购入后置于盛满冰块的冷藏箱, 迅速运回实验室。

**样品处理** 活鱼即杀后, 沿脊椎剖为两半, 去除鱼皮, 取脊背肉, 去除红色肉和白色油脂, 取背部白色肌肉切成约1 cm厚的鱼片, 取30 g鱼肉用食品保鲜膜包裹, 于0 °C冰箱中保藏20 d。

**牙鲆鱼糜的制备** 处理好的鱼肉经食品料理机处理1 min制成鱼糜, 取30 g用食品保鲜膜包裹, 于0 °C冰箱中保藏20 d。

**牙鲆鱼糜与添加化合物混合** 制成鱼糜的同时加入150 mg/kg的氯霉素(5% Tritonx-100), 混合、绞碎处理1 min制成鱼糜。各取30、15和15 g鱼糜用食品保鲜膜包裹, 分别于0、10和20 °C恒温箱中保藏20、3和1 d。

以上所有过程均在冰上(0 °C)操作完成。

### 1.2 实验试剂与设备

PU-2089型高效液相色谱和UV-2075型紫外检测器(日本 JASCO公司), BP221S型电子天平(德国 Sartorius公司), H3FR型超速冷冻离心机(日本 KOKUSAN公司), AS ONE Rexim RS-IA 磁力搅拌器, F-21pH计(日本 HORIBA公司), UVmin-1240分光光度计(日本 SHIZUMADZU公司), 食

品料理机(德国 BRAUN公司), 22×20食品保鲜膜(日本 旭化成), TWINBIRD FPSC恒温冷藏/冷冻冰箱等。

氢氧化钠、氢氧化钾、高氯酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、ATP、ADP、AMP、IMP、HxR和Hx标准品溶液、氯霉素、聚乙二醇辛基苯基醚等化学药品购自日本和光纯化学物质有限公司, 均为分析纯。

### 1.3 实验方法

**鱼肉中ATP关联产物的提取** 鱼肉样品用剪刀剪碎取约1 g置入50 mL离心管, 鱼糜样品直接称取1 g置入50 mL离心管, 加入5%的高氯酸(PCA)10 mL, 玻璃棒捣碎充分提取核苷酸后加入1 mol/L KOH调节pH至2.0~2.5, 加水定容至20 mL, 低温离心(4 °C, 3000 r/min, 15 min), 取上清液过0.45 μm滤膜, 与0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)1:4混合后HPLC测定。整个过程均在0 °C下操作。

**ATP关联产物的测定** 参考经典的ATP关联产物提取方法<sup>[17]</sup>并略有改动。ATP、ADP、AMP、IMP、HxR和Hx标准混合物在相同的条件下进行测定, 并绘制标准图谱。与标准品的保留时间和峰面积对比确定鱼肉样品中ATP及其降解产物的种类与含量。色谱条件: 色谱柱Shodex Asahipak GS-320HQ, 用pH 2.7的1 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>的混合溶液洗脱。进样量20 μL, 流速0.8 mL/min, 波长256 nm处检测。

**鲜度指标K值计算** K值的计算公式<sup>[8]</sup>:

$$K(\%) = \frac{HxR + Hx}{(ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx)} \times 100$$

式中, ATP、ADP、AMP、IMP、HxR和Hx分别代表各化合物的浓度(μmol/g, 新鲜鱼肉)。

### 1.4 数据处理

应用Microsoft Excel 2007和SPSS 19.0软件对实验结果进行统计分析, 在单因素方差分析的基础上采用Duncan多重比较法进行分析, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 低温保藏条件下牙鲆体内ATP关联化合物的变化

