



花鲈冰藏过程中肌原纤维蛋白生化特性与新鲜度变化的相关性

相悦^{1,2}, 孙承锋², 李来好^{1,3}, 杨贤庆^{1,3}, 吴燕燕^{1,3},
岑剑伟^{1,3}, 魏涯^{1,3}, 李锐^{1,2}, 赵永强^{1,3*}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部水产品加工重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 烟台大学生命科学学院, 山东 烟台 264005;

3. 大连工业大学, 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034)

摘要: 为研究冰藏期间花鲈鱼片的品质及蛋白质生化特性的变化, 通过感官评分、pH、质构、色差、硫代巴比妥酸值(TBA值)、挥发性盐基氮(TVB-N)值、菌落总数(TVC)和肌原纤维蛋白含量、巯基、羰基含量的测定及十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确定了冰藏花鲈鱼片理化指标变化, 并对肌原纤维蛋白生化特性与主要的新鲜度指标进行相关性分析。结果显示, 花鲈鱼片冰藏期间亮度值、红度值、硬度值分别由 57.92 ± 0.66 、 $-(4.34 \pm 0.39)$ 、 174.92 ± 16.80 降低至 46.62 ± 1.54 、 $-(5.21 \pm 0.08)$ 、 122.25 ± 15.73 ; pH呈先降低后增加的趋势; TBA值、TVB-N值随贮藏时间的延长分别由 (0.35 ± 0.01) mg/kg与 (9.41 ± 1.03) mg/100 g增加至 (0.97 ± 0.04) mg/kg与 (33.18 ± 0.83) mg/100 g; 贮藏至第16天时菌落总数达 (6.35 ± 0.41) lg(CFU/g), 已超过二级鲜度标准, 且感官分值不可接受。贮藏期间肌原纤维蛋白含量、巯基含量分别由 (104.21 ± 3.42) mg/g与 (145.81 ± 1.02) μ mol/g prot下降至 (72.03 ± 5.25) mg/g与 (137.28 ± 1.29) μ mol/g prot, 羰基含量由 (0.63 ± 0.03) nmol/mg增加至 (1.45 ± 0.06) nmol/mg。SDS-PAGE电泳图谱显示, 在30 ku附近产生新的蛋白条带。相关性分析表明, TBA值、菌落总数、蛋白含量与羰基含量之间具有良好的相关性。研究表明, 花鲈鱼片冰藏至第16天时达到不可食用程度, 贮藏后期微生物的大量繁殖、脂质氧化与蛋白质氧化间的相互作用可能是品质劣变的主要原因。

关键词: 花鲈; 冰藏; 新鲜度; 蛋白质; 生化特性; 相关性

中图分类号: TS 254.1; S 985.1

文献标志码: A

花鲈(*Lateolabrax japonicus*)又名海鲈、七星鲈等, 是我国重要的经济海水鱼类之一^[1]。花鲈营养丰富, 蛋白质与氨基酸含量高, 且富含维生素和人体必需脂肪酸, 现已成为人们日常饮

食的重要组成部分。然而, 鱼肉中含有大量蛋白氮、非蛋白氮及内源酶, 极易受到微生物污染造成腐败变质^[2]。Cai等^[3]采用 ϵ 聚赖氨酸结合海藻酸钠对 (4 ± 1) °C下贮藏的整条花鲈进行涂膜

收稿日期: 2020-03-02 修回日期: 2020-05-21

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901006); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-47); 广州市珠江科技新星专项(201710010167); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2020TD73); 广东省现代农业产业技术体系海水鱼产业创新项目(2019KJ143); “扬帆计划”引进创新创业团队专项(2015YT02H109)

第一作者: 相悦(照片), 从事水产品加工与质量安全研究, E-mail: xiangxiaoyue@139.com

通信作者: 赵永强, E-mail: zhaoyq@scsfri.ac.cn



保鲜,结果表明,涂膜可有效抑制微生物生长、蛋白质降解及脂肪氧化,并较好地保持花鲈的感官品质;蓝蔚青等^[4]采用流化冰预冷处理的方式模拟花鲈流通过程,发现流化冰具有良好的控温作用,能有效维持鱼片的鲜度;Cai等^[5]研究了3种不同预冻方式对 $(0\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下贮藏的花鲈鱼片新鲜度的影响,结果表明, -55°C 冷冻后转移至 -18°C 的预冻方式的保鲜效果好于 -18°C 与 -55°C 的单独预冻方式。低温贮藏可抑制微生物和内源性蛋白酶活性,延长鱼类的货架期,减少鱼类腐败带来的经济损失。冷藏与冻藏是常见的贮藏方式,但冷冻过程中冰晶的增加易造成持水力下降、蛋白质变性、微观结构破坏等问题,在实际运输过程常采用冰鲜保藏的方式延长花鲈的保质期^[6]。与冷藏方式相比,冰藏能较大程度维持细胞结构,更有效抑制酶活性及微生物繁殖,延长鱼肉货架期^[7]。近年来有关冷藏及冷冻保鲜花鲈的研究较多,而对于冰鲜花鲈新鲜度变化与蛋白质生化特性变化的相关性研究较少。因此,本研究主要探究冰藏期间花鲈的新鲜度变化及蛋白质的生化特性的变化,并对其进行相关性分析,以期明确花鲈冰藏期间的品质劣变机理提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与材料

FM 400A 型制冰机,美国 Grant 公司; T25 型均质机,德国 IKA 公司; QTS-25 型质构仪,英国 CNS FARNELL 公司; CR-400 型全自动色差计,日本柯尼卡美能达控股公司; Kjeltc™2300 型蛋白自动分析仪,丹麦 FOSS 公司; Sunrise-basic Tacan 吸光酶标仪,瑞士 TECAN 公司; Agilent 1100 液相色谱仪,美国 Agilent 公司; Image Scanner III 扫描仪,美国 EPSON 公司。

总蛋白质测定试剂盒(考马斯亮蓝法)、微量总巯基测试盒、蛋白质羰基含量测试盒均购自南京建成生物工程有限公司; BeycoColor™ 彩色预染蛋白、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;其他常规试剂均为分析纯。

1.2 花鲈样品处理

鲜活花鲈[体质量 $(500\pm 60)\text{g}$]购于广州华润万家超市,立即运回实验室,击晕、放血,取背部肌肉,去皮,修整为 $6\text{cm}\times 3\text{cm}\times 1.5\text{cm}$ 规格鱼块,无菌水清洗,沥干后装入无菌聚氯

乙烯密封袋,立即置于装满碎冰的泡沫箱贮存,每12h换1次冰。每隔4天随机取3片鱼片进行后续指标的测定。

1.3 质构

参考黄卉等^[8]的方法,略作改动。将鱼片切成 $2.0\text{cm}\times 1.5\text{cm}\times 1.0\text{cm}$ 大小,并放置至室温,采用 QTS-25 型质构仪,选择 TA44 平底圆柱形探头在 TPA 模式下进行样品测定,平行测定6次。TPA 模式测定参数:测试速度 0.5mm/s ,触发点负荷为 5.0g ,测试距离为 5mm 。测定的质构参数包括硬度、黏力、内聚性、弹性、胶着性、咀嚼性。

