



食品与发酵工业  
Food and Fermentation Industries  
ISSN 0253-990X, CN 11-1802/TS

## 《食品与发酵工业》网络首发论文

题目：罗非鱼冷藏期间内源蛋白酶和热休克蛋白 70 对肌原纤维解离的影响  
作者：范铭良，郝淑贤，李来好，陈胜军，岑剑伟，吴燕燕，魏涯，相欢，黄卉  
DOI：10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033884  
收稿日期：2022-10-10  
网络首发日期：2022-12-06  
引用格式：范铭良，郝淑贤，李来好，陈胜军，岑剑伟，吴燕燕，魏涯，相欢，黄卉. 罗非鱼冷藏期间内源蛋白酶和热休克蛋白 70 对肌原纤维解离的影响[J/OL]. 食品与发酵工业. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033884>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 罗非鱼冷藏期间内源蛋白酶和热休克蛋白 70 对肌原纤维解离的影响

范铭良<sup>1,2</sup>, 郝淑贤<sup>2</sup>, 李来好<sup>2</sup>, 陈胜军<sup>2,3</sup>, 岑剑伟<sup>2</sup>, 吴燕燕<sup>2</sup>, 魏涯<sup>2</sup>,  
相欢<sup>2</sup>, 黄卉<sup>2</sup>✉

1 (上海海洋大学 食品学院, 上海, 201306)

2 (中国水产科学研究院南海水产研究所 国家水产品加工技术研发中心  
农业农村部水产品加工重点实验室, 广东 广州, 510300)

3 (三亚热带水产研究院 海南省深远海渔业资源高效利用与加工重点实验室, 海南 三亚, 572018)

\*通信作者 黄卉副研究员为通信作者, E-mail: huanghui@aliyun.com

**摘要** 为研究罗非鱼冷藏期间内源蛋白酶和热休克蛋白 70 与肌原纤维解离的关系, 实验测定了罗非鱼肉在 4 ℃真空包装冷藏 48 h 内肌原纤维小片化指数、肌原纤维解离、内源蛋白酶活性和热休克蛋白 70 含量的变化, 并对其进行相关性分析。结果表明鱼肉冷藏期间肌原纤维小片化指数变化整体呈增加的趋势, 最终为初始值的 3.52 倍; 解离的肌球蛋白重链和肌动蛋白的含量呈升高的趋势, 最终分别较初始值提高了 70%和 65%; pH 变化为先减少后略微回升, 变化范围为 6.5~7.0; 组织蛋白酶 B、L 活性为持续增加, 组织蛋白酶 D 和钙激活蛋白酶活性呈先增加后减少的趋势, 且分别在 8、12 h 到达最大值; 热休克蛋白 70 含量为先增加后减少, 在 4 h 时达到最大值, 最终相比初始值下降了 22.27%; 肌原纤维小片化指数与组织蛋白酶 B、L 活性呈极显著正相关 ( $P \leq 0.01$ ), 与肌原纤维解离的肌球蛋白重链和肌动蛋白含量均呈极显著正相关 ( $P \leq 0.01$ ), 与热休克蛋白 70 含量呈显著负相关 ( $P \leq 0.05$ ); 热休克蛋白 70 含量与与组织蛋白酶 L 呈显著负相关 ( $P \leq 0.05$ )。组织蛋白酶 B、L 是影响肌原纤维完整性的关键蛋白酶, 热休克蛋白 70 能与肌原纤维粗丝和细丝结合稳定肌原纤维结构, 且组织蛋白酶 L 可能通过降解热休克蛋白 70 来影响肌原纤维粗丝和细丝的解离。

**关键词** 罗非鱼; 内源蛋白酶活性; 热休克蛋白 70; 肌原纤维小片化指数

DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033884

## Effect of endogenous proteases and heat shock protein 70 on myofibril dissociation during refrigeration in tilapia

FAN Mingliang<sup>1,2</sup>, HAO Shuxian<sup>2</sup>, LI Laihao<sup>2</sup>, CHEN Shengjun<sup>2,3</sup>, CEN Jianwei<sup>2</sup>, WU Yanyan<sup>2</sup>, WEI Ya<sup>2</sup>, XIANG Huan<sup>2</sup>, HUANG Hui<sup>2</sup>✉