样品鱼肉于0 °C下, 按“ATP关联产物测定”的方法预处理得到ATP及其关联产物提取液, 利

用HPLC法测定各成分含量(图1)。结果显示,牙鲆体内ATP是按照 $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow IMP \rightarrow HxR \rightarrow Hx$ 途径代谢的。ATP含量在1 d内迅速下降,这与ATP降解酶的高活性有关。Watabe等<sup>[18]</sup>对ATP酶进行了研究,认为在低温环境下鱼肉肌浆网状结构组织吸收 $Ca^{2+}$ 能力下降,从而使肌浆纤维内 $Ca^{2+}$ 浓度增加, $Mg^{2+}$ -ATP酶又被 $Ca^{2+}$ 激活促使ATP迅速降解。ADP、AMP一直维持在较低水平,说明ATP转化生成ADP和AMP的过程进行得非常迅速,即ATP、ADP、AMP各自对应的降解酶活性非常高。AMP降解生成IMP,1 d内IMP迅速升高( $P < 0.05$ ),含量由0.47 mmol/kg上升至8.84 mmol/kg,此后10 d左右时间内维持在较高的水平并处于积蓄状态,这与杨文鸽等<sup>[19]</sup>发现大黄鱼(*Larimichthys crocea*)在冰藏期间IMP有积累趋势的研究结论一致。10 d左右IMP开始急剧降解( $P < 0.05$ ),下降幅度高达99%。IMP的含量变化经历了3个阶段:增长—蓄积—下降。

Hx由IMP经由HxR降解生成,鱼肌肉中HxR含量一直维持在较低的水平,说明HxR降解酶的活性极高。而Hx持续累积,10 d后急剧上升( $P < 0.05$ ),16 d达到最高值8.38 mmol/kg。与IMP含量变化趋势几乎呈镜像关系。Hx味苦涩,为产生异味的物质,随着保藏时间的延长,Hx逐渐累积,最终导致鱼体产生异味,可作为判断鱼类腐败的化学指标<sup>[20]</sup>。此外,鱼类可根据体内HxR与Hx蓄积量的不同分为3种类型:①HxR型:如日本鲈(*Pneumatophorus japonicus*)、鲉(*Katsuwonus pelamis*);②Hx型:如鳎(*Pleuronichthys cornutus*)类;③中间型:如鲈(*Lateolabrax japonicus*)、大麻哈鱼(*Oncorhynchus*)

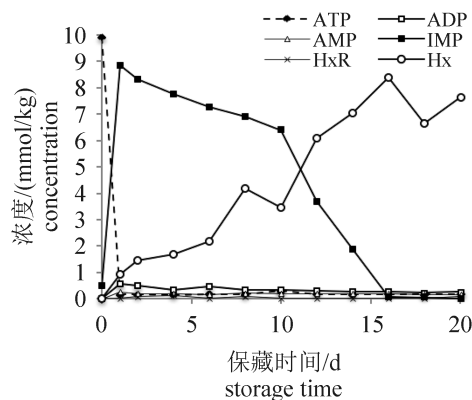


图1 0 °C下牙鲆肌肉中ATP关联产物的含量变化

Fig. 1 Changes of ATP-related compound composition in bastard halibut meat block at 0 °C

等<sup>[19]</sup>。牙鲆冰藏期间主要以Hx为蓄积物,因此属于Hx型。

IMP是鱼肉鲜味的标志性物质<sup>[21]</sup>,作为鱼肉的主要鲜味物质,阐明IMP保持在高含量的积蓄时间具有重要意义。IMP的降解主要经历了蓄积—急速下降2个阶段,降解过程出现拐点,呈现二相性。IMP的降解速率与IMP降解酶的活性紧密相关,且鱼类死后的主要变化来源于微生物生长繁殖和自体酶系统的催化反应<sup>[1]</sup>,研究分析IMP后期突然加速降解可能与IMP降解酶和微生物作用有关。

## 2.2 不同形态的牙鲆鱼肉在低温保藏过程中ATP及其关联产物的变化

0 d时鱼糜中ATP含量为0.42 mmol/kg,而IMP已达最高峰,说明绞碎鱼肉能够促使ATP立刻降解并转化为IMP的形式蓄积(图2),此后ATP一直维持低含量。ATP的迅速降解与细胞膜结构上的 $Ca^{2+}$ 有关:鱼肉在绞碎过程中破坏了部分细胞肌浆网质结构,使得吸附在膜上的 $Ca^{2+}$ 大量释放入胞浆中,从而激活了 $Mg^{2+}$ -ATP酶使ATP迅速分解<sup>[18]</sup>。