1.4 色差

采用 CR-400 型全自动色差计对不同贮藏期的花鲈鱼片进行色差测定。测定的参数主要包括亮度值(lightness, L^*)、红度值(redness, a^*)和黄度值(yellowness, b^*)。测试点为鱼背部肌肉,每组取3片样品进行测定,每片鱼片取6点进行测定。

1.5 硫代巴比妥酸(TBA)值

参考 Chaijan 等^[9]方法略作修改。准确称取 5.00g 鱼肉,加入7.5%三氯乙酸溶液(含0.1% EDTA- Na_2) 25mL ,振摇30min后用双层滤纸过滤,取 5mL 上清液加入等体积 0.02mol/L TBA 溶液,沸水浴加热40min后冷却至室温,加入 5mL 三氯甲烷充分振摇后静置,测定上清液在 532nm 处的吸光度,同时做试剂空白实验。选用不同浓度的1,1,3,3-四乙氧基丙烷溶液,按测定步骤操作,测得光密度绘制标准曲线,以丙二醛的含量表征 TBA 值。

1.6 挥发性盐基氮(TVB-N)

按照 GB 5009.228—2016《食品中挥发性盐基氮的测定》方法进行测定。

1.7 pH

按照 GB 5009.237—2016《食品安全国家标准 食品 pH 值的测定》方法进行测定。

1.8 菌落总数(TVC)

按照 GB 4789.2—2016《食品微生物学检验—菌落总数测定》方法进行测定。

1.9 感官评定

参考李莎等^[10]的感官评价方法,对冰藏20d

的花鲈进行感官评定。感官小组由 6 名成员组成, 分别对鱼片的色泽、气味、组织形态以及肌肉弹性进行评定, 具体评分标准见表 1。鱼片的综

合感官得分在 17~20 分为新鲜度极好, 9~16 分为品质良好, 8 分以下表明品质发生明显劣变。

表 1 花鲈鱼片的感官评分标准
Tab. 1 Criteria of sensory evaluation for *L. japonicus* fillets

分值 score	色泽 colour	气味 odour	组织形态 appearance	肌肉弹性 springiness
5	色泽正常, 肌肉切面富有光泽	具有鱼特有的风味, 无异味	肌肉组织致密完整, 纹理清晰	肌肉坚实富有弹性, 手指压后凹陷立即消失
4	色泽正常, 肌肉切面富有光泽	具有鱼特有的风味, 无明显异味	肌肉组织致密完整, 纹理清晰	肌肉坚实有弹性, 手指压后凹陷消失较快
3	色泽稍暗淡, 肌肉切面稍有光泽	略有鱼腥味	肌肉组织紧密, 纹理较清晰	肌肉有弹性, 手指压后凹陷消失稍慢
2	色泽较暗淡, 肌肉切面无光泽	有明显鱼腥味	肌肉组织略有松散	肌肉稍有弹性, 手指压后凹陷消失很慢
1	色泽暗淡, 肌肉切面无光泽	有强烈腥臭味或氨味	肌肉组织松散	肌肉无弹性, 手指压后凹陷明显

1.10 肌原纤维蛋白的提取及含量测定

参照 Hashimoto 等^[11]的方法略作改动, 准确称取 2.00 g 鱼肉, 加入 20 mL 磷酸缓冲液 A (15.6 mmol/L Na₂HPO₄, 3.5 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.5) 均质后浸提 30 min, 8 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 重复上述操作 2 次, 沉淀中加入 20 mL 磷酸缓冲液 B(0.45 mol/L KCl, 15.6 mmol/L Na₂HPO₄, 3.5 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.5) 浸提 4 h, 8 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 重复上述操作 2 次, 合并的上清液即为肌原纤维蛋白。提取过程全程在冰浴条件下进行, 将肌浆蛋白与肌原纤维蛋白于液氮速冻后, 立即转至-80℃冰箱保存备用。采用考马斯亮蓝试剂盒法对肌原纤维蛋白进行定量分析。

1.11 十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

取“肌原纤维蛋白的提取及含量测定”中提取的肌原纤维蛋白于 4℃解冻后稀释至浓度为 1 mg/mL, 参考袁悦等^[12]的方法, 分别配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶, 上样量为 10 μL, 电泳至溴酚蓝指示剂到达胶底。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色 6 h, 之后脱色至无背景颜色, 用凝胶成像系统扫描并分析条带。

1.12 巯基与羰基含量

取“肌原纤维蛋白的提取及含量测定”中提取的肌原纤维蛋白, 分别参照南京建成生物工程有限公司蛋白质巯基含量测试盒与蛋白质羰基含量测试盒说明书进行测定。

1.13 数据分析

使用 IBM SPSS Statistics® Version 23 软件对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 组内显著性差异采用 Duncan 氏多重比较, 采用皮尔森相关系数进行相关性分析。 $P<0.05$ 表示差异显著。各组计算数据均以平均值±标准差 (mean±SD) 表示。

2 结果

2.1 质构

质构是反映鱼片质地的重要指标, 与鱼肉的口感、组织形态等感官品质密切相关。新鲜鱼片的硬度值、内聚性和咀嚼性分别为 174.92 ± 16.80 、 0.55 ± 0.06 和 2.79 ± 0.60 , 冰藏后期花鲈鱼片的硬度、内聚性和咀嚼性均显著降低 ($P<0.05$)。而黏力、弹性及胶着性在整个贮藏过程中出现小范围波动。咀嚼性及硬度值分别于 8 和 12 d 时显著下降 ($P<0.05$), 至贮藏末期 (20 d), 咀嚼性与硬度值分别下降 36.56% 和 30.11%, 内聚性下降 20%(表 2)。研究结果与黄卉等^[8]的结果相一致。

2.2 色差

色差是反映鱼肉新鲜度较为直观的指标之一, 鱼肉的颜色主要与肌红蛋白的含量和脂质的氧化程度有关^[13], 另外还与 pH 和氧化还原电位等内在因素以及贮藏温度等外在因素有关^[8]。0 d 时新鲜鱼片的 L^* 、 a^* 和 b^* 分别为 57.92 ± 0.66 、 $-(4.34\pm 0.39)$ 和 2.52 ± 0.13 , 随着贮藏时间的延长, L^* 与 a^* 显著降低 ($P<0.05$), 分别下降了 19.51% 和 20.05%。黄度值呈增加趋势, 但无显著变化 ($P>$

表 2 冰藏期间花鲈鱼片质构的变化

Tab. 2 Changes in texture properties of <i>L. japonicus</i> fillets during ice storage						
贮藏时间/d storage time	硬度/g hardness	黏力/g adhesive force	内聚性 cohesiveness	弹性/m springiness	胶着性/g gumminess	咀嚼性/mJ chewiness
0	174.92±16.80 ^a	4.83±1.64 ^a	0.55±0.06 ^a	3.82±0.17 ^a	82.57±26.66 ^a	2.79±0.60 ^a
4	159.67±25.97 ^a	3.36±0.32 ^b	0.52±0.04 ^a	3.29±0.12 ^{ab}	68.79±10.28 ^b	2.31±0.35 ^{ab}
8	155.25±20.79 ^a	3.42±0.53 ^{ab}	0.44±0.04 ^b	3.34±0.16 ^{ab}	59.37±11.29 ^b	1.91±0.36 ^{bc}
12	141.64±20.97 ^b	3.93±1.20 ^{ab}	0.43±0.07 ^b	3.26±0.28 ^{ab}	61.41±12.36 ^b	1.97±0.46 ^{bc}
16	129.86±25.20 ^b	4.50±1.70 ^{ab}	0.42±0.05 ^b	3.19±0.21 ^b	59.83±9.16 ^b	1.93±0.41 ^c
20	122.25±15.73 ^b	4.08±1.36 ^{ab}	0.44±0.03 ^b	3.07±0.21 ^b	57.17±6.34 ^b	1.77±0.25 ^c

