



## 红鳍东方鲀死后僵直及生化变化特性

冷寒冰, 刘俊荣\*, 徐美禄, 王选飞, 衣鸿莉, 田元勇

(大连海洋大学食品科学与工程学院, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 以养殖红鳍东方鲀为研究对象, 活体速杀放血去内脏, 设冰藏组和室温组进行6 d 对照贮藏。贮藏期间观察记录鱼体死后僵直状态并监测僵直指数, 跟踪分析肌肉生化变化, 生化指标包括ATP及关联物、糖原、pH以及肌肉蛋白磷酸化等。结果显示, 冰藏组在死后7 h左右才开始发生僵直, 僵直指数最大可达89%, 并可维持20~24 h; 冰藏至第4天, 僵直指数仍可分别保持在9%和16%。室温对照组中没有明显观察到僵直发生发展过程, 虽然测出最大僵直指数为71%, 但僵直现象转瞬即逝。死后贮藏过程中糖原水平迅速下降, 室温对照组贮藏至第3天几乎消耗完全, 而冰藏组消耗殆尽发生在5 d以后; 肌肉pH分析结果与糖原变化趋势相似, 冰藏组的pH值较室温对照组下降的慢, 且高于室温对照组。速杀后至僵直开始, 各处理组ATP均迅速消耗, IMP快速积累且为主要核苷酸降解产物; 冰藏组IMP在第3天左右达到最大值9.5  $\mu\text{mol/g}$ , 随后开始呈下降趋势, 贮藏到第6天时IMP仍保持在7.5  $\mu\text{mol/g}$ 左右, 始终处于较高水平。室温对照组则为IMP在第1天达到最大值9.2  $\mu\text{mol/g}$ 后迅速下降, Hx积累量明显增多。蛋白质磷酸化结果表明, 鱼体死后的僵直状态或程度与肌肉蛋白组分性质也具有一定的关联。值得关注的是与糖酵解酶有关的蛋白组分, 其磷酸化程度在室温组和冰藏组之间存在明显差异, 即室温组具有更高的磷酸化水平, 这与室温组所表现出的更加活跃的糖酵解进程相吻合。研究表明, 红鳍东方鲀死后有良好的冰藏稳定性和高IMP积累的特点, 同时蛋白质磷酸化水平与僵直进程所表现的关联值得进一步探索。

**关键词:** 红鳍东方鲀; 死后僵直; 生化特性

**中图分类号:** TS 254

**文献标志码:** A

鱼类产品的供给方式主要可以分为鲜活品和加工保藏品2大类。优势经济鱼类的最大商品价值是鲜活, 鲜活鱼产品能最好地反映出其美食属性<sup>[1]</sup>。鱼体死后, 鲜度极容易下降, 致使鲜品价值迅速跌落, 故鱼体死后鲜度的变化规律对于鱼肉品质控制十分重要。死后变化具有品种差异性、地域差异性、生理因素差异性等<sup>[2]</sup>。不同的宰杀方式对鱼类死后生化变化也有很大的影响<sup>[3]</sup>, 如Matos等<sup>[4]</sup>发现, 不同的宰杀方式处理的金头鲷(*Sparus aurata*), 其死后生化变化并不相同。

河鲀是久负盛名并具有安全特殊性的美食

食材, 我国具有近40年的河鲀养殖驯化且出口的历史, 形成了以红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)和暗纹东方鲀(*T. obscurus*)为主的河鲀产业, 其中红鳍东方鲀也是我国重要的海水养殖优势品种之一。从食品安全管理的角度出发, 我国始终禁止活品河鲀的销售。根据农业农村部办公厅和国家食品药品监督管理局《关于有条件放开养殖红鳍东方鲀和养殖暗纹东方鲀加工经营的通知》<sup>[5]</sup>, 自2016年开始, 红鳍东方鲀和暗纹东方鲀获准以加工品形式出售。红鳍东方鲀的加工产业主要有鲜品和冻品2种, 鲜品保鲜形

收稿日期: 2019-01-19 修回日期: 2019-04-02

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901001); 国家自然科学基金(31671790)

通信作者: 刘俊荣, E-mail: ljunrong@dlou.edu.cn

式主要是泡沫箱顶层覆碎冰。相关研究涉及到冷藏、冷冻、电解水、羧甲基壳聚糖、复合生物保鲜剂<sup>[6-11]</sup>等保鲜研究。始于离水处死及死后生化变化特性诸项有关河鲀食品原料学性质的研究, 国内外均缺乏具有品种针对性的深入报道。

本研究以红鳍东方鲀为对象, 围绕速杀后鱼体生化变化及冷藏特性开展研究, 通过对红鳍东方鲀死后肌肉的生化指标的观察测定, 以揭示红鳍东方鲀死后的生化变化规律, 为刚刚开放的河鲀加工产业提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 原料与处理

**原料** 红鳍东方鲀于2018年10月23日采购于辽宁省大连市大连天正实业有限公司, 全部为商品规格的850~950 g/条的健康活体。

**速杀** 采购现场逐条从暂养池捞出, 以手工断脊椎方式速杀, 去除内脏和鳃后分组装箱贮藏。

**贮藏** 分冰藏组(Iced)和室温对照组(Cont), 环境温度为15~17 °C。鱼体用包装袋单体分装后置于泡沫箱中, 添加碎冰的为冰藏组, 无碎冰添加的为室温对照组。冰藏组要确保每条鱼体四周为碎冰所覆盖(图1), 期间视碎冰融化程度及时补加碎冰; 此外, 鉴于现有冰鲜河鲀加工品有去皮与带皮2种处理方式, 冰藏组设置去皮处理组作为冰藏对照组(Iced\*)。将各处理组泡沫箱用胶带密封后运抵实验室。