与鱼块(图1)对比,由于ATP的快速降解,IMP的起始浓度增高至9.60 mmol/kg,但IMP的降解过程并没有变化,10 d时IMP含量仍高达6.84 mmol/kg,平均每天下降0.28 mmol/kg,10 d后IMP开始加速降解( $P < 0.05$ ),18 d时IMP就已几乎完全降解,平均每天下降0.86 mmol/kg,降解速率几乎是10 d前的4倍。可见,IMP的降解仍旧呈现为前期变化十分缓慢,处于蓄积状态,后期降解速率突然加快,呈现二相性。

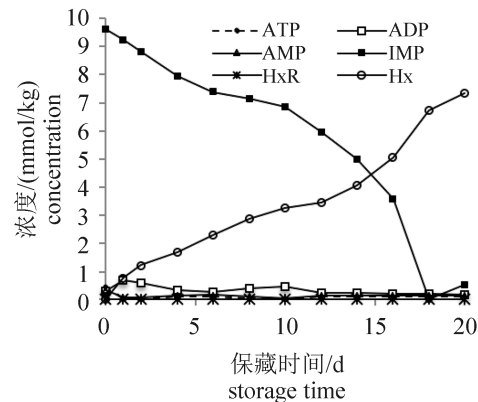


图2 0 °C下牙鲆鱼糜中ATP关联产物的含量变化

Fig. 2 Changes of ATP-related compound composition in bastard halibut ground meat at 0 °C

本实验中的样品均为鱼糜。另外, 由于牙鲆低温保藏下ATP关联产物的主要变化集中在ATP、IMP及Hx, 因此本实验主要集中关注ATP、IMP及Hx的含量变化。

### 2.3 微生物对ATP关联化合物降解的影响

冷藏过程中, 样品鱼肉在10~12 d开始散发出腐败的异味, 此时微生物已开始生长繁殖。氯霉素(chloramphenicol)是一种能够有效抑制细菌生长的抗菌素, 它的抑菌谱广、性质稳定、抑菌效果出色且价格低廉, 目前广泛应用于家畜、禽类的治疗。本实验样品中加入氯霉素以有效抑制微生物的繁殖, 并观察微生物在生长受到抑制的情况下ATP关联化合物的变化, 冰藏后期样品鱼肉不再散发异味, 需要指出的是此时IMP降解酶的活性并未受到抑制。然而其ATP降解化合物的含量变化和K值却呈现出与“低温保藏条件下鱼肉中ATP关联化合物的变化”不同的结果。

低温保藏条件下微生物对ATP关联化合物及K值的影响 0 °C冰藏条件下加入抗菌素的样品中, IMP含量下降速率减缓(图3), 呈单一的线性而非之前的二相性, 蓄积阶段并未出现。20 d时, IMP含量仍高达5.26 mmol/kg, 而未添加抗菌素鱼肉中的IMP在同一时期早已完全降解(图2)。同时, IMP降解生成Hx的速率也随之减缓, Hx含量呈线性增长。加入抗菌素的样品K值上升速率明显低于对照组(图4), 这是由于IMP降解速率降低从而导致代谢生成Hx的速率缓慢。说明加入抑菌剂抑制微生物的生长繁殖, 能够延缓IMP的降解速率, 从而延缓K值的上升, 起到保持鱼体鲜度作用。

加入抗菌素抑制微生物的生长, IMP的含量呈单一线性下降, 由于抗菌素性质稳定, 对内源酶活性不会产生影响, 即内源IMP降解酶的活性和单位浓度是相对稳定的; 随保藏时间的增长, 鱼体内生长繁殖出大量细菌, 这些细菌会分泌一些外源酶(如微生物源的蛋白质水解酶)参与鱼体内部的代谢活动, 导致鱼肉逐渐腐败变质<sup>[22]</sup>。童铃<sup>[22]</sup>于0 °C保藏温度下测定扁舵鲹(*Auxis thazard*)菌落总数发现, 0~6 d细菌总数维持在较低水平, 直到第9天才开始大量繁殖。在微生物