注：同列中标注不同角标者具有显著性差异($P<0.05$)
Notes: in the same column, values with different superscripts mean significant differences ($P<0.05$)

0.05)。白度值由初始的 57.62 ± 0.06 降低到 46.16 ± 1.56 ，降低了 19.89%，但无显著变化(表 3)。另有研究报道 4 °C 冷藏加州鲈 (*Micropterus salmoides*) 的白度值随贮藏时间的延长显著降低^[14]。

表 3 冰藏过程中花鲈鱼片色差值的变化

Tab. 3 Changes in color of <i>L. japonicus</i> fillets during ice storage						
色差 colour	0 d	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d
L*	57.92±0.66 ^a	52.34±2.89 ^{bc}	50.47±1.01 ^{bc}	49.77±1.21 ^{bc}	48.03±0.46 ^c	46.62±1.54 ^c
a*	-(4.34±0.39) ^a	-(4.61±0.63) ^{ab}	-(4.58±0.05) ^{ab}	-(4.75±0.15) ^{ab}	-(5.21±0.06) ^b	-(5.21±0.08) ^b
b*	2.52±0.13 ^a	2.61±1.68 ^a	2.57±0.69 ^a	3.62±0.27 ^a	4.07±0.09 ^a	4.65±0.40 ^a
白度 whiteness	57.62±0.60 ^a	52.03±2.72 ^a	50.19±0.97 ^a	49.42±1.24 ^a	47.67±0.46 ^a	46.16±1.56 ^a

注：同行中标注不同角标者具有显著性差异($P<0.05$)
Notes: in the same line, values with the different superscripts mean significant differences ($P<0.05$)

2.3 TBA 值

TBA 值已被广泛用于评估水产品脂质氧化的程度^[15]，脂肪的初级氧化产物中的过氧化物继续氧化，产生能与硫代巴比妥酸试剂反应的丙二醛，并生成红色化合物，其颜色的深浅反映 TBA 值高低。新鲜花鲈鱼片的 TBA 值为 (0.35 ± 0.01) mg/kg，随冰藏时间的延长，TBA 值显著升高 ($P<0.05$)，且 12 d 后其增长速率明显提高，冰藏至 20 d 时 TBA 值达到 (0.97 ± 0.04) mg/kg。Yu 等^[15]研究发现，贮藏后期草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 的 TBA 值迅速增加，已由初始的 0.20 增加至 1.11 mg/kg(图 1)。

2.4 TVB-N 值

挥发性盐基氮是蛋白质及非蛋白含氮化合物(如核酸等)在微生物和内源酶作用下降解所得的碱性含氮化合物，主要由三甲胺、二甲胺和氨组成，是表征鱼肉新鲜度的重要指标^[16]。0 d 时花鲈鱼片的 TVB-N 值较低，为 (9.41 ± 1.03) mg/

100 g，8 d 时 TVB-N 值小于 20 mg/100 g，仍在二级鲜度范围内，16 d 时达到 (25.22 ± 1.14) mg/100 g，

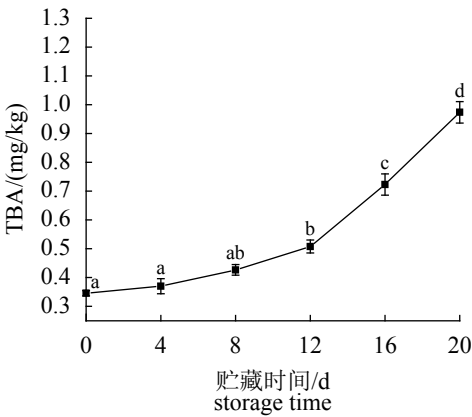


图 1 冰藏过程中花鲈鱼片 TBA 值的变化
图中不同小写字母表示不同时间点之间差异显著 ($P<0.05$)，下同

Fig. 1 Changes in TBA of *L. japonicus* fillets during ice storage

Different letters indicated significant differences among different time ($P<0.05$), the same below

超过 Giménez 等^[17] 建议的 25 mg/100 g 鲜度标准, 贮藏末期达到 (33.18 ± 0.83) mg/100 g(图 2), 已超过 GB 2733—2015《食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品》中规定的 30 mg/100 g 的鲜度标准。

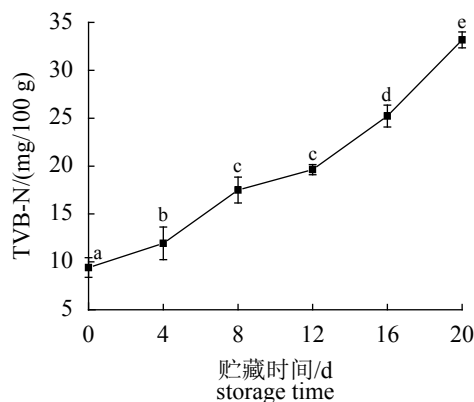


图 2 冰藏过程中花鲈鱼片 TVB-N 值的变化
Fig. 2 Changes in TVB-N of *L. japonicus* fillets during ice storage

2.5 pH

鱼肉的 pH 与死后僵直、肌肉的收缩代谢和组织结构有关, 同时还受物种、饮食、季节、活动水平或捕获地理位置的影响^[16]。0 d 时花鲈 pH 为 7.00 ± 0.04 , 随贮藏时间的延长, 花鲈鱼片的 pH 值先降低后升高, 这与鞠健等^[18] 对真空包装微冻鲈鱼片 pH 值的报道结果相似。贮藏至第 8 天时, pH 值下降至 6.53 ± 0.05 , 至第 20 天时增加到 7.19 ± 0.03 (图 3)。

2.6 TVC 值

冰藏过程中花鲈鱼片 TVC 值在贮藏前期(0~

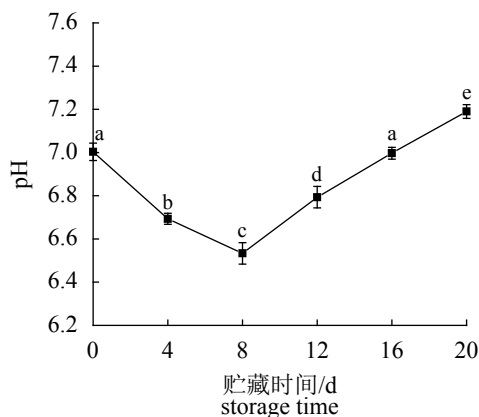


图 3 冰藏过程中花鲈鱼片 pH 的变化
Fig. 3 Changes in pH of *L. japonicus* fillets during ice storage