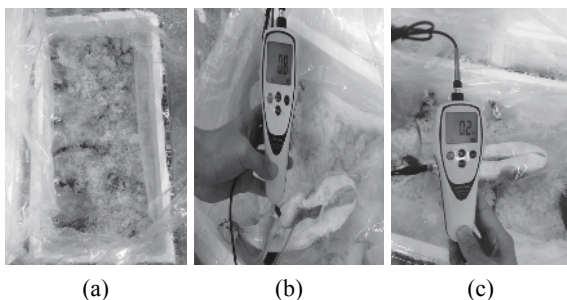


图1 冰藏方式及鱼体中心温度测定示意图

(a)冰藏, (b)冰藏组鱼体温度, (c)冰藏对照组鱼体温度

Fig. 1 Illustration of fish icing and body temperature testing

(a) icing, (b) body temperature of Iced, (c) body temperature of Iced\*

**采样** 抵达实验室立即采初始样, 然后继续贮藏观察; 密切观察各组僵直状态, 分别

在僵直初期、最大僵直以及僵直末期取样; 此外, 在6 d贮藏期间每日对各组取样。取样时对鱼体拍照并测量, 以分析僵直指数, 随后将鱼体背剖, 取背部肌肉后用液氮速冻并放入-40 °C待测。

**鱼体中心温度测量** 每次取样时, 将鱼从冰中取出后立即将温度计的插头从腹腔探入脊椎处, 待读数稳定后读取温度值并记录(图1)。

### 1.2 实验材料与仪器

标准蛋白, 大连TaKaRa公司; 碘乙酸钠, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 蒽酮(分析纯)、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(AR), 国药集团化学试剂有限公司; 无水乙醇、KOH、NaOH、HCl、乙腈、甲醇、乙酸, 天津市科密欧化学试剂有限公司; Pro-Q钻石磷酸化蛋白凝胶染色剂和SYPRO红宝石蛋白凝胶染色剂, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 碘硝基氯化四氮唑蓝、吩嗪硫酸甲酯、氧化型辅酶I、乳酸脱氢酶, 北京索莱宝科技有限公司; SDS-聚丙烯酰胺电泳试剂、 $\beta$ -巯基乙醇, 美国Sigma公司;

GL-21M高速冷冻离心机, 德国HERMLE Labortechnik GmbH公司; Synergy H1酶标仪, 美国柏腾公司; HG-200高速分散均质机, 日本HSIANGTAI公司; PB-10pH计, 德国Sartorius公司; UV-1800PC紫外-可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; AE-6500垂直电泳槽, 日本ATTO公司; OS-I型回旋脱色摇床, 大连竞迈公司; Amersham Imager 600超灵敏多功能成像仪, 美国GE公司; IMS-40全自动雪花制冰机, 常熟市雪科公司; Agilent 1260高效液相色谱仪, 美国Agilent公司; Milli-Q超纯水净化仪, 美国Millipore公司; BS224S型精密电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 防水电子温度计, 亚速旺(上海)商贸有限公司。

### 1.3 分析测试

**僵直状态及僵直指数** 僵直状态用肉眼观察, 并采用商品折叠式样品摄影棚拍摄(图2)。根据Tulli等<sup>[12]</sup>的方法。将鱼体放在水平板上, 测量出整个鱼体的中心位置, 从中点作为分界线, 将鱼体的前1/2放在水平板上, 后1/2置于水平板以外任其垂下, 手指轻轻压住鱼头附近以固定, 测定尾部与水平板构成的最初下垂距离(L)和在不同僵直程度时的距离(S), 计算僵直指数(R)。

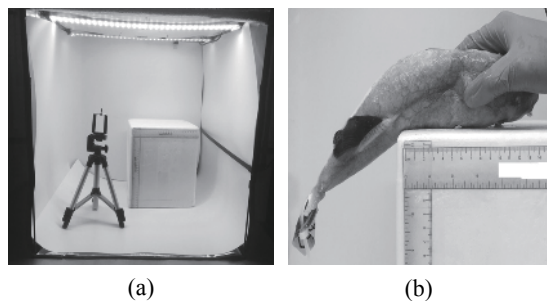


图2 摄像装置及样品图示

(a)摄像装置, (b)样品图示

Fig. 2 Camera apparatus and sample illustration

(a) camera apparatus, (b) sample illustration

$$R(\%) = \frac{L - S}{L} \times 100\%$$

**pH值** 根据刘金洋等<sup>[13]</sup>的测定方法。取2 g肉糜加入10 mL 20 mmol/L碘乙酸钠,用玻璃棒充分搅拌,静置20 min,测定pH。每个样品做3个平行。

**糖原** 取2 g肉糜,加入4 mL 30% KOH溶液,沸水浴消化20 min,冷却后加入20 mL无水乙醇,于3 000×g离心15 min,取沉淀加入10 mL蒸馏水,1滴饱和氯化钾,15 mL无水乙醇。搅拌使沉淀溶解,于3 000×g离心15 min,弃上清液,将沉淀用蒸馏水定容至10 mL,取90 μL定容后的溶液加入240 μL显色液,100 °C加热反应10 min,流水冷却后静置10 min,取反应液200 μL于96孔板,在620 nm下测定吸光度,计算糖原含量。每个样品做3个平行。显色液的配制:称取0.1 g葱酮溶于50 mL 80%浓硫酸溶液中,避光保存,现用现配。

**ATP及其关联物** ATP及其关联物含量的测定参照刘慧慧等<sup>[14]</sup>的方法,准确称取1 g肌肉样品,加入10 mL 5%的PCA立即进行组织捣碎10 min,加入2 mol/L KOH调节pH至2~3.5,加水补体积至20 mL,离心(3 000×g, 5 min),取4 mL上清液过膜后加入1 mL 0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 7.5),用反向高效液相色谱法测定ATP及其核苷酸关联物含量。

**蛋白质磷酸化** 取3 g红鳍东方鲀的背部肌肉,加入6倍体积的0.1 mol/L NaCl-20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.0)缓冲溶液,以30 s为间隔,于10 000×g条件下均质3次,每次均质30 s,以上操作在冰水中进行。取0.1 mL匀浆液,加入1.0 mL蛋白质溶解液[含有2% SDS、8 mol/L尿素、2% β-巯基乙醇、50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)],混匀后

<http://www.scxuebao.cn>

于100 °C加热5 min。取0.01 mL用于聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。浓缩胶质量分数5%,分离胶质量分数7.5%。SDS-PAGE后进行Pro-Q和SYPRO染色、电泳图获取和图像分析<sup>[15-16]</sup>。利用MiltiGauge软件对各条带的光密度值进行计算,得到每个条带的Pro-Q Diamond染色光密度值(P)和SYPRO Ruby染色光密度值(T),蛋白质磷酸化水平的确定为同一条带的光密度值之比(P/T),而样品的蛋白质磷酸化水平为包括所有蛋白条带的整个泳道的P/T值<sup>[17]</sup>。