影响的情况下, IMP的降解在后期(10 d左右)突然加速, 可能是微生物在保藏后期10 d左右开始大量繁殖并产生了诱导IMP降解的外源酶, 从而使使得保藏后期IMP突然加速分解, 呈现二相性(图1, 2)。由于微生物在各种鱼类体内均存在, 因此推断其他鱼类中也存在该现象。Seki等<sup>[23]</sup>也发现, 加入细菌的金枪鱼IMP降解酶粗酶提取液中, IMP的降解速率更快。因此, 在鱼肉的保鲜过程中应当注意对微生物的防控。

常温保藏条件下微生物对ATP关联化合物降解的影响 由于温度对鱼类的代谢具有重要影响<sup>[24]</sup>, 实验进一步研究了在10和20 °C保藏条件下微生物对IMP降解的影响, 0 °C下, 14 d时IMP含量为1.38 mmol/kg, 10 °C下IMP在2 d时几乎就已全部降解, 而20 °C下IMP在5 h时就几乎消失(图5)。IMP在10和20 °C保藏条件下迅速降解, 且随温度的升高IMP降解速率加快, 这是由

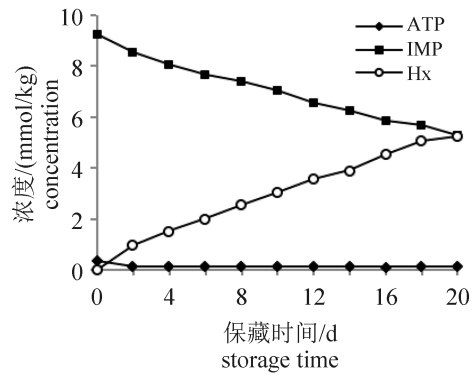


图3 加入抗菌素的鱼糜中ATP关联产物的变化(0 °C)

Fig. 3 Changes of ATP-related compound composition in ground meat with antibiotics

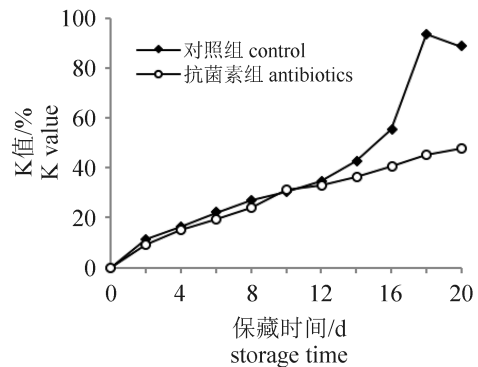


图4 加入抗菌素鱼糜的K值变化(0 °C)

Fig. 4 K-value of ground meat with antibiotics

于伴随温度的升高, IMP降解酶活性逐渐增强, 加速了IMP的分解。抗菌素产生的减缓IMP降解的现象在10和20 °C下仍然存在但不明显。这可能是由于内源的IMP降解酶随温度升高活性逐渐

增强, 且在上述温度下已经足够活跃, 在微生物滋长之前IMP就已经迅速降解, 因而微生物源的IMP降解酶的叠加作用不明显。因此, 在鱼肉的保鲜过程中应当注意对温度的控制。