4 d) 变化较小, 且未超过 4.00 lg(CFU/g), 鱼片属于一级鲜度, 贮藏 8 d 后菌落总数显著增加 ($P < 0.05$), 与本实验中 TVB-N 值的变化趋势相似, 表明冰藏可抑制贮藏前期微生物的生长, 且贮藏前期 TVB-N 值的增加受微生物活性的影响较小。花鲈鱼片冰藏至 16 d 时, TVC 值 [lg(CFU/g)] 达到 6.35 ± 0.41 (图 4), 已超过数值为 6 的二级鲜度标准, 表明鱼片已发生严重腐败变质。

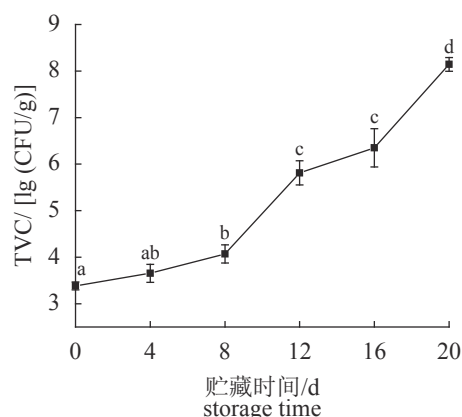


图 4 冰藏过程中花鲈鱼片菌落总数的变化
Fig. 4 Changes in total viable count of *L. japonicus* fillets during ice storage

2.7 感官评分

花鲈的感官评分随贮藏时间的延长而不断降低(图 5)。新鲜的鱼片色泽明亮, 组织质地紧密、纹理清晰, 富有弹性, 无异味。花鲈在冰藏 0~8 d 期间新鲜度较为良好, 随后在微生物及酶的作用下肌肉组织松散, 12 d 时感官评分为

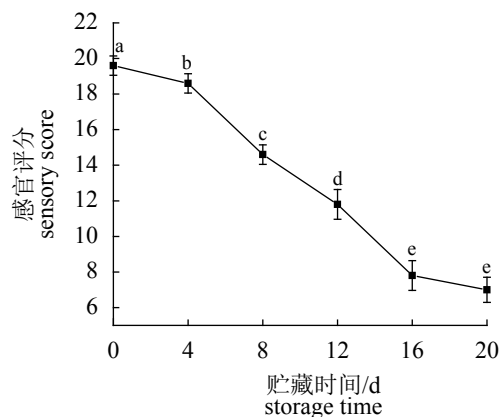


图 5 冰藏过程中花鲈鱼片感官分值的变化
Fig. 5 Changes in sensory evaluation value of *L. japonicus* fillets during ice storage

11.8±0.84, 鱼片黏液增加, 但仍在可接受范围内。16 d 时感官评分低于 8 分, 且鱼片质地变软、颜色暗淡, 并出现腐氨臭味, 品质发生了明显劣变, 达到不可接受的程度。

2.8 肌原纤维蛋白含量

新鲜度指标的数据表明, 冰藏花鲈鱼片 16 d 时失去其可食用价值, 故对 16 d 内的蛋白质生化特性进行测定。鱼肉中肌原纤维蛋白含量最高, 约占总蛋白的 50%~70%。实验测得第 0 天花鲈鱼片肌肉组织中肌原纤维蛋白含量为 (104.21±3.42) mg/g, 与李娜等^[19] 对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 肌原纤维蛋白含量的研究结果相似。贮藏 12 d 后, 肌原纤维蛋白含量显著下降 ($P<0.05$), 至贮藏末期 (16 d) 降为 (72.03±5.25) mg/g, 降低了 56%(图 6)。

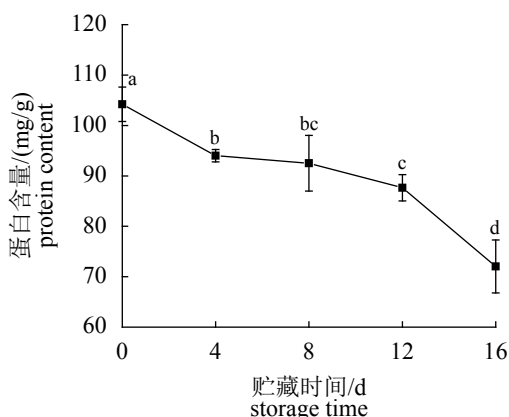


图 6 冰藏过程中花鲈鱼片肌原纤维蛋白含量的变化

Fig. 6 Changes in myofibrillar protein content of *L. japonicus* fillets during ice storage

2.9 肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 电泳

冰藏花鲈鱼片肌原纤维蛋白的分子量主要集中在 11~270 ku, 主要的蛋白质有肌球蛋白重链 (MHC, 200 ku)、肌动蛋白 (actin, 45 ku)、原肌球蛋白 (tropomyosin, 35 ku) 和肌球蛋白轻链 (MLC, 15 ku)^[12]。随着贮藏时间的延长, 条带 I 的颜色变浅, 而条带 II 和 tropomyosin 条带的颜色明显变深。此外 30 ku 附近出现一条新条带 (条带 III)(图 7), 该结果与 Sun 等^[20] 对冷藏草鱼蛋白质的电泳结果相似。

2.10 巯基含量

半胱氨酸是蛋白质氧化修饰中最敏感的氨

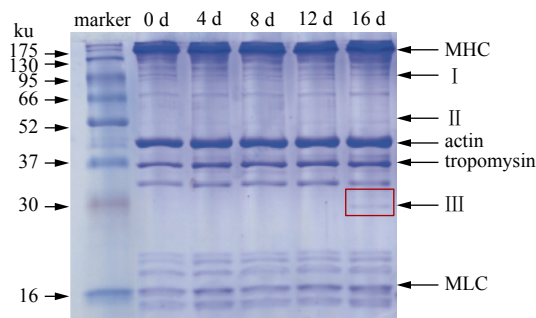


图 7 冰藏过程中花鲈鱼片肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE pattern of myofibrillar protein of *L. japonicus* fillets during ice storage

基酸之一, 活性巯基主要存在于半胱氨酸, 巯基的氧化通常被认为是蛋白质氧化的最初反应之一。第 0 天花鲈肌原纤维蛋白的总巯基含量为 (145.81±1.02) μmol/g prot, 0~8 d 巯基含量存在小范围波动且无显著变化 ($P>0.05$)。随后巯基含量呈先增加后下降的趋势, 此结果与 Benjakul 等^[21] 的研究结果一致。12 d 后巯基含量显著下降 ($P<0.05$), 到贮藏末期巯基含量下降了 6.21%, 为 (137.28±1.29) μmol/g prot (图 8)。

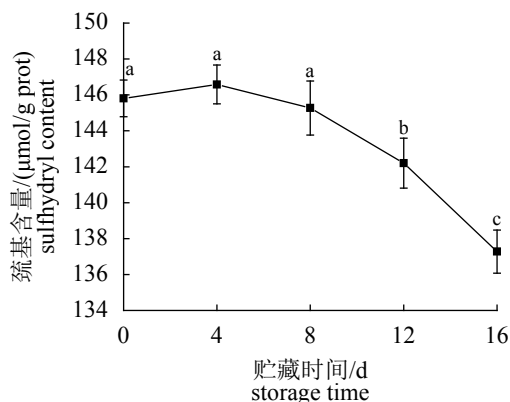


图 8 冰藏过程中花鲈鱼片总巯基含量的变化

Fig. 8 Changes in total sulfhydryl content of *L. japonicus* fillets during ice storage