## 1.4 数据处理

采用Excel 2007对僵直指数、pH值、糖原和ATP及关联物含量的数据结果进行处理和分析,采用SPSS 17.0软件对蛋白磷酸化数据进行统计分析,以僵直状态、贮藏天数、僵直状态与贮藏天数的交互作用3个因素作为变量。多重比较方法采用Duncan氏法,  $P < 0.05$ 。结果以“平均值±标准差”表示。

## 2 结果

### 2.1 红鳍东方鲀死后僵直变化规律

本研究6 d贮藏期间,死后初期8 h时,Iced组鱼体中心温度略高于Iced\*组,次日2组鱼体中心温度均降至2 °C以下,之后一直保持在0.1~1 °C,而Cont组温度始终保持在16~18 °C(图3)。

红鳍东方鲀死后鱼体各个僵直阶段起始时间及持续时间的变化表明,Iced组与Cont组具有明显的差异。Iced组具有明确的僵直起始现象,鱼体死后7 h左右开始发生僵直,且鱼体能够观察到接近最大僵直程度,僵直状态可持续到死

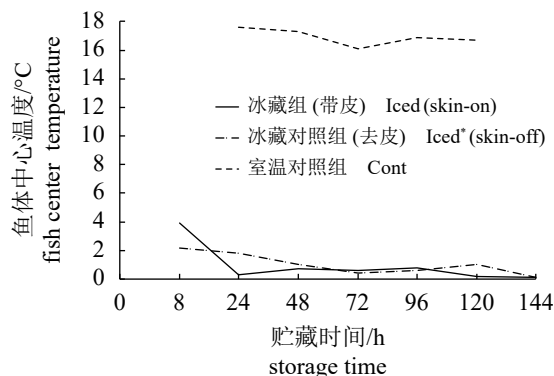


图3 红鳍东方鲀速杀后室温与碎冰贮藏期间鱼体中心温度

Fig. 3 Body temperature of instant killed *T. rubripes* stored in ice and at ambient temperature

后3 d(72 h左右); Cont组中未能十分明确地观察到僵直起始时间, 也没有观察到最大僵直现象, 其僵直过程的程度和持续时间均没有明确表象(表1)(图4)。

同样是冰藏组, 带皮与去皮的鱼体僵直开始时间差别不是十分明显, 从最大僵直程度来看, 二者也无明显差异; 去皮与否的最大僵直状态均可持续24 h左右。

僵直指数用于进一步分析各组死后僵直变化的差异(图5)。死后室温贮藏条件下, 鱼体没有明显的持续的僵直状态, 最大僵直指数为71%, 且僵直现象转瞬即逝。冰藏组与冰藏对照组均可在较长时间内(20~24 h)保持其十分明显的僵直状态, 期间僵直指数分别达89%和83%。冰藏至第4天, 僵直指数仍可分别保持在9%和16%。

**2.2 红鳍东方鲀死后糖原变化规律**

无论是冰鲜还是室温, 死后初期糖原均迅速下降, 1 d内由10.92降至1 mg/g左右(图6, 图7)。

表 1 红鳍东方鲀速杀后僵直进程及僵直持续时间

**Tab. 1 Rigor mortis progression and duration of instant killed *T. rubripes*** h

处理组 treatments	僵直初期 onset	最大僵直 stiff	开始解僵 off	僵直末期 post	最大僵直 持续期 duration- stiff	僵直全程 whole- process
冰藏组 Iced	7~8	12~13	34~36	72	22~24	65~66
冰藏对 照组 Iced*	6~7	9~10	33~35	72	23~24	65~67
室温对 照组 Cont	12~13	23~24	-	-	-	-

注: -未检测到结果, 下同  
Notes: -. undetected result, the same below

之后的贮藏过程中, 对照组糖原含量迅速下降, 贮藏至第3天几乎消耗完全, 而冰藏组糖原含量消耗殆尽发生在5 d以后。对于不同产品形式的Iced组和Iced\*组, 糖原含量下降趋势相似; Iced\*组在贮藏第5天时糖原消耗完全, 而Iced组