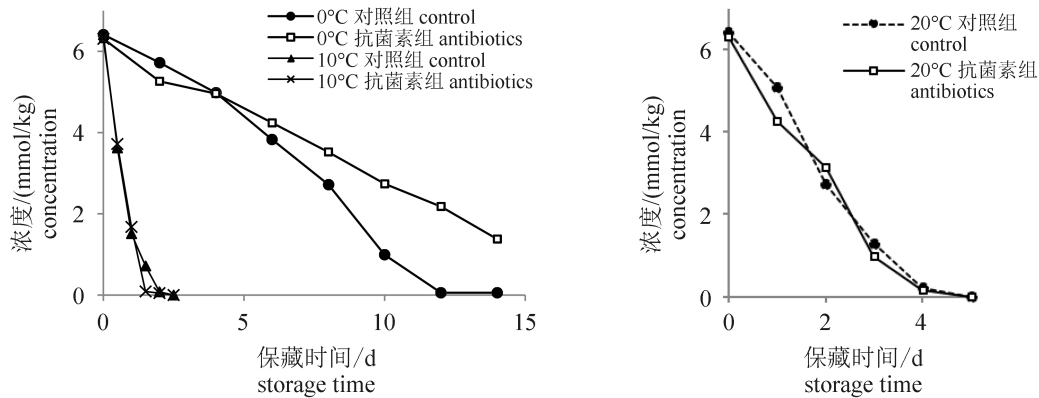


图5 不同保藏温度下加入抗菌素的鱼糜中IMP的含量变化

Fig. 5 Changes of IMP in ground meat with antibiotics at different temperatures

#### 2.4 细胞膜结构对ATP关联化合物降解的影响

5'-核苷酸酶是催化IMP降解反应的主要酶之一, 而根据该酶在细胞的存在位点可分为两类, 一是胞浆形, 二是膜结合形<sup>[25]</sup>, 参与IMP降解的酶主要是游离在细胞质中的胞浆形, 膜结合形的酶则较为稳定。表面活性剂通过破坏细胞膜结构促使膜结合形IMP降解酶的空间位置发生改变, 从而影响了IMP的降解。

Triton X-100化学名称为聚乙二醇辛基苯基醚, 是一种优良的非离子型表面活性剂, 在免疫细胞化学中常被用做细胞膜裂剂或细胞膜通透剂, 通过溶解细胞膜上的脂质使抗体及大分子结构物质进入胞浆内, 同时改变细胞内环境。本实验通过在鱼糜中加入5% Triton X-100破坏细胞膜结构, 探讨细胞膜结构的改变对IMP降解变化的影响。为了排除微生物对IMP降解的影响, 实验加入氯霉素抑制微生物生长, HPLC法测定ATP关联产物变化及K值的结果, 以加入氯霉素的样品为对照组进行对比。

低温保藏条件下表面活性剂对ATP关联化合物及K值的影响 0 °C冰藏条件下, IMP迅速降解, 呈线性下降趋势, 16 d时几乎降解完全(图6), 而没有添加表面活性剂的对照组在16 d时IMP仍高达6.23 mmol/kg(图3), 说明了Triton X-100

的存在加速了IMP的降解, 同时, Hx的生成速率也随之加快。其余核苷酸的含量变化与对照组基本相同。加入表面活性剂的样品组K值的上升速率明显高于对照组(图7), 这是由于在表面活性剂的作用下, IMP加速降解, 从而生成Hx的速率加快, 导致K值的快速升高。

一方面, Triton X-100作为一种表面活性剂, 能够溶解细胞膜脂质结构, 释放出大量吸附在膜上的5'-核苷酸酶, 与原本游离在胞浆中的5'-核苷酸酶叠加, 共同诱导IMP进行代谢反应, 即参与代谢反应的酶的单位浓度增加导致IMP加速降解; 另一方面, 由于表面活性剂的分散、助悬

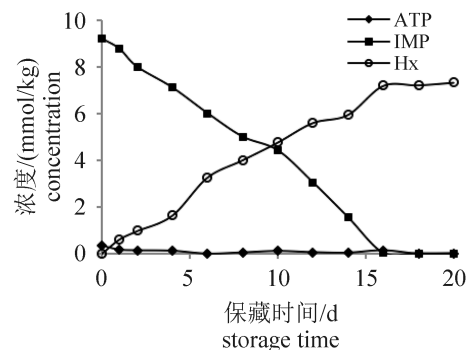


图6 加入5% Triton X-100的鱼糜中ATP关联产物的含量变化(0 °C)

Fig. 6 Changes of ATP-related compound composition in ground meat with 5% Triton X-100

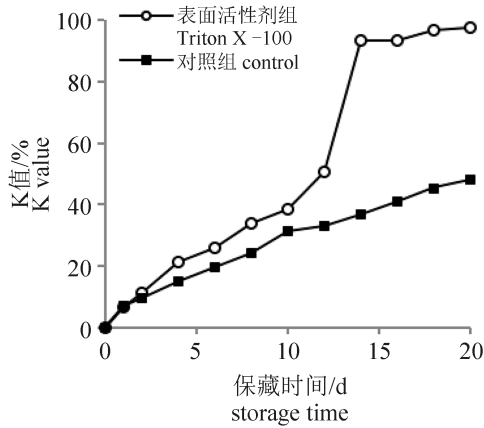


图 7 鱼糜的K值(0°C)