1(College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

2(South China Sea Fisheries Research Institute, China Academy of Fisheries Science, National Aquatic Products Processing Technology R&D Centre, Key Laboratory of Aquatic Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China)

3(Key Laboratory of Efficient Utilization and Processing of Marine Fishery Resources of Hainan Province, Sanya Tropical Fisheries Research Institute, Sanya 572018, China)

**Abstract** In order to investigate the relationship between endogenous proteases and heat shock protein 70 and myofibrillar dissociation of tilapia during the refrigeration, experiments were performed to determine the changes in myofibril

收稿日期: 2022-10-10

基金项目: 国家特色淡水鱼产业技术体系 (CARS-46); “扬帆计划”引进创新创业团队专项资助项目 (2015YT02H109); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金 (2020TD69); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2021SD06)

作者简介: 第一作者: 硕士研究生

网络首发时间: 2022-12-06 15:22:35 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1802.TS.20221206.1252.005.html>

fragmentation index, myofibrillar dissociation, endogenous protease activity, and heat shock protein 70 content of tilapia fish meat during vacuum-packed refrigeration at 4°C for 48 h, and the correlation analysis was performed. Results showed that an overall increasing trend in the change of myofibril fragmentation index during the refrigeration of fish, ending at 3.52 times the initial value. The dissociated myosin heavy chain and actin content showed an increasing trend, eventually increasing by 70% and 65% respectively from the initial values. The pH changes were a decrease followed by a slight recovery with a range of 6.5 to 7.0. The activities of cathepsin B and L showed a constant increase, and the activities of cathepsin D and calpain showed a trend of increasing and then decreasing, and reached the maximum at 8 and 12 h, respectively. Heat shock protein 70 (HSP 70) content showed an increase followed by a decrease, reaching a maximum at 4 h and finally decreasing by 22.27% compared to the initial value. Myofibril fragmentation index showed a highly significant positive correlation with cathepsin B and L activities ( $P \leq 0.01$ ), and with myofibrillar dissociation of both myosin heavy chain and actin content were highly significantly positively correlated ( $P \leq 0.01$ ) and negatively correlated with HSP 70 content ( $P \leq 0.05$ ). HSP 70 can stabilize myofibril structure by binding to thick and thin filaments of myofibrils. HSP 70 content was significantly negatively correlated with cathepsin L ( $P \leq 0.05$ ). cathepsin B and L are essential proteases affecting the integrity of myofibrillar, and cathepsin L may affect the dissociation of thick and thin filaments of myogenic fibers by degrading HSP 70.

**Key words** tilapia; endogenous protease activity; heat shock protein 70; myofibril fragmentation index

罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 含有丰富的氨基酸, 是一种高蛋白的经济鱼类<sup>[1]</sup>, 中国是罗非鱼生产大国, 2020 年罗非鱼养殖产量达 165.54 万 t, 占淡水鱼总产量的 6.4%<sup>[2]</sup>, 具有极好的发展前景。但罗非鱼在储运过程中易出现品质劣化, 其中质地变化是当前研究热点, 因此, 提高罗非鱼鱼肉在贮藏储运期间的质地品质具有重要意义。

鱼肉质劣化主要归因于肌肉组织解体。鱼肉肌原纤维中含量最多的 2 种蛋白是肌动蛋白和肌球蛋白, 它们分别组装成肌原纤维的粗丝和细丝<sup>[3]</sup>。肌原纤维粗丝和细丝的解离会破坏肌原纤维的完整性, 研究发现肌原纤维粗丝和细丝的解离与牛肉嫩度具有相关性<sup>[4-5]</sup>。WANG 等<sup>[6]</sup>发现草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 死后 12 h 内肌原纤维粗丝的解离与鱼肉质劣化相关。