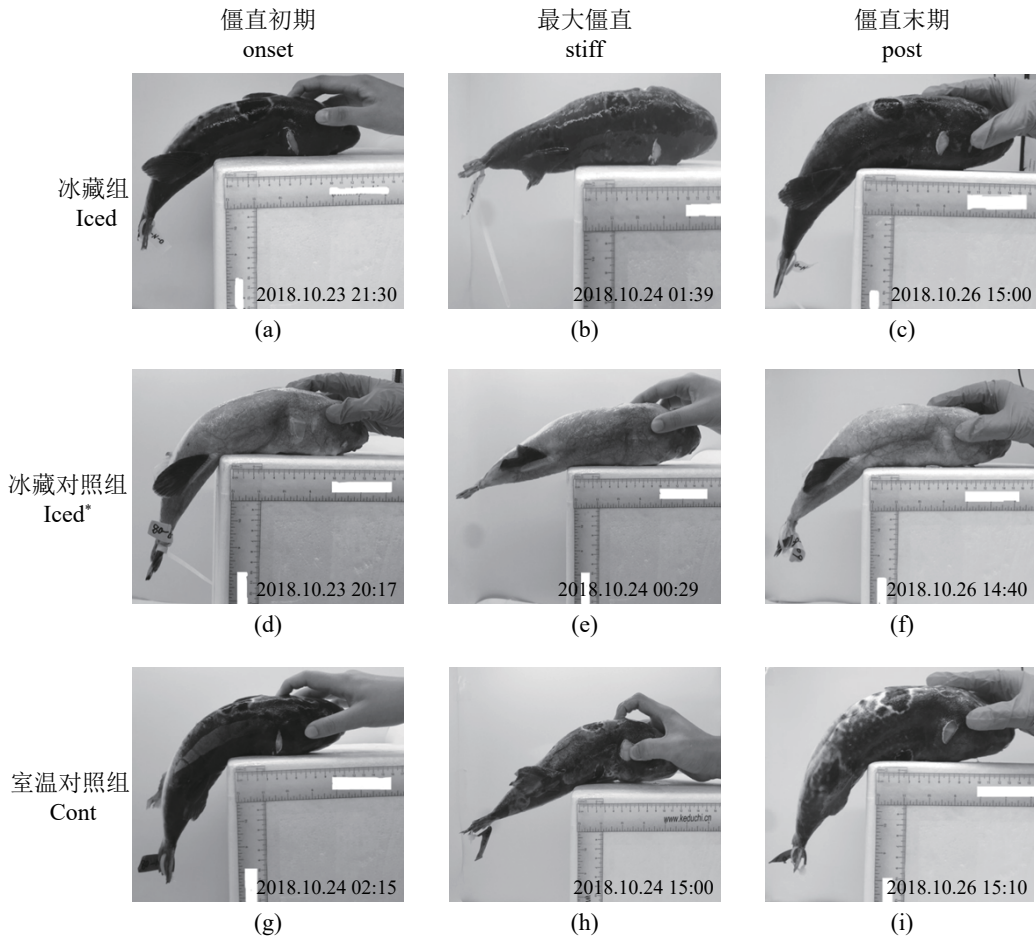


图 4 红鳍东方鲀速杀后室温与碎冰贮藏期间僵直变化

Fig. 4 Rigor mortis development of instant killed *T. rubripes* stored in ice and at ambient temperature

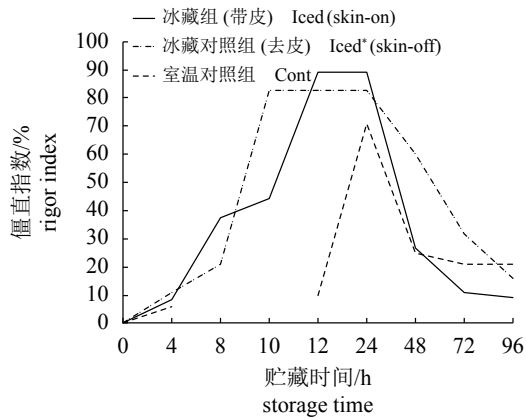


图 5 红鳍东方鲀速杀后室温与碎冰贮藏期间僵直指数  
 Fig. 5 Rigor index of instant killed *T. rubripes* stored in ice and at ambient temperature

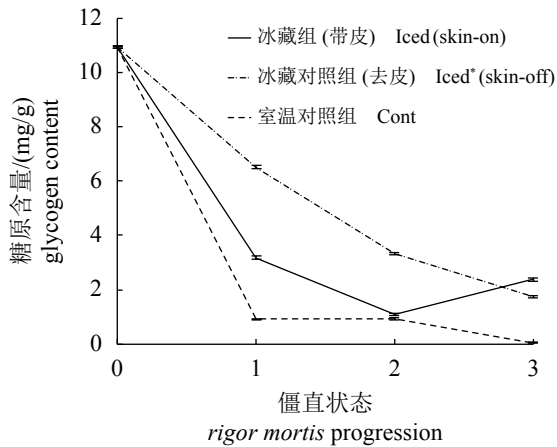


图 6 红鳍东方鲀速杀后各僵直阶段的肌肉糖原含量  
 0.初始点; 1.僵直初期; 2.僵直最大; 3.僵直末期(图8同)

Fig. 6 Muscle glycogen content of instant killed *T. rubripes* in the progression of rigor mortis

0. initial; 1. onset; 2. stiff; 3. post (the same as Fig. 8)

在贮藏第6天时几乎消耗完全。

Cont组的pH值相较于冰藏组下降较快, 且始终低于冰藏组。Iced组的pH在僵直前期略低于Iced\*组, 而随着贮藏时间延长, pH略高于Iced\*组(图8, 图9)。

2.3 红鳍东方鲀死后ATP及关联物变化规律

图10和表2表现出了不同僵直状态和贮藏时间的ATP及关联物含量和变化趋势, 原料初始点ATP含量为3.57 μmol/g, 经数小时贮藏, 随着ATP消耗, 僵直开始发生。从关联产物可以发现红鳍东方鲀死后僵直前后核苷酸降解的特点, 即高能化合物集中在ADP, 降解产物集中在IMP, 并且IMP有显著积累的特征, IMP的积累是先上

http://www.scxuebao.cn

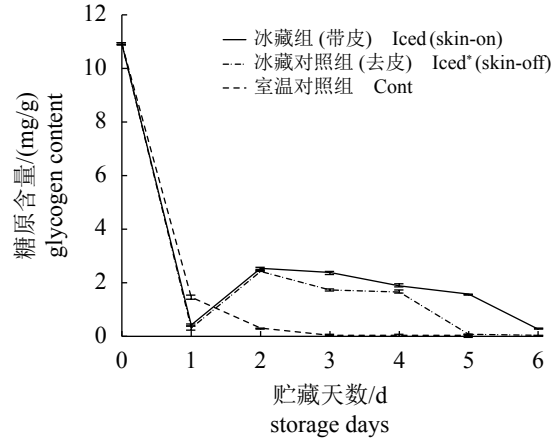


图 7 红鳍东方鲀速杀后室温与碎冰贮藏期间肌肉糖原变化

Fig. 7 Muscle glycogen content of instant killed *T. rubripes* stored in ice and at ambient temperature

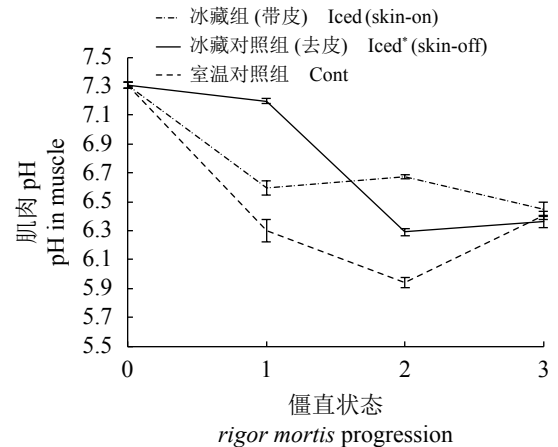


图 8 红鳍东方鲀速杀后各僵直阶段肌肉pH

Fig. 8 Muscle pH of instant killed *T. rubripes* in the progression of rigor mortis