Fig. 7 K-value of ground meat

作用,使游离在细胞质中的5'-核苷酸酶分布更加均匀,这加大了IMP与5'-核苷酸酶相遇的几率,

从而降解更加迅速。所以,表面活性剂可能是通过改变细胞膜性质以及参与代谢的IMP降解酶的空间位置,加速IMP的降解,从而导致生成Hx速率加快。因此,在鱼肉的保藏过程中应当注意尽可能地维持细胞内环境与IMP降解酶的稳定,防止IMP过快降解导致鱼肉鲜味快速流失。

常温保藏条件下细胞膜结构对ATP关联化合物降解的影响 实验研究了10和20°C保藏条件下表面活性剂对IMP降解的影响,IMP在10和20°C保藏条件下迅速降解,且随温度的升高IMP降解速率加快,这是由于随着温度升高,IMP降解酶活性逐渐增强(图8)。3种温度条件下,加入Triton X-100的实验组IMP降解速率都明显快于对照组。说明表面活性剂对IMP降解的加速作用并不受温度变化的影响。

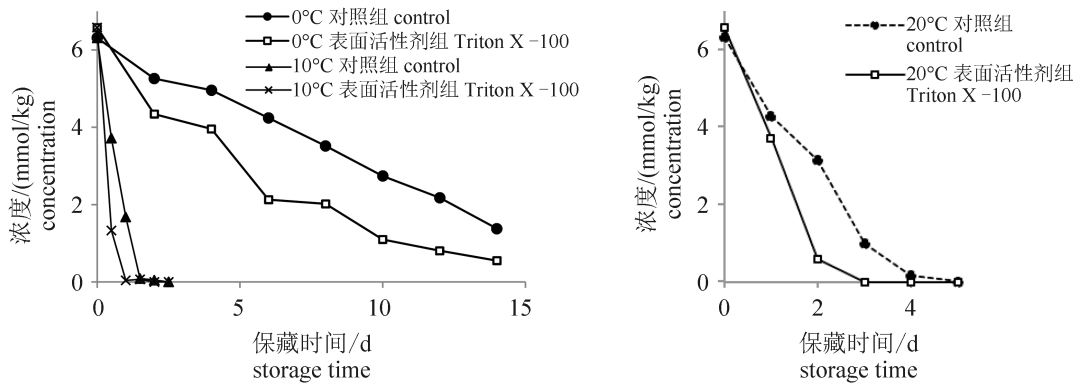


图 8 不同保藏温度下加入5%Triton X-100的鱼糜中IMP的含量变化

Fig. 8 Changes of IMP in ground meat with 5%Triton X-100 at different temperatures

### 3 讨论

牙鲆体内ATP是按照ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx途径代谢的,属于Hx生成型鱼种。0°C冰藏条件下IMP的降解经历了蓄积—快速降解两个阶段,呈现二相性;鱼肉的形态影响保藏过程中ATP的降解速率,但几乎不影响IMP及其他关联化合物的降解过程;保藏初期加入抗菌素可阻碍后期微生物的生长繁殖,导致IMP降解减缓,并且该阶段呈单一线性下降趋势,该现象在低温下尤为明显。通常鱼类在低温保藏过程中IMP含量的下降是由于鱼体内源性IMP降解酶与微生物源的IMP降解酶的叠加作用导致的,是IMP的降解呈现二相性的原因,因此

微生物的作用是影响IMP降解变化的关键因素。表面活性剂对细胞膜性质的改变和参与代谢的IMP降解酶的空间位置也能够加速IMP的降解。因此,在鱼类保藏过程中应当尽可能保证细胞内环境与酶系统的稳定,防止IMP过快降解导致鱼肉鲜味与新鲜度快速流失,从而达到延长鱼肉制品货架期的效果。

#### 参考文献:

[1] Songsaeng S, Sophanodora P, Kaewsritthong J, et al. Quality changes in oyster (*Crassostrea belcheri*) during frozen storage as affected by freezing and antioxidant[J]. Food Chemistry, 2010, 123(2): 286-290.