2.11 羰基含量

蛋白质氧化造成蛋白质骨架裂解、交联聚集、部分氨基酸残基转化为羰基, 羰基的生成主要有 4 种途径: 氨基酸侧链存在 NH-或 NH₂-基团时易被直接氧化、肽主链断裂、与还原糖发生反应和结合非蛋白羰基化合物^[22]。羰基是反映蛋白质氧化程度的有效指标, 第 0 天花鲈肌原

纤维蛋白的羰基含量为(0.63±0.03) nmol/mg(图9), 鱼体死后出现氧化应激反应, 产生部分羰基化蛋白质, 羰基化程度因物种、肌肉类型和年龄差异而不同^[23]。冰藏期间花鲈鱼片蛋白质羰基含量不断增加, 特别是12 d后迅速增加, 到16 d时已达到(1.45±0.06) nmol/mg。

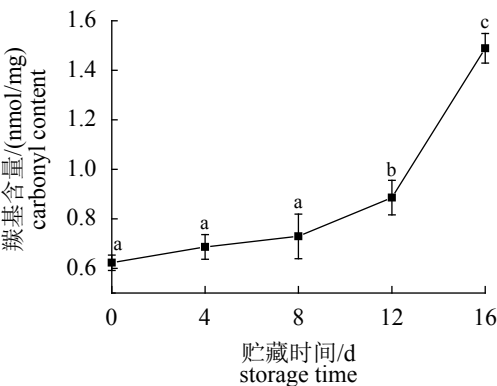


图9 冰藏过程中花鲈鱼片羰基含量的变化

Fig. 9 Changes in carbonyl content of *L. japonicus* fillets during ice storage

2.12 相关性分析

将表征新鲜度的主要指标(硬度值、色差、TBA、TVB-N和TVC)与蛋白质生化特性指标(肌原纤维蛋白含量、羰基含量、巯基含量)进行

了皮尔逊相关性分析(表4)。结果表明, TBA值、菌落总数均与蛋白含量及羰基含量之间存在良好的相关性(相关性系数 $r>0.8$, $P<0.01$)。其中TBA值与羰基含量相关系数最高($r=0.924$, $P<0.01$)。TVC与蛋白含量呈显著负相关($r=-0.865$, $P<0.01$), 与羰基含量呈显著正相关($r=0.857$, $P<0.01$)。另外, 硬度值与TBA、菌落总数及羰基含量间具有良好的相关性($r>0.7$, $P<0.01$)。亮度值与肌原纤维蛋白含量呈显著正相关($r=0.916$, $P<0.01$), 黄度值与蛋白羰基含量呈显著正相关($r=0.802$, $P<0.01$)。a*与b*、TBA值、菌落总数、羰基含量、蛋白含量相关性良好($r>0.7$, $P<0.01$)。此外, TVB-N值与菌落总数、肌原纤维蛋白含量以及巯基含量相关性显著($r>0.7$, $P<0.01$)。肌原纤维蛋白含量与羰基含量呈显著负相关($r=-0.820$, $P<0.01$)。鞠健等^[24]研究冷藏花鲈新鲜指标与蛋白质生化指标的相关性时发现, TVB-N值与总巯基、肌原纤维蛋白溶出量均呈显著负相关。

3 讨论

3.1 质构与色差

贮藏前期质构指标的变化主要与内源酶参与蛋白质的降解有关, 鱼死后释放Ca²⁺激活Ca²⁺蛋白酶, 从而水解肌球蛋白Z线部位, 使肌节

表4 冰藏期间花鲈鱼片品质特性与肌原纤维蛋白生化特性之间的相关性分析

Tab. 4 Correlation analysis between freshness index and biochemical properties of myofibrillar protein from *L. japonicus* fillets during ice storage

指标 index	H	L*	a*	b*	TBA	TVB-N	TVC	Prot	Sul	Car
H	1	0.445	0.484	-0.676**	-0.798**	-0.401	-0.771**	0.670**	-0.422	-0.795**
L*		1	0.550	-0.448	-0.754**	-0.697**	-0.697**	0.916**	-0.676**	-0.627*
a*			1	-0.743**	-0.761**	-0.625*	-0.737**	0.702**	-0.420	-0.751**
b*				1	0.726**	0.430	0.775**	-0.638*	0.353	0.802**
TBA					1	0.621*	0.907**	-0.904**	0.504	0.924**
TVB-N						1	0.706**	-0.738**	0.711**	0.473
TVC							1	-0.865**	0.593*	0.857**
Prot								1	-0.619*	-0.820**
Sul									1	0.316
Car										1

注: H. 硬度值; Prot、Sul和Car分别表示肌原纤维蛋白含量、巯基含量和羰基含量; *. 在0.05水平(双侧)上显著相关; **. 在0.01水平(双侧)上显著相关

Notes: H. hardness; Prot, Sul and Car represent the content of myofibrillar protein, sulphhydryl and carbonyl respectively; *. significant correlation at 0.05 level (both sides); **. significant correlation at 0.01 level (both sides)

断开,肌原纤维之间变得疏松,从而导致僵直肌肉的硬度逐渐降低^[25]。贮藏后期,微生物加速繁殖,蛋白质发生氧化和降解,导致蛋白质网状结构被破坏,鱼片硬度值显著下降。因此,硬度值与菌落总数呈显著负相关($r=-0.771$, $P<0.01$)。此外,硬度值与羰基含量也呈显著负相关($r=-0.795$, $P<0.01$)。蛋白质羰基化修饰会导致蛋白质网状结构被破坏,细胞间结合力下降,从而导致硬度值下降^[26]。本次相关性分析得出硬度值与菌落总数存在一定相关性,而当前部分研究认为,与内源性蛋白酶相比,微生物在冷藏鱼肉质软化中的作用较小^[27]。鱼肉软化的具体机理仍需深入探究,今后可对蛋白酶与微生物在鱼肉软化中的不同作用机理做进一步分析。

贮藏后期肌原纤维蛋白含量下降,蛋白质变性破坏了肌原纤维网状结构,使得表面自由水含量减少,导致鱼肉 L^* 在贮藏后期显著降低。因此, L^* 值与肌原纤维蛋白含量相关性较强($r=0.916$, $P<0.01$)。此外, a^* 值与鱼肉中肌红蛋白及血红蛋白的含量有关,肌红蛋白及色素的氧化变性均影响肌红蛋白结构和氧化还原状态,当肌红蛋白第六配位点被水占据,且血红素中的铁以铁离子形式存在时,会造成高铁肌红蛋白的积累,使贮藏后期鱼肉颜色逐渐变暗并呈红褐色^[13]。贮藏后期微生物大量滋生,鱼肉在光线、温度及酶等引发因素的作用下发生脂肪氧化,导致 b^* 值升高,花鲈鱼片肉色发黄。另外,脂肪氧化产生的脂质过氧化物可进一步促进肌红蛋白氧化^[28],故 a^* 、 b^* 值均与菌落总数、脂肪氧化及蛋白质氧化指标(TBA 值、羰基含量)具有良好的相关性($r>0.7$, $P<0.01$)。综上所述,花鲈贮藏过程中色差值的改变与脂肪氧化、蛋白质氧化及变性有关。