升然后下降的过程。Cont组在第1天降解产物IMP含量已经达到最大值(9.2 μmol/g), 之后IMP快速下降, Hx积累开始增加, 贮藏到第5天时IMP下降到3.29 μmol/g, Hx为2.13 μmol/g; 而Iced组的IMP在第3天达到最大值, 之后开始缓慢降解, 在检测到第6天时IMP还有7 μmol/g。产品形式中Iced组和Iced\*组的IMP都有一个显著积累的过程, 并且在积累到最大值后降解过程缓慢, 在第6天时仍处于较高的水平。

2.4 红鳍东方鲀死后肌肉僵直与蛋白磷酸化

图11为不同僵直状态肌肉磷酸化蛋白和肌肉全蛋白SDS-PAGE图谱。图中条带清晰, 分离效果较好, 从2组染色的凝胶图中选取10个较为

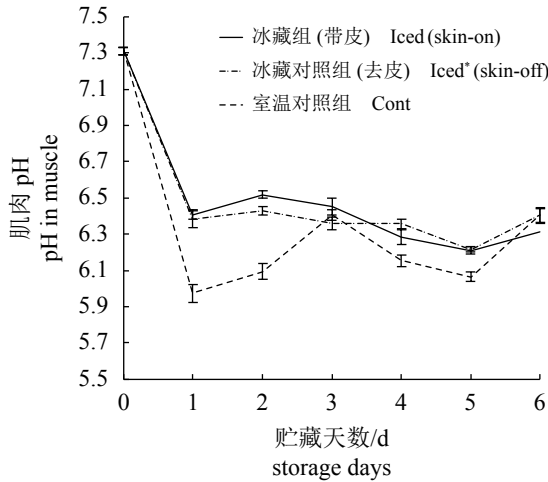


图 9 红鳍东方鲀速杀后室温与碎冰贮藏期间肌肉pH变化

Fig. 9 Muscle pH of instant killed *T. rubripes* stored in ice and at ambient temperature

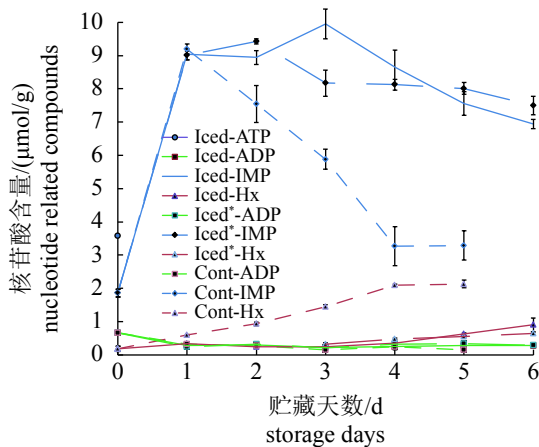


图 10 红鳍东方鲀速杀后室温与碎冰贮藏期间肌肉ATP及其关联物

Fig. 10 Muscle ATP and its related compounds in the instant killed *T. rubripes* of different treatment groups at different storage time

清晰的条带, 并使条带在图中一一对应, 其磷酸化水平如表3所示。

磷酸化蛋白质主要集中在20~200 ku。条带7和条带9在不同僵直状态时没有显著变化( $P > 0.05$ ); 在不同僵直状态和处理条件下, 其余条带的蛋白磷酸化水平均有显著变化( $P < 0.05$ )(图11)(表3, 表内数值为不同染色条件下条带的荧光密度之比)。

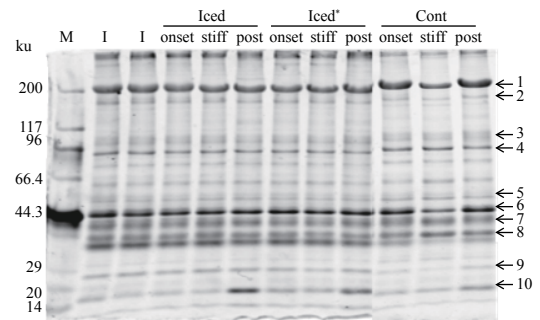
### 3 讨论

鱼体死后, 影响僵直状态变化的因素很

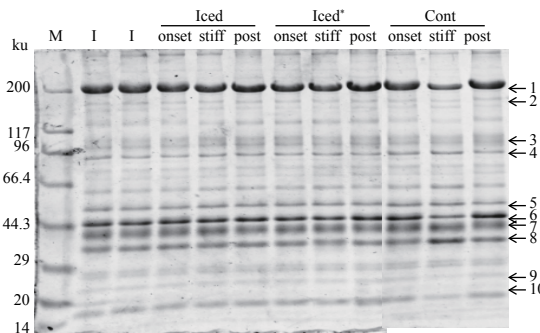
表 2 红鳍东方鲀速杀后不同僵直状态下的肌肉ATP及关联物含量

Tab. 2 Muscle ATP and related compound in the progression of rigor mortis of instant killed

		<i>T. rubripes</i>						μmol/g
处理组	treatment	ATP	ADP	AMP	IMP	Hx	HxR	
原料初始点	material initial	3.57	0.66	-	1.86	0.18	-	
僵直初期	onset Iced	-	0.19	-	4.68	-	-	
	Iced*	3.28	0.60	-	1.77	0.29	-	
	Cont	-	0.22	-	6.94	0.45	-	
最大僵直	stiff Iced	-	0.19	-	5.47	0.13	-	
	Iced*	-	0.28	-	8.22	-	-	
	Cont	-	0.27	-	6.01	1.07	-	
僵直末期	post Iced	-	0.22	-	9.95	0.25	-	
	Iced*	-	0.21	-	8.17	0.31	-	
	Cont	-	0.16	-	5.88	1.45	-	



(a)



(b)

图 11 红鳍东方鲀速杀后各僵直阶段肌肉蛋白磷酸化 (a) Pro-Q Diamond磷酸化蛋白染色; (b) SYPRO Ruby全蛋白染色; M. Marker; I. 初始点

Fig. 11 Muscle protein phosphorylation in the progression of rigor mortis of instant killed *T. rubripes*

(a) Pro-Q Diamond; (b) SYPRO Ruby; M. Marker; I. initial

多, 品种、健康状态、致死方法以及死后贮藏条件等都会影响僵直进程。比如低温窒息致死

表 3 红鳍东方鲀速杀后各僵直阶段肌肉蛋白磷酸化水平

Tab. 3 Muscle protein phosphorylation level in the progression of rigor mortis of instant killed *T. rubripes*