研究表明内源蛋白酶与肌原纤维解离具有紧密联系, 但国内外对于内源蛋白酶与肌原纤维降解的研究较多, 其中发挥主要作用的是组织蛋白酶 B、L、D 和钙激活蛋白酶<sup>[7]</sup>。然而, 内源蛋白酶对肌原纤维蛋白的降解并不能完全解释鱼体死后的复杂生化变化, 因此有必要考虑其他系统的参与。有研究表明肌原纤维粗丝和细丝的解离与热休克蛋白有紧密的关系。鱼死后肌肉营养和氧气大量损失, 应激发状态下产生热休克蛋白 (heat shock proteins, HSP) 来维持内环境的稳定, 经常被用于肉类质量品质的研究<sup>[8]</sup>。葛黎红<sup>[7]</sup>发现热休克蛋白 90 和 UNC 45 含量的减少会导致草鱼肌原纤维粗丝的解离, 且组织蛋白酶 B、L、D 和钙激活蛋白酶对这 2 种热休克蛋白具有降解作用。张喜才<sup>[9]</sup>通过蛋白质组学发现 HSP 70 与石斑鱼 (*Epinephelus spp*) 的胶黏性有关, 并通过体外模拟实验发现组织蛋白酶 L 能显著降解 HSP 70。何燕富<sup>[10]</sup>采用蛋白质组学发现 HSP 70 与罗非鱼鱼肉软化相关。

目前有关内源蛋白酶、HSP 70 与罗非鱼肌原纤维解离关系的报道较少, 本研究以尼罗罗非鱼为研究对象, 分析罗非鱼鱼肉冷藏期间内源蛋白酶、HSP 70、肌原纤维小片化指数 (myofibril fragmentation index, MFI) 以及解离的肌球蛋白重链 (dissociated myofibrillar heavy chain, dMHC) 和肌动蛋白 (dissociated actin, dAC) 含量变化和相关性, 为罗非鱼的贮藏期间质构变化机理研究提供理论参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜罗非鱼 [(800±50) g], 广州某超市; NuPAGE™Bis-Tris 预制胶 (12%)、NuPAGE™MOPS SDS 电泳缓冲液 (20×), 英潍捷基贸易有限公司; BeyoColor™ 彩色预染蛋白、5×SDS-PAGE 上样缓冲液、考马斯亮蓝染色液, 上海碧云天生物技术有限公司; Z-Arg-Arg-AMC、Z-Phe-Arg-AMC、N-Suc-Leu-Tyr-AMC, Sigma 公司; 鱼热休克蛋白-70 (HSP-70) 酶联免疫吸附测定试剂盒, 上海茁彩生物科技有限公司; 1-乙基-3-(3-三甲氨基丙基)碳二甲胺盐酸盐, 广州都宏生物科技有限公司。

## 1.2 仪器与设备

IKA-T25 组织匀浆机, 德国 IKA 公司; HH-4 快速恒温数显水浴箱, 常州澳华仪器公司; Sunrise-basic 吸光酶标仪, 德国 TECAN 公司; CT3 质构仪, 美国 Brookfield 公司; 3K30 台式高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; Mini Gel Tank 蛋白电泳槽, 美国 Invitrogen 公司; 基础电泳仪, 美国 BIO-RAD 公司; Image ScannerIII 扫描仪, 美国 GE 公司; Cary Eclipse 荧光分光光度计, 美国 VARIAN 公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 样品处理