3.2 TBA 值、感官评分与 pH 值

TBA 值与菌落总数呈显著正相关($r=0.907$, $P<0.01$)。丙二醛的显著增加一方面与贮藏后期营养物质流失致使微生物大量繁殖有关,另一方面可能与鱼肉贮藏中释放的过氧化物酶加剧了脂肪的氧化酸败有关。花鲈粗脂肪含量约为 1.58%^[29],但其不饱和脂肪酸含量丰富,也是贮藏后期 TBA 值升高的原因之一。此外, TBA 值与羰基含量也呈显著正相关($r=0.924$, $P<0.01$)。脂质氧化产生的羟基自由基、氢过氧化物和次级氧化产物

均能与蛋白质反应,促进羰基衍生物的形成。参与蛋白质氧化过程的超氧阴离子和过氧化氢也可促进不饱和脂肪酸氧化^[28]。本次实验结果中 TBA 值未出现下降趋势,故可推测,丙二醛与蛋白质共价结合不是冰藏花鲈鱼片中羰基形成的主要原因。TBA 与蛋白质含量呈显著负相关($r=-0.904$, $P<0.01$),可能与肌红蛋白、血红蛋白变性后释放的大量非血红素铁及亚铁血红素促进脂肪氧化有关。

鱼肉腐败后产生的腐臭味主要与微生物的活性有关^[15],微生物中的酶,如氨基酸脱羧酶将游离氨基酸脱羧转变为与产异味相关的胺类等,此外,脂质氧化产物醛酮等小分子也与异味的形成有关。样品的感官评分与微生物指标均表明,冰藏至 16 d 的花鲈鱼片已达到不可食用的程度。贮藏期间鱼肉的 pH 值与贮藏时间并没有良好的相关性,故单一的 pH 指标不能较好地反映花鲈鱼片新鲜程度。贮藏前期鱼肉 pH 值下降与细菌无氧发酵导致鱼肉中乳酸等有机酸含量增加有关。ATP 降解引起无机磷酸盐的积累也是导致 pH 值降低的原因之一^[20]。另有研究表明,大多数鱼的肌肉组织中仅含有非常少的碳水化合物($<0.5\%$),并且在死后只产生少量的乳酸, pH 的降低也可归因于鱼肉样品中 CO_2 的溶解^[15]。贮藏 8 d 后 pH 上升,主要是由于蛋白质分解,导致挥发性碱性物质(如氨和三甲胺等)含量不断增加。

3.3 蛋白质相关指标的关联分析

TVB-N 值在贮藏后期迅速升高,与微生物大量繁殖加速了蛋白质的分解有关。相关性结果表明,TVB-N 值与巯基呈显著正相关($r=0.711$, $P<0.01$),而与羰基含量间的相关性极弱($r=0.473$, $P>0.05$)。冰藏花鲈鱼肉蛋白质的降解可能与巯基氧化成二硫键有关,受蛋白质羰基化的影响较小。贮藏前期总巯基含量上升可能与非蛋白巯基含量增加有关,贮藏后期巯基含量降低则是由于脂肪氧化产生的醛类等物质促进了巯基团氧化成二硫键,或进一步氧化成磺酸类产物^[22]。此外,蛋白质变性后的聚集也会对巯基起到遮蔽作用而导致巯基含量下降。

电泳图谱中 MHC 与 Actin 两条蛋白质条带并未随贮藏时间的延长而出现降解趋势,可能是由于这些蛋白质含量较高,难以通过电泳图

谱观察到其降解情况。同时, 16 d 的电泳图谱中 90 ku 的蛋白条带 I 几乎完全消失, 该蛋白可能被内源性蛋白酶完全降解。而 30 ku 附近的条带 III 可能是肌钙蛋白 T 的降解产物^[30]。肌钙蛋白 T 是蛋白质组学差异蛋白分析中常见的结构蛋白之一, 参与肌球蛋白结合的横纹肌收缩。贮藏后期肌钙蛋白 T 可能出现磷酸化修饰, 改变了内源蛋白酶活性^[31], 促进了肌钙蛋白降解。

肌原纤维蛋白在 16 d 时出现明显降解, 同时蛋白含量显著降低 ($P<0.05$), 该结果与 TVB-N 值和蛋白含量间呈显著负相关 ($r=-0.738$, $P<0.01$) 一致。鱼肉低温贮藏过程中肌原纤维蛋白的三级结构易被破坏, 疏水性残基交联形成不溶性聚集体, 造成蛋白质溶解度降低^[32]。此外, 肌原纤维蛋白含量与羰基含量呈显著负相关 ($r=-0.820$, $P<0.01$), 活性氧可造成氨基酸侧链和蛋白质主链的氧化, 导致蛋白质断裂或蛋白质交联聚集, 这些修饰均会降低蛋白质溶解度, 不利于鱼肉的进一步加工利用^[23]。

结果表明, 除 pH 值外, 花鲈鱼片新鲜度指标均与贮藏时间存在较好的相关性, 可用于表征花鲈鱼片品质变化与冰藏时间的关系。贮藏后期微生物的大量繁殖, 造成脂质氧化与蛋白质氧化间的相互作用, 这可能是品质劣变的主要原因。研究发现冰藏花鲈鱼片的新鲜度与蛋白质降解、氧化及脂肪氧化间存在良好相关性, 今后可通过代谢组学及蛋白质组学进一步鉴定差异特征代谢物及氧化蛋白质, 也可结合质谱及生物信息学对电泳图谱中出现的新条带做进一步分析, 对贮藏期间鱼肉肌原纤维蛋白的降解及氧化机理进行深入探究。此外, 由感官评分及菌落总数指标可知, 花鲈鱼片冰藏至 16 d 时已超过可接受范围, 而此时 TVB-N 值仍在可食用的限度内。目前, 传统的品质检测方法虽然严谨科学, 但在水产品检测方面存在明显滞后性, 且单一指标不能成为特定鱼类样品新鲜度的可靠指标, 因此, 采用电子鼻^[33]、高光谱成像^[34]和核磁共振^[35]等新技术, 结合不同建模方法可用于评价与预测不同水产品的货架期。

参考文献 (References):

- [1] 张海燕, 吴燕燕, 杨少玲, 等. 聚赖氨酸与魔芋葡甘聚糖复配对海鲈鱼片的保鲜效果[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(24): 202-208.
- [2] 魏涯, 黄卉, 李来好, 等. 宰前预冷处理对大口黑鲈冰藏品质的影响[J]. 南方水产科学, 2019, 15(6): 81-87.
Wei Y, Huang H, Li L H, et al. Effect of precooling before slaughter on quality of *Micropterus salmoides* during ice storage[J]. *South China Fisheries Science*, 2019, 15(6): 81-87(in Chinese).
- [3] Cai L Y, Cao A L, Bai F L, et al. Effect of ϵ -polylysine in combination with alginate coating treatment on physicochemical and microbial characteristics of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) during refrigerated storage[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 62(2): 1053-1059.
- [4] 蓝蔚青, 张皖君, 吴启月, 等. 流化冰预冷处理对鲈鱼贮藏期间品质变化的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(11): 247-254.
Lan W Q, Zhang W J, Wu Q Y, et al. Effect of precooling treatment with slurry ice on the quality change of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) during circulation[J]. *Food Science*, 2018, 39(11): 247-254(in Chinese).
- [5] Cai L Y, Wu X S, Li X X, et al. Effects of different freezing treatments on physicochemical responses and microbial characteristics of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) fillets during refrigerated storage[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 59(1): 122-129.
- [6] 周倩倩, 谢晶. 不同温度贮藏过程中海鲈鱼品质变化和货架期预测模型的建立[J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(3): 457-466.
Zhou Q Q, Xie J. Changes of quality characteristics and establishment of shelf-life predictor model for sea bass during storage at different temperatures[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(3): 457-466(in Chinese).
- [7] 段伟文, 全沁果, 高静, 等. 低压静电场结合气调包装对凡纳滨对虾冰温贮藏期品质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(13): 252-259.
Duan W W, Quan Q G, Gao J, et al. Effect of low-voltage electrostatic field combined with modified atmosphere packaging on the quality of *Litopenaeus van-*