条带 bond	初始点 initial	冰藏组 Iced			冰藏对照组 Iced*			室温对照组 Cont			显著性分析(P值) P	处理组 treatment	僵直状态* 处理组 progression of rigor mortis *treatment
		僵直初期 onset	最大僵直 stiff	僵直末期 post	僵直初期 onset	最大僵直 stiff	僵直末期 post	僵直初期 onset	最大僵直 stiff	僵直末期 post			
1	0.45±0.03	0.37±0.02	0.42±0.10	0.36±0.02	2.07±0.12	0.40±0.02	0.26±0.07	0.95±0.09	1.04±0.05	1.03±0.04	0.001 4	<0.000 1	<0.000 1
2	0.52±0.03	0.64±0.04	0.43±0.02	0.50±0.02	0.67±0.03	0.60±0.07	0.32±0.07	1.83±0.04	2.12±0.04	2.60±0.08	<0.000 1	0.002 5	<0.000 1
3	0.20±0.07	0.37±0.08	0.59±0.11	0.52±0.04	0.65±0.03	0.70±0.02	0.41±0.07	2.01±0.08	3.57±0.02	1.34±0.04	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1
4	0.72±0.03	0.94±0.05	0.74±0.04	0.56±0.03	0.28±0.02	0.62±0.04	0.47±0.08	2.47±0.04	1.88±0.05	1.64±0.02	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1
5	1.67±0.02	0.28±0.04	0.23±0.03	0.27±0.04	0.38±0.02	0.22±0.01	0.24±0.05	1.23±0.01	1.20±0.02	0.79±0.02	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1
6	0.71±0.04	0.66±0.01	0.64±0.03	0.66±0.02	1.25±0.03	0.74±0.02	0.59±0.04	1.20±0.01	1.37±0.04	1.22±0.01	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1
7	0.44±0.03	0.51±0.01	0.49±0.04	0.52±0.02	0.47±0.03	0.44±0.02	0.53±0.02	0.90±0.03	1.06±0.04	1.04±0.02	0.062	0.016	<0.000 1
8	0.45±0.03	0.53±0.03	0.62±0.01	1.26±0.02	0.29±0.02	0.33±0.01	0.50±0.01	1.64±0.02	1.23±0.03	1.04±0.02	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1
9	0.34±0.02	0.36±0.02	0.34±0.02	0.34±0.03	0.27±0.02	0.29±0.04	0.50±0.01	0	0	0	0.086	<0.000 1	0.003 1
10	0.64±0.04	0.32±0.03	0.21±0.09	1.19±0.03	1.44±0.04	0.54±0.08	0.76±0.06	1.09±0.02	0.97±0.11	1.58±0.02	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

的舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)达到最大僵直程度的时间是死后3 h左右,但CO<sub>2</sub>致晕的舌齿鲈达到最大僵直程度的时间是死后9 h左右<sup>[18]</sup>。红鳍东方鲀死前处于自由的环境,逐条速杀所以保持其松弛的状态,死后短时间内肌肉中ATP水平较高,肌细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度较低,肌球蛋白可以从肌动蛋白中解离,无肌动球蛋白的生成。随着时间的延续,ATP水平下降,而肌动球蛋白复合体逐渐增多,开始形成僵直现象,僵直指数开始升高。在死后9 h左右僵直程度达到最大,僵直指数此时也为最大值。

鱼死后,体内肌细胞会继续消耗ATP以维持生命活动,但肌体死后ATP无法再进行合成,只能依靠消耗糖原提供能量维持细胞的代谢活动,所以糖原含量下降。值得注意的是,在僵直早期,Iced\*组糖原消耗较Iced组相对缓慢(图6),初步分析,在冰藏初期,Iced\*组的鱼体中心温度下降更快,鱼体温度较低,所以糖原降解受到部分抑制。随后冰藏条件下鱼体中心温度下降至相同水平(0.4~0.6 °C),2组的糖原降解速率均趋缓。

此外,糖原分解产生乳酸并积累,这是其pH值降低的主要原因。宰杀前激烈挣扎的大西洋鳕(*Gadus morhua*),能量消耗过大,导致糖原等含量较低,死后没有乳酸的积累,使得pH值持续升高<sup>[19]</sup>。本实验采用断脊椎速杀的方法使红

鳍东方鲀在死前处于自然松弛无挣扎的状态,减少鱼体挣扎,因此糖原含量较高,死后pH值有一个明显的下降过程。

健康鱼体含有丰富的能量物质,速杀后肌肉ATP含量高,可用于肌肉僵直收缩所需的能量消耗。鱼类和甲壳类的ATP分解一般是按ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx途径进行的,软体动物还有ATP→ADP→AMP→AdR→HxR→Hx这条途径。根据实验结果并没有检测到有AdR的存在,表明红鳍东方鲀死后ATP的分解是按ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx途径进行的。死前鱼类每克肌肉中存在数毫摩尔ATP,但死后肌体为了获得能量,ATP迅速被分解为ADP、AMP、IMP、Hx和HxR等代谢产物。根据实验结果,初始点的ATP含量较高,Iced\*组在僵直前期ATP被消耗,有所下降;Iced组在僵直前期ATP已经消耗殆尽,或许是因为贮藏前期Iced组中心温度比Iced\*组高,所以ATP分解较快。在实验结果中没有观察到AMP的存在,因为鱼类和甲壳类的肌肉中AMP脱氢酶的活性比较高,ATP和ADP含量快速下降,AMP很容易会转换为IMP。但5'-核苷酸酶活性比较低,导致IMP被蓄积,冰藏组红鳍东方鲀IMP有明显的上升再缓慢下降的现象,存在一个积蓄的过程;而大西洋鳕死后IMP在上升到最大值后快速下降<sup>[20]</sup>,巴塔哥尼亚扇贝

(*Zygochlamys patagonica*)死后的IMP则是一个下降的过程<sup>[21]</sup>。

本研究中所得到的最后的降解产物是Hx,主要表现在Cont组,死后早期积累的IMP迅速降解的结果导致了Hx显著积累,推测红鳍东方鲀死后核苷酸降解特点属于Hx积累型。