[2] Aubourg S P, Carmen Piñeiro J M, Gallardo J M, et al.

- Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (*Psetta maxima*)[J]. Food Chemistry, 2005, 90(3): 445-452.
- [ 3 ] Bennour M, El Marrakchi A, Hamama A, *et al.* Chemical and microbiological assessments of mackerel (*Scomber scombrus*) stored in ice[J]. Journal of Food Protection, 1991, 54(10): 789-792.
- [ 4 ] Ocaño-Higuera V M, Maeda-Martínez A N, Marquez-Ríos E, *et al.* Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods[J]. Food Chemistry, 2011, 125(11): 49-54.
- [ 5 ] Losada V, Piñeiro C, Barros-Velázquez J, *et al.* Inhibition of chemical changes related to freshness loss during storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in slurry ice[J]. Food Chemistry, 2005, 93(4): 619-625.
- [ 6 ] 陶志华, 佐藤实. 滤纸电泳分析检测鱼的鲜度K值[J]. 现代食品科技, 2013, 29(10): 2509-2511, 2553.
- Tao Z H, Sato M.. Determination of K value for fish freshness by filter paper electrophoresis[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(10): 2509-2511, 2553 (in Chinese).
- [ 7 ] 迟海, 李学英, 杨宪时, 等. 南极磷虾冻藏温度下的品质变化及其货架期分析[J]. 水产学报, 2012, 36(1): 153-160.
- Chi H, Li X Y, Yang X S, *et al.* Analysis of quality changes and shelf-life of Antarctic krill (*Euphausia superba*) at frozen temperature[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(1): 153-160 (in Chinese).
- [ 8 ] Watanabe E, Tamada Y, Hamada-Sato N. Development of quality evaluation sensor for fish freshness control based on  $K_1$  value[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, 21(3): 534-538.
- [ 9 ] Seki H, Hamada-Sato N. Effect of various salts on inosinic acid-degrading enzyme activity in white and dark muscle of the Pacific saury[J]. Fisheries Science, 2015, 81(2): 365-371.
- [10] Saito T, Arai K I, Matsuyoshi M. A new method for estimating the freshness of fish[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1959, 24(9): 749-750.
- [11] Cheng J H, Sun D W, Pu H B, *et al.* Development of hyperspectral imaging coupled with chemometric analysis to monitor K value for evaluation of chemical spoilage in fish fillets[J]. Food Chemistry, 2015, 185: 245-253.
- [12] Srirangsan P, Hamada-Sato N, Kawai K, *et al.* Improvement of fish freshness determination method by the application of amorphous freeze-dried enzymes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(23): 12456-12461.
- [13] Agustini T W, Suzuki M, Suzuki T, *et al.* The possibility of using oxidation-reduction potential to evaluate fish freshness[J]. Fisheries Science, 2001, 67(3): 547-549.
- [14] Li N J, Endo H, Hayashi T, *et al.* A trial of pH sensor system for determination of fish freshness[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58(11): 2039-2044.
- [15] Kamalakanth C K, Ginson J, Bindu J, *et al.* Effect of high pressure on K-value, microbial and sensory characteristics of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) chunks in EVOH films during chill storage[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2011, 12(4): 451-455.
- [16] 李燕, 周培根, 戚晓玉. 罗氏沼虾在不同温度贮藏期间鲜度的变化[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(1): 62-67.
- Li Y, Zhou P G, Qi X Y. Changes in freshness of *Macrobrachium rosenbergii* during storage at different temperatures[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2002, 11(1): 62-67 (in Chinese).
- [17] 张佳琪. 鱼肉中ATP关联化合物提取方法的改进及应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2013: 1-40.
- Zhang J Q. A simplified method for extraction of ATP related compounds in fish meat and its application[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013: 1-40 (in Chinese).
- [18] Watabe S, Ushio H, Iwamoto M, *et al.* Temperature-dependency of rigor-mortis of fish muscle: Myofibrillar  $Mg^{2+}$ -ATPase activity and  $Ca^{2+}$  uptake by sarcoplasmic reticulum[J]. Journal of Food Science, 1989, 54(12): 1107-1109, 1115.
- [19] 杨文鸽, 薛长湖, 徐大伦, 等. 大黄鱼冰藏期间ATP关联物含量变化及其鲜度评价[J]. 农业工程学报, 2007, 23(6): 217-222.
- Yang W G, Xue C H, Xu D L, *et al.* Changes of ATP-related compounds contents and freshness evaluation of *Pseudosciaena crocea* meat during iced storage[J].