将鲜活罗非鱼击晕宰杀, 去鱼头、鱼皮和内脏, 取背部肌肉切成 2 cm×2 cm×1 cm 块状, 真空包装, 于 4 °C 条件冷藏。

### 1.3.2 pH 的测定

参考 GB5009.237—2016《食品安全国家标准食品 pH 值的测定》的方法进行测定。

### 1.3.3 MFI 的测定

参考张诗泉<sup>[11]</sup>的方法稍作修改, 取 2 g 鱼肉, 加入 25 mmol/L 缓冲液 A (100 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) 30 mL, 在冰浴均质 1 min, 期间停歇 30 s, 用纱布过滤, 滤液在 4 °C, 10 000 r/min 条件下离心 15 min, 保留沉淀。将沉淀溶于 20 mL 磷酸盐缓冲液, 再以 10 000 r/min 转速离心 15 min, 所得沉淀用上述缓冲液复溶, 用试剂盒测定蛋白浓度, 并稀释至蛋白浓度为 0.5 mg/mL, 在 540 nm 处测定其吸光值, 吸光值乘以 200 即为肌原纤维小片化指数。

### 1.3.4 肌原纤维蛋白的提取

参考葛黎红<sup>[8]</sup>的方法提取肌原纤维蛋白。称取 2 g 碎鱼肉, 用 10 mL 的缓冲液 B (5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 浸泡 20 min 后, 均质后用纱布过滤; 滤渣加入 10 mL 的缓冲液 C (2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 浸泡 20 min; 过滤后滤渣再用缓冲液 D (0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 浸泡 20 min; 最后将滤渣用 10 mL 的缓冲液 C 均质 30 s, 停歇 20 s 降温后再均质 30 s。混合物在 4 °C、11 000 r/min 下离心 15 min。沉淀复溶于缓冲液 C 中即为罗非鱼肌原纤维蛋白。

### 1.3.5 肌原纤维蛋白与 EDC 交联反应

肌原纤维蛋白与 1-乙基-3-(3-三甲氨基丙基)碳二甲胺盐酸盐 (EDC) 交联反应参考 MIDDE 等<sup>[12]</sup>的方法。将罗非鱼肌原纤维蛋白样品稀释为蛋白含量 4 mg/mL, 取 1 mL 加入 2 mmol/L 的 EDC 溶液 10 μL, 室温反应 20 min 后, 加入 1 mL 终止液 (1% SDS, 100 mmol/L DTT, 60 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3) 终止交联反应。将反应液置于沸水中加热 5 min, 离心 15 min (4 °C, 10 000 r/min)。取上清液与上样缓冲液混合, 体积比为 3:2。混合液于沸水中加热 5 min, 得到电泳样品。电泳电压设置为 100 V, 染色 1 h, 脱色 1 h, 染色剂为考马斯亮蓝 R250, 脱色液由 10% 醋酸, 40% 乙醇和 50% 水组成。

### 1.3.6 HSP 70 含量的测定

使用鱼热休克蛋白-70 (HSP-70) 酶联免疫吸附测定试剂盒测定。

### 1.3.7 内源蛋白酶的提取与酶活的测定

#### 1.3.7.1 钙激活蛋白酶和组织蛋白酶 B、L 的提取及活性测定

钙激活蛋白酶和组织蛋白酶 B、L 的提取及活性测定参考 GE 等<sup>[13]</sup>的方法。

取 10 g 碎鱼肉加入 20 mmol/L Tris 溶液 (pH 7.5) 20 mL, 均质 20 s, 降温后均质, 在 4 °C 条件下搅拌 30 min, 4 °C、16 000 r/min 下离心 20 min, 上清液即为粗酶提取液。

取粗酶 0.5 mL, 与 0.25 mL 缓冲液混合且在 37 °C 恒温箱中预热 10 min, 加入对应的反应底物, 在 37 °C 条件下反应 0.5 h 后加入 2.5 mL 终止液 (50 mmol/L Tris-HCl, 1% SDS, pH 7.0)。采用荧光分光光度计测定 7-氨基-4-甲基香豆素 (AMC) 的释放量。测定条件为激发波长 ( $\lambda_{ex}$ ) 340 nm、发射波长 ( $\lambda_{em}$ ) 440 nm。酶活力单位定义为 1 min 内释放出 1 μmol/L AMC 所需的酶量。

(组织蛋白酶 B 缓冲液: 352 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 48 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, pH