- namei* during controlled freezing-point storage[J]. *Food Science*, 2019, 40(13): 252-259(in Chinese).
- [8] 黄卉, 郑陆红, 李来好, 等. 不同预冷温度对鲈鱼冰藏期间质构和色差的影响[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(24): 302-308.
- Huang H, Zheng L H, Li L H, *et al.* Effects of different precooling temperature on texture and color of *Micropoterus salmoides* during ice storage[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(24): 302-308(in Chinese).
- [9] Chaijan M, Panpipat W, Nisoa M. Chemical deterioration and discoloration of semi-dried tilapia processed by sun drying and microwave drying[J]. *Drying Technology*, 2017, 35(5): 642-649.
- [10] 李莎, 李来好, 杨贤庆, 等. 罗非鱼片在冷藏过程中的品质变化研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(20): 444-447.
- Li S, Li L H, Yang X Q, *et al.* Quality change of tilapia fillets during chilling storage[J]. *Food Science*, 2010, 31(20): 444-447(in Chinese).
- [11] Hashimoto K, Watabe S, Kono M, *et al.* Muscle protein composition of sardine and mackerel[J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1979, 45(11): 1435-1441.
- [12] 袁悦, 赵永强, 杨贤庆, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对冷冻罗非鱼鱼糜抗冻作用机制[J]. *食品科学*, 2019, 40(24): 79-85.
- Yuan Y, Zhao Y Q, Yang X Q, *et al.* Cryoprotective mechanism of epigallocatechin gallate on frozen Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) surimi[J]. *Food Science*, 2019, 40(24): 79-85(in Chinese).
- [13] Colgrave M L. Proteomics in food science: from farm to fork[M]. London: Elsevier Academic Press, 2017: 163-175.
- [14] 余小亮. 复合生物保鲜剂保鲜机理及对鲈鱼冷藏过程中品质变化的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- Yu X L. Preservation mechanism of compound biological preservatives and the changes in quality of perch during chilled storage[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [15] Yu D W, Jiang Q X, Xu Y S, *et al.* The shelf life extension of refrigerated grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets by chitosan coating combined with glycerol monolaurate[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 101: 448-454.
- [16] Li T T, Hu W Z, Li J R, *et al.* Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Food Control*, 2012, 25(1): 101-106.
- [17] Giménez B, Roncalés P, Beltrán J A. Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, 82(10): 1154-1159.
- [18] 鞠健, 胡佳慧, 乔宇, 等. 茶多酚结合真空包装对微冻鲈鱼片品质的影响[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(1): 104-110.
- Ju J, Hu J H, Qiao Y, *et al.* Effects of tea polyphenols combined with vacuum packaging on the quality of micro-freezing weever fillets[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2018, 34(1): 104-110(in Chinese).
- [19] 李娜, 赵永强, 李来好, 等. 冰藏过程中罗非鱼鱼片肌肉蛋白质变化[J]. *南方水产科学*, 2016, 12(2): 88-94.
- Li N, Zhao Y Q, Li L H, *et al.* Change of muscle proteins in Nile tilapia fillets during iced storage[J]. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(2): 88-94(in Chinese).
- [20] Sun X Y, Guo X B, Ji M Y, *et al.* Preservative effects of fish gelatin coating enriched with CUR/ β CD emulsion on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets during storage at 4 °C[J]. *Food Chemistry*, 2019, 272: 643-652.
- [21] Benjakul S, Seymour T A, Morrissey M T, *et al.* Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 62(4): 729-733.
- [22] 李学鹏, 周凯, 周明言, 等. 自由基氧化对大黄鱼肌原纤维蛋白交联和聚集的影响[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(4): 13-21.
- Li X P, Zhou K, Zhou Y M, *et al.* Effects of radical oxidation on the cross-linking pattern of myofibrillar protein in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(4): 13-21(in Chinese).
- [23] He Y F, Huang H, Li L H, *et al.* The effects of modified atmosphere packaging and enzyme inhibitors on protein oxidation of tilapia muscle during iced storage[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 87: 186-193.
- [24] 鞠健, 乔宇, 李冬生, 等. 茶多酚对冷藏鲈鱼鲜度变化及肌原纤维蛋白氧化的影响[J]. *食品工业科技*, 2018, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 39(2): 290-294.
- Ju J, Qiao Y, Li D S, *et al.* Effect of tea polyphenols on the freshness and the oxidation of myofibrillar protein of weever during cold storage[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(2): 290-294(in Chinese).
- [25] Ge L H, Xu Y S, Xia W S, *et al.* Differential role of endogenous cathepsin and microorganism in texture softening of ice-stored grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(9): 3233-3239.
- [26] He Y F, Huang H, Li L H, *et al.* Label-free proteomics of tilapia fillets and their relationship with meat texture during post-mortem storage[J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11(11): 3023-3033.
- [27] Ge L H, Xu Y S, Xia W S. The function of endogenous cathepsin in quality deterioration of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets stored in chilling conditions[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015, 50(3): 797-803.
- [28] 张建友, 赵瑜亮, 丁玉庭, 等. 脂质和蛋白质氧化与肉制品风味特征相关性研究进展[J]. *核农学报*, 2018, 32(7): 1417-1424.
- Zhang J Y, Zhao Y L, Ding Y T, *et al.* Relationships of lipid oxidation and protein oxidation with flavor characteristics of meat products[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(7): 1417-1424(in Chinese).
- [29] 朱小静. 鲈鱼调理食品加工关键技术研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- Zhu X J. Study on processing key technology prepared food derived from bass[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [30] Li X P, Chen Y, Cai L Y, *et al.* Freshness assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) by quality index method (QIM), biochemical, and proteomic methods[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 78: 172-180.
- [31] 李铮, 李欣, 杜曼婷, 等. 肌原纤维蛋白磷酸化对其被 μ -钙蛋白酶降解的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(15): 1-6.
- Li Z, Li X, Du M T, *et al.* Effect of phosphorylation on the degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain[J]. *Food Science*, 2017, 38(15): 1-6(in Chinese).
- [32] 张红杰, 赵永强, 李来好, 等. 臭氧减菌化处理罗非鱼片冰温贮藏过程中蛋白质生化特性的变化[J]. *水产学报*, 2015, 39(10): 1569-1576.
- Zhang H J, Zhao Y Q, Li L H, *et al.* Changes in biochemical properties of muscle protein from Nile tilapia fillets sterilized by ozone treatment during iced storage[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(10): 1569-1576(in Chinese).
- [33] 陈东杰, 姜沛宏, 张长峰, 等. 基于电子鼻与统计学方法的花鲈新鲜度品质预测[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(17): 235-239.
- Chen D J, Jiang P H, Zhang C F, *et al.* Freshness quality prediction of *Latelabrax japonicas* based on electronic nose and statistic analysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(17): 235-239(in Chinese).
- [34] 陈瑜楠. 冷藏腐败过程鱼肉蛋白质和脂肪变化的高光谱成像监控方法研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- Chen Y N. Monitoring the degradation of protein and fat in fish during cold storage using hyperspectral imaging technique[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017 (in Chinese).
- [35] Shumilina E, Ciampa A, Capozzi F, *et al.* NMR approach for monitoring post-mortem changes in Atlantic salmon fillets stored at 0 and 4 °C[J]. *Food Chemistry*, 2015, 184: 12-22.