- Transactions of the CSAE, 2007, 23(6): 217-222 (in Chinese).
- [20] 戚晓玉, 李燕, 周培根. 日本沼虾冰藏期间ATP降解产物变化及鲜度评价[J]. 水产学报, 2001, 25(5): 482-484. Qi X Y, Li Y, Zhou P G. Changes in content of ATP related compounds in the muscle of *Macrobrachium nipponense* during ice storage and evaluation of the freshness[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(5): 482-484 (in Chinese).
- [21] 尚四华. 肌苷和肌苷酸测定的新方法研究[J]. 理化检验-化学分册, 2001, 37(10): 463-464. Shang S H. UV-Spectrophotometric determination of inosine and inosinic acid[J]. PTCA (Part B: Chemical Analysis), 2001, 37(10): 463-464 (in Chinese).
- [22] 童铃. 不同贮藏温度下扁舵鲹组胺及产组胺菌的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2015: 1-64. Tong L. Study on histamine and histamine-producing bacteria in frigate tuna during storage at various temperatures[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2015: 1-64 (in Chinese).
- [23] Seki H, Hamada-Sato N. Identification of bacteria that contribute to IMP degradation in horse mackerel[J]. Journal of Food Processing & Technology, 2014, 5(8):363.
- [24] 周鑫, 董云伟, 王芳, 等. 草鱼 $hsp70$ 和 $hsp90$ 对温度急性变化的响应[J]. 水产学报, 2013, 37(2): 216-221. Zhou X, Dong Y W, Wang F, *et al.* Effect of rapid temperature change on expression of  $hsp70$  and  $hsp90$  in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(2): 216-221(in Chinese).
- [25] 吕东坡, 朱仁俊. 肌苷酸的研究现状及展望[J]. 肉类研究, 2007(11): 12-15. Lü D P, Zhu R J. The research status and potential using of IMP[J]. Meat Research, 2007(11): 12-15 (in Chinese).



## Factors affecting change of ATP related compounds' decomposition in stored bastard halibut

WU Yimeng<sup>1,2</sup>, CHEN Shunsheng<sup>1\*</sup>, KONNO Kunihiko<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hokkaido 041-8611, Japan)

**Abstract:** In order to give an insight into decomposition of ATP related compounds in stored fish, we re-examined ATP-related compounds and K-value change in bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) muscle when stored in different stored conditions focusing on the IMP decomposition by HPLC, and further studied factors that affect these changes, aiming at providing scientific guidance for preservation of fish. The result showed: Storage of flounder muscle block at 0 °C accumulated IMP as a major component indicating a quick conversion of ATP to IMP through ADP and AMP. IMP content decreased slowly in an early phase, while it dropped rapidly at the final stage of the storage (10 days) showing biphasic change. In ground fish meat, ATP degraded faster but there was no change in other ATP related compounds. Adding antibiotics (chloramphenicol) to samples at 0 d to prevent the growing of microorganism. It was obvious that IMP content decreased much slowly in the presence of the antibiotics showing linear change. When ground meat added with detergent (5% Triton X-100) to break cell membrane structure at 0 d, IMP decomposition was quicker than the control. Inclusion of Triton X-100 to ground meat also accelerated IMP decomposition at 10 and 20 °C. The results indicated that the shape of stored fish affected ATP degradation but hardly had any effect on IMP decomposition. IMP decomposition in the later phase included the reaction by the exogenous enzyme coming from the microorganism growing at later phase. The existence of microorganism in later stored phase is the main factor that affected change of IMP decomposition. Modifying character of cell membrane by detergent also had effect on IMP decomposition.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; ATP related compounds; exogenous IMP decomposing enzyme; K-value

**Corresponding author:** CHEN Shunsheng. E-mail: sschen@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31471685)