6.0, 使用前配制为含 8 mmol/L *L*-半胱氨酸溶液; 组织蛋白酶 L 缓冲液:340 mmol/L NaAc, 60 mmol/L HAc, 4 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, pH 5.5, 使用前配制成含 8 mmol/L DTT 溶液; 钙激活蛋白酶缓冲液: 150 mmol/L Tris-HCl, 7.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 6.0)

#### 1.3.7.2 组织蛋白酶 D 的提取与活性测定<sup>[13]</sup>:

称取 15 g 碎鱼肉, 加入 10 倍体积的预冷丙酮, 均质后用布氏漏斗过滤, 滤液风干, 得到干品, 加入 20 mL 的 KCl 溶液 (2%), 混匀后离心 15 min (4 °C, 10 000 r/min), 所得上清液即为组织蛋白酶 D 粗酶液。取 0.5 mL 的粗酶液, 加入 0.5 mL 的酸变性血红蛋白 (5%) 以及 1.5 mL 的麦基尔文缓冲液 (pH 3.0), 在 37 °C 条件下放置 1 h, 加入 2.5 mL TCA (5%) 终止反应, 离心 15 min (25 °C, 7 000 r/min), 通过参考 Lowry 法测定上清液中的多肽, 每个酶活力单位定义为 1 min 之内释放 1 μmol/L 酪氨酸 (Tyr) 所需要的酶量。

#### 1.4 数据处理

采用 SPSS 23 和 Origin 8.5 软件处理实验数据、相关性分析和显著性分析, 显著性水平设为 0.05, 采用 Image j 对电泳图谱中条带灰度进行相对定量分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 贮藏期间罗非鱼鱼肉 MFI 的变化

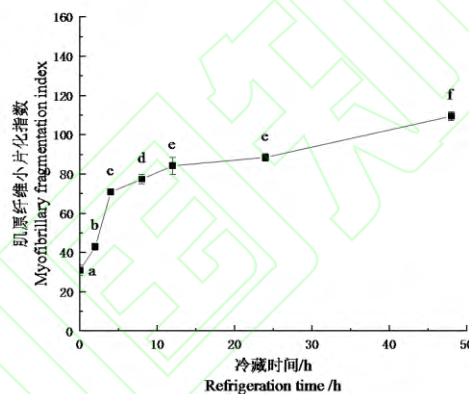


图 1 冷藏过程中罗非鱼鱼肉肌原纤维小片化指数变化  
Fig.1 Changes of myofibril fragmentation index of tilapia during refrigeration

注: 不同字母间具显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (下同)

MFI 是反应肌原纤维完整性的一个指标, MFI 越大说明肌原纤维结构遭受破坏的程度越大<sup>[14]</sup>。动物在被宰杀后, 组织蛋白酶和钙激活蛋白酶被激活, 肌间蛋白、连接蛋白发生降解, 造成 Z 线结构的消失, 使得肌原纤维碎片化<sup>[15]</sup>。罗非鱼冷藏过程中 MFI 变化如图 1 所示, 罗非鱼的 MFI 变化整体呈增加的趋势, 在 0~12 h 内增加显著 ( $P < 0.05$ ), 在 12~24 h 内变化不显著 ( $P > 0.05$ ), 在 48 h 时 MFI 为初始值的 3.52 倍。对冷藏时间和 MFI 进行相关性分析, 发现 MFI 与冷藏时间呈极显著正相关 ( $P \leq 0.01$ ,  $r = 0.958$ ), 说明在贮藏过程中罗非鱼肌原纤维完整性被破坏。AYALA 等<sup>[16]</sup>使用扫描电镜对冷藏的海鲷鱼 (*Sparus aurata* L.) 进行微观研究, 发现贮藏时间越长, 肌原纤维碎片化现象越严重, 这与本实验结论一致。