Correlation between changes in freshness and protein biochemical properties of *Lateolabrax japonicus* during iced storage

XIANG Yue^{1,2}, SUN Chengfeng², LI Laihao^{1,3}, YANG Xianqing^{1,3}, WU Yanyan^{1,3},
CEN Jianwei^{1,3}, WEI Ya^{1,3}, LI Rui^{1,2}, ZHAO Yongqiang^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Life Science, Yantai University, Yantai 264005, China;

3. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Sea bass (*Lateolabrax japonicus*) is an economically important marine species widely cultured in Asia. Due to the high content of water and protein in fish, it is susceptible to the influence of microorganisms, fat oxidation and endogenous enzymes during circulation, resulting in quality deterioration. Freezing was a common storage method, but the increase of ice crystals can easily cause quality loss such as low water holding capacity, protein denaturation, and microstructure damage. Iced storage, which can effectively inhibit the growth of microorganisms, has gradually become one of the primary methods for prolonging the shelf life of *L. japonicus*. In recent years, there have been many studies on quality change in fish fillets during frozen storage, while there were few studies on the correlation between changes in freshness and protein biochemical properties of *L. japonicus*. Therefore, the quality change mechanism of *L. japonicus* during iced storage needs to be further explored. In this study, the effects of storage time on the freshness and protein biochemical properties of *L. japonicus* fillets during iced storage were investigated. The value of sensory characteristics, pH, texture, color, thiobarbituric acid (TBA), total volatile based nitrogen (TVB-N), total viable count (TVC) and protein content, SDS-PAGE, sulfhydryl and carbonyl contents of *L. japonicus* fillets were measured periodically to analyze changes of *L. japonicus* fillets during iced storage. And correlation analysis between the main freshness indicators and biochemical characteristics of myofibrillar protein were conducted. During the storage, the brightness of *L. japonicus* fillets values decreased from 57.92 ± 0.66 to 46.62 ± 1.54 , the redness values decreased from $-(4.34 \pm 0.39)$ to $-(5.21 \pm 0.08)$, the hardness values decreased (174.92 ± 16.80 to 122.25 ± 15.73) significantly, the pH increased in the early stage and then decreased. Moreover, the value of TBA and TVB-N value increased from (0.35 ± 0.01) mg/kg and (9.41 ± 1.03) mg/100 g to (0.97 ± 0.04) mg/kg and (33.18 ± 0.83) mg/100 g, respectively. After 16 d of storage, the TVC was increased to (6.35 ± 0.41) lg (CFU/g), which exceeded the secondary freshness standard, and the sensory score was unacceptable. The content of myofibrillar protein and sulfhydryl decreased from (104.21 ± 3.42) mg/g and (145.81 ± 1.02) mmol/g prot to (72.03 ± 5.25) mg/g and (137.28 ± 1.29) mmol/g prot, respectively. While the carbonyl content increased from (0.63 ± 0.03) nmol/mg to (1.45 ± 0.06) nmol/mg. The SDS-PAGE pattern of myofibrillar protein showed a new protein band around 30 ku, which may be the degradation product of troponin T. Troponin T, which was involved in the contraction of striated muscle bound by myosin, may be phosphorylated, improving the activity of endogenous protease and promoting the degradation of troponin in the late storage period. Moreover, the 90 ku protein band I almost completely disappeared, and the protein may be completely degraded by endogenous proteases. Correlation analysis showed that the correlation coefficients remain high between TBA value, TVC, protein content and carbonyl content. TBA were significantly negatively correlated with protein content, which may be related to the large amount of non-heme iron, which was released after the denaturation of myoglobin and hemoglobin, promoted fat oxidation. The content of myofibrillar protein was signi-

ificantly decreased on the 16th day, and the protein appeared significantly degraded in the pattern of SDS-PAGE. This result was consistent with the significant negative correlation between the TVB-N value and the protein content. The structure of myofibrillar protein of fish was easily destroyed during the long-time storage, and the hydrophobic residues were cross-linked to form insoluble aggregates, which reduced the solubility of the protein. In addition, the content of myofibrillar protein was significantly negatively correlated with the content of carbonyl groups. Active oxygen could cause the oxidation of amino acid side chains and protein backbones, leading to protein breaks or protein cross-linking aggregation. These modifications would also reduce the solubility of protein, which was not conducive for the freshness of fish. The results of this study showed that the *L. japonicus* fillets reached the inedible level after 16 days of iced storage. The freshness indexes of *L. japonicus* fillets all had a good correlation with storage time apart from pH value. These indexes can be used to characterize the freshness quality of *L. japonicus* fillets during iced storage. Mass reproductive microorganisms and the interaction between lipids oxidation and protein oxidation in the late ice storage may be the main reason for the quality deterioration. Studies also found that there was a good correlation between the freshness index, protein degradation, protein oxidation and fat oxidation of fillets during iced storage. In the future, metabolomics, proteomics and other omics can be used to further identify different characteristic biomarkers related to metabolites and oxidized proteins. Mass spectrometry and bioinformatics could also be used to further analyze the new bands appearing in the electrophoresis pattern, and the protein of fish muscle myofibril during storage can be further identified. In future, the molecular mechanism of proteins degradation and oxidation could be investigated in depth. And the mechanism of fish softening still needs further exploring, including the interaction relationship between activity of proteases and microorganisms. In addition, it can be seen that the seabass fillets exceeded the acceptable range when they were frozen to 16 days from the sensory score and some other indexes of freshness, while the TVB-N value was still within the edible limit. Accordingly, although the traditional quality detection methods are rigorous and scientific, there is a significant lag in the detection of aquatic products, and a single indicator could not be a reliable indicator for the freshness identifying of fish samples. Therefore, electronic noses and hyperspectral imaging, nuclear magnetic resonance and other new technologies, combined with different modeling methods, are promising ways to be used to evaluate and predict the shelf life of different aquatic products.

Key words: *Lateolabrax japonicus*; iced storage; freshness; protein; biochemical properties; correlation

Corresponding author: ZHAO Yongqiang. E-mail: zhaoyq@scsfri.ac.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0901006); China Agriculture Research System (CARS-47); Pearl River S & T Nova Program of Guangzhou (201710010167); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD73); Modern Agricultural Industry Technology System of Guangdong-Marine Fish (2019KJ143); Yangfan Innovative and Entrepreneurial Research Team Project (2015YT02H109)