随着能量物质的消耗,僵直状态变化明显,不同蛋白质磷酸化程度的变化也较为显著。Cont组条带3、4、5、7和8的磷酸化程度明显高于Iced组,根据现有研究分析,条带4很有可能是6-磷酸果糖激酶(PFK)<sup>[22]</sup>。PFK是糖酵解的限速酶之一,可作用于果糖-6-磷酸,因此对该酶的调节是影响糖酵解作用的关键步骤。一方面,已经磷酸化的磷酸果糖激酶会使其与F-肌动蛋白的亲合力改变,而肌肉收缩会进一步增加磷酸果糖激酶的磷酸化水平以及与F-肌动蛋白的结合能力;另一方面,环AMP的级联效应会使果糖二磷酸酶2激活,同时使磷酸果糖激酶2受到抑制,使果糖-2, 6-二磷酸减少,从而达到抑制糖酵解的作用<sup>[23]</sup>。条带5可能为烯醇化酶,也是糖酵解过程中的限速酶。它可催化糖酵解过程中的放能阶段,2-磷酸甘油酸经烯醇化酶催化水合生成磷酸—烯醇式丙酮酸;又可作为磷酸丙酮酸水合酶,催化糖原合成过程中的逆向反应,可以使磷酸—烯醇式丙酮酸向2-磷酸甘油酸转化<sup>[24]</sup>。初步推测,条带3为糖原磷酸化酶,条带7为磷酸甘油酸激酶,条带8则可能为醛缩酶,均参与糖酵解反应,印证了之前糖原变化时得出的对照组糖原含量下降速率快于冰藏组的规律。

条带1是肌球蛋白重链,条带10是肌球蛋白轻链。肌球蛋白磷酸化分重链和轻链,但肌球蛋白主要受肌球蛋白轻链磷酸化调控<sup>[25]</sup>。当Ca<sup>2+</sup>与钙调蛋白结合后,肌球蛋白轻链激酶会使肌球蛋白轻链20(MLC 20)上第19位的丝氨酸磷酸化,而后会使得肌球蛋白构象发生变化,与肌动蛋白结合形成肌动球蛋白,激活横桥周期(crossbridge cycling)并导致肌肉收缩<sup>[26]</sup>。所以蛋白质磷酸化与肌肉僵直有关。当肌肉收缩时,磷酸化程度减弱;开始解僵后,磷酸化程度会加深。

综上所述,红鳍东方鲀在水产食品原料学属性方面有2个突出优势:一是优越的冰藏稳定性;二是突出的IMP积累特点。在死后冰藏期间,红鳍东方鲀贮藏稳定性优势表现在:鱼体最大僵直程度至少可达85%以上并可保持20~24

h,整个死后冰藏期间,僵直状态可维持3~4 d;有效冰藏能抑制ATP和糖原等能量物质代谢。从风味角度分析,在死后冰藏6 d内,ATP降解产物中独特的IMP优势积累,揭示了红鳍东方鲀冰鲜品突出的风味特点之一。此外,初步研究表明,红鳍东方鲀死后肌肉蛋白组分的磷酸化特性与鱼体僵直状态及程度有密切关联,需要进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] Watabe S, Kamal M, Hashimoto K. Postmortem changes in ATP, creatine phosphate, and lactate in sardine muscle[J]. *Journal of Food Science*, 1991, 56(1): 151-153.
- [2] Haard N F. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish[J]. *Food Research International*, 1992, 25(4): 289-307.
- [3] Huss H H. Quality and quality changes in fresh fish[R]. Rome, Italy: FAO, 1995.
- [4] Matos E, Gonçalves A, Nunes M L, et al. Effect of harvesting stress and slaughter conditions on selected flesh quality criteria of gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. *Aquaculture*, 2010, 305(1-4): 66-72.
- [5] 中华人民共和国农业部. 关于有条件放开养殖红鳍东方鲀和养殖暗纹东方鲀加工经营的通知[EB/OL]. <http://www.moa.gov.cn/nybg/2016/dishiqi/201712/P020180624661988609034.pdf>, 2016. The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Administration on conditionally lifting restrictions on processing and transaction businesses of cultured *Takifugu rubripes* and cultured *Takifugu obscurus*[EB/OL]. <http://www.moa.gov.cn/nybg/2016/dishiqi/201712/P020180624661988609034.pdf>, 2016.
- [6] 马妍, 谢晶, 周然, 等. 冷藏温度对河豚鱼微生物及品质特性的影响[J]. *食品科学*, 2012, 33(6): 288-292. Ma Y, Xie J, Zhou R., et al. Effect of temperature on microbiological and quality properties of puffer fish during cold storage[J]. *Food Science*, 2012, 33(6): 288-292(in Chinese).
- [7] 马妍, 谢晶, 周然, 等. 冻藏温度对河豚鱼鱼肉微观结构及生化指标的影响[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(5): 141-146. Ma Y, Xie J, Zhou R, et al. Effects of frozen storage temperature on ultrastructure and biochemical properties of *Takifugu obscurus*[J]. *Journal of Northwest A & F*