### 2.2 贮藏期间肌原纤维粗丝和细丝的解离变化

肌原纤维粗丝和细丝的解离是导致鱼肉质构品质劣化的原因之一。为研究罗非鱼冷藏期间肌原纤维蛋白粗丝和细丝的结构变化, 采取零臂长交联剂 EDC 处理罗非鱼鱼肉肌原纤维蛋白, 通过 SDS-PAGE 图谱探究鱼肉解离的蛋白变化。EDC 通过共价作用将蛋白分子的羧基和伯胺交联, 主要连接氨基酸残基上的羧基和伯胺<sup>[17]</sup>。图 2 和表 1 分别为罗非鱼肌原纤维蛋白在 EDC 交联后的 SDS-PAGE 图

谱及图谱中 dMHC 和 dAC 的相对灰度变化。由图知, 罗非鱼冷藏期间 dMHC 和 dAC 的含量显示升高的趋势, 在 0~2 h 内 dAC 含量无显著变化 ( $P>0.05$ ), 表明这段时间内肌原纤维蛋白粗丝和细丝形成肌动球蛋白, 此时鱼肉处于尸僵状态。在 2~8 h 内 dMHC 和 dAC 含量无显著性变化 ( $P>0.05$ ), 这意味着解僵过程的开始, 即肌原纤维粗丝和细丝的分离。在 8~48 h 内 dMHC 和 dAC 含量均为显著性增加 ( $P<0.05$ ), 解离出的肌动蛋白和肌球蛋白重链的灰度随着贮藏时间的延长而不断增加。WANG 等<sup>[6]</sup>研究发现草鱼宰后 12 h 内肌原纤维粗丝解离程度随贮藏时间的延长而增加。葛黎红<sup>[8]</sup>研究发现草鱼在冷藏条件下贮藏 48 h 内, dMHC 和 dAC 含量随贮藏时间的延长而增加。dMHC 和 dAC 含量增加是鱼肌肉品质劣化的重要指标之一, 这种劣化与肌球蛋白解离程度密切相关。OKITANI 等<sup>[18]</sup>还发现鱼肉中积聚的 AMP 和 IMP 可以分离肌动球蛋白。因此, 对这些肌肉中导致肌原纤维解离的因素进行研究, 针对这些因素制定能维持鱼类死后肌肉中肌原纤维完整性的策略, 以改善肉质。

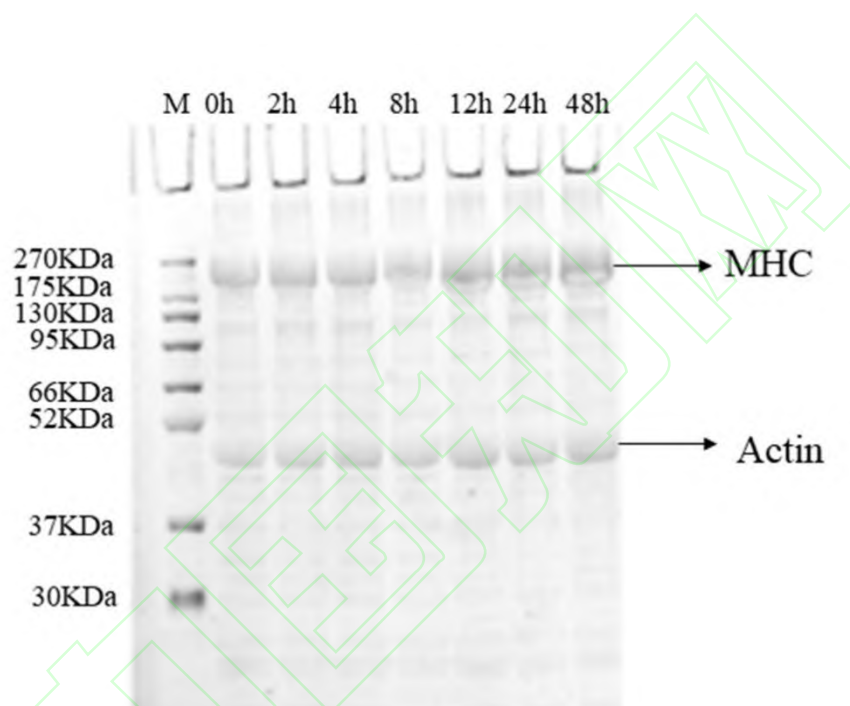


图2 冷藏过程中罗非鱼肌原纤维蛋白与 EDC 交联后的 SDS-PAGE 图谱  
Fig.2 SDS-PAGE of tilapia myofibrillar crosslinked with EDC during refrigeration