- University (Natural Science Edition), 2014, 42(5): 141-146(in Chinese).
- [ 8 ] 周然, 刘源, 谢晶, 等. 电解水对冷藏河豚鱼肉质构及品质变化的影响[J]. *农业工程学报*, 2011, 27(10): 365-369.
- Zhou R, Liu Y, Xie J, *et al.* Effects of electrolyzed water on texture and quality of obscure puffer fish (*Takifugu obscurus*) during cold storage[J]. *Transactions of the CSAE*, 2011, 27(10): 365-369.
- [ 9 ] 马妍, 谢晶, 周然, 等. 不同取代基羧甲基壳聚糖对冷藏河豚鱼品质的影响[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(15): 3131-3135.
- Ma Y, Xie J, Zhou R, *et al.* Effects of different substituent of carboxymethyl chitosan on cold stored puffer fish quality[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011, 50(15): 3131-3135(in Chinese).
- [10] 周然, 刘源, 谢晶, 等. 羧甲基壳聚糖涂膜保鲜冷藏河豚鱼品质的机理[J]. *制冷学报*, 2011, 32(6): 64-68.
- Zhou R, Liu Y, Xie J, *et al.* Preservation mechanism of carboxymethyl chitosan coating on puffer fish quality during cold storage[J]. *Journal of Refrigeration*, 2011, 32(6): 64-68(in Chinese).
- [11] 苏红, 申亮, 毕诗杰, 等. 复合生物保鲜剂结合冰温贮藏对红鳍东方鲀的保鲜效果[J]. *水产学报*, 2019, 43(3): 688-696.
- Su H, Shen L, Bi S J, *et al.* Preservation effect of complex biological preservative combined with ice temperature storage on *Takifugu rubripes*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(3): 688-696(in Chinese).
- [12] Tulli F, Fabbro A, D'Agaro E, *et al.* The effect of slaughtering methods on actin degradation and on muscle quality attributes of farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(11): 7182-7190.
- [13] 刘金洋, 刘俊荣, 田元勇, 等. 捕后处置对活品底播虾夷扇贝生化代谢的影响[J]. *水产学报*, 2017, 41(1): 81-87.
- Liu J Y, Liu J R, Tian Y Y, *et al.* Effects of post-harvest handling on biochemical metabolism of bottom cultured live scallop (*Patinopecten yessoensis*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(1): 81-87.
- [14] 刘慧慧, 周晏琳, 张晴, 等. 菲律宾蛤仔捕后干露处置对其复水湿藏稳定性的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2018, 33(2): 244-250.
- Liu H H, Zhou Y L, Zhang Q, *et al.* Effect of air exposure on biochemical metabolism of harvested Manila clam *Ruditapes philippinarum* during live wet storage[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2018, 33(2): 244-250(in Chinese).
- [15] Chen L J, Li X, Ni N, *et al.* Phosphorylation of myofibrillar proteins in post-mortem ovine muscle with different tenderness[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(5): 1474-1483.
- [16] 陈立娟, 李欣, 杨扬, 等. 不同嫩度羊肉肌浆蛋白质磷酸化水平随宰后成熟时间变化的研究[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(4): 95-101.
- Chen L J, Li X, Yang Y, *et al.* Analyzing the changes in sarcoplasmic protein phosphorylation with respect to postmortem ageing times in mutton with different levels of tenderness[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(4): 95-101(in Chinese).
- [17] Huang H G, Larsen M R, Lametsch R. Changes in phosphorylation of myofibrillar proteins during postmortem development of porcine muscle[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(3): 1999-2006.
- [18] Acerete L, Reig L, Alvarez D, *et al.* Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(1-2): 139-144.
- [19] Chalmers M, Careche M, Mackie I M. Properties of actomyosin isolated from cod (*Gadus morhua*) after various periods of storage in ice[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1992, 58(3): 375-383.
- [20] Fennema O R. *Food Chemistry*[M]. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996.
- [21] Massa A E, Paredi M E, Crupkin M. Nucleotide catabolism in cold stored adductor muscle of scallop (*Zygochlamys patagonica*)[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2002, 26(4): 295-305.
- [22] Huang H G, Larsen M R, Karlsson A H, *et al.* Gel-based phosphoproteomics analysis of sarcoplasmic proteins in postmortem porcine muscle with pH decline rate and time differences[J]. *Proteomics*, 2011, 11(20): 4063-4076.
- [23] Luther M A, Lee J C. The role of phosphorylation in the interaction of rabbit muscle phosphofructokinase with F-actin[J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(4): 1753-1759.
- [24] Bolten K E, Marsh A E, Reed S M, *et al.* *Sarcocystis neurona*: Molecular characterization of enolase domain I region and a comparison to other protozoa[J]. *Experimental Parasitology*, 2008, 120(1): 108-112.
- [25] Matsumura F, Totsukawa G, Yamakita Y, *et al.* Role of

- myosin light chain phosphorylation in the regulation of cytokinesis.[J]. *Cell Structure and Function*, 2001, 26(6): 639-644.
- [26] Simard E, Kovacs J J, Miller W E, *et al.*  $\beta$ -arrestin regulation of myosin light chain phosphorylation promotes at1ar-mediated cell contraction and migration[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80532.

## Postmortem biochemistry and rigor development of pufferfish (*Takifugu rubripes*)

LENG Hanbing, LIU Junrong\*, XU Meilu, WANG Xuanfei, YI Hongli, TIAN Yuanyong  
(College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** *Takifugu rubripes* were instant killed, bled and gutted, two treatments for 6 days storage were designed including storage in ice and at ambient temperature, respectively. During storage, the progression of rigor mortis and body temperature were recorded. Sampling and assay were carried out at both different rigor stages and every storage day, and rigor index, ATP and related compounds, glycogen, pH and phosphoprotein were selected as indicators as postmortem biochemical changes. The results showed that the onset of rigor mortis for iced treatment started at around 7<sup>th</sup> hour after being slaughtered, and its maximum rigor index was up to 89% with 20-24 hours duration in stiff, the fish body maintained at rigor with rigor index at 9%-16% after 4 days icing storage. However, the maximum rigor index of 71% was observed fleetingly in the control treatment with higher temperature ambient, and the whole rigor progression or stages were undefined. Glycogen degraded sharply at the initial post-mortem period for all treatments. Comparing with the trace amounts was still detected in 5 days storage for the iced treatment, glycogen was almost depleted after 3 days storage in the control treatment. The pH decreasing patterns of two treatments reflected the different glycogen consumption rates between the two storage treatments. ATP was rapidly depleted in all treatments with accumulation of IMP exclusively. Maximum of IMP reached to 9.5  $\mu\text{mol/g}$  on the 3rd day and remained at about 7.5  $\mu\text{mol/g}$  on the 6<sup>th</sup> day of the iced treatment. As to the control treatment, IMP was degraded rapidly after the maximum of 9.2  $\mu\text{mol/g}$  on the 1st storage day with higher temperature. Compared to the iced treatment with a trace Hx amounts, the control treatment presented a significant accumulation of Hx. Muscle protein phosphorylation indicated that the rigor mortis progression of *T. rubripes* was also related to the properties of muscle protein components. Notably, the protein components related to glycolytic enzymes had a significant difference in phosphorylation between the iced and ambient treatment. The ambient treatment presented higher phosphorylation level, which is consistent with the glycolysis properties observed in ambient treatment. In conclusion, *T. rubripes* advanced in icing stability and high accumulation of IMP after being slaughtered, and the association between protein phosphorylation level and the process of rigor mortis is worth exploring further.

**Key words:** *Takifugu rubripes*; rigor mortis; postmortem biochemistry

**Corresponding author:** LIU Junrong. E-mail: ljunrong@dlou.edu.cn

**Funding projects:** National Key R&D Program of China (2018YFD0901001); National Natural Science Foundation of China (31671790)