表1 冷藏罗非鱼肌肉肌原纤维蛋白与EDC交联后的SDS-PAGE图谱中条带灰度变化

Table 1 The gray scale of the bands in the SDS-PAGE profile of the myofibrillar protein of chilled tilapia fish flesh after cross-linking with EDC

冷藏时间/h	dMHC	dAc
0	1.00 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>
2	1.19±0.04 <sup>b</sup>	1.00±0.06 <sup>a</sup>
4	1.18±0.25 <sup>b</sup>	1.12±0.16 <sup>abc</sup>
8	1.14±0.09 <sup>ab</sup>	1.10±0.01 <sup>ab</sup>
12	1.51±0.09 <sup>c</sup>	1.24±0.24 <sup>c</sup>
24	1.49±0.05 <sup>c</sup>	1.20±0.34 <sup>bc</sup>
48	1.70±0.22 <sup>d</sup>	1.65±0.18 <sup>d</sup>

注: MHC: 肌球蛋白重链; Actin: 肌动蛋白。数据表示为平均值±标准偏差, 同一列中不同的字母表明组内存在显著性差异 ( $P<0.05$ )

### 2.3 罗非鱼鱼肉 pH 在贮藏期间的变化

鱼肉贮藏过程中 pH 变化反应肌肉组织的生理环境变化, 生理环境的改变会影响肌肉品质<sup>[19]</sup>。冷藏期间 pH 变化总体呈先下降后升高的趋势(图 3), 这与 FARIDC 等<sup>[20]</sup>研究结果一致。在 2~8 h 内鱼肉 pH 显著性下降 ( $P<0.05$ ), 这可能是鱼体内糖原分解生成的乳酸和 ATP 降解生成的磷酸所导致的, 在 24~48 h 内鱼肉 pH 略有回升, 可能是内源酶和微生物降解蛋白质生成的碱性胺类物质引起的。卢涵<sup>[21]</sup>发现 4℃ 冷藏的鳙鱼肌肉 pH 在 8 h 后 pH 呈回升趋势。本实验在 24 h 后 pH 呈上升趋势, 这可能是因为真空包装延缓了蛋白质的降解。

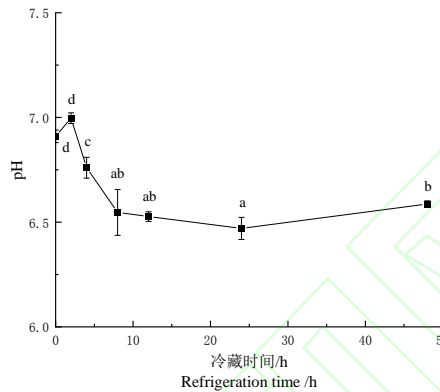


图3 冷藏过程中罗非鱼鱼肉 pH 变化  
Fig.3 pH changes of tilapia during refrigeration

### 2.4 罗非鱼鱼肉内源蛋白酶活性在贮藏期间变化

冷藏期间罗非鱼组织蛋白酶 B、L 活性变化如图 4 所示, 组织蛋白酶 B 活性在冷藏期间整体呈现不断上升的趋势, 在 24~48 h 期间其活性无显著性增加 ( $P>0.05$ ), 说明组织蛋白酶 B 活性在 24 h 后趋于平稳。组织蛋白酶 L 在整个贮藏期间内活性处于升高的趋势, 且在 12~48 h 呈显著性增加 ( $P<0.05$ ), 代表组织蛋白酶 L 随着贮藏期延长其活性仍有可能继续提高。冷藏期间罗非鱼组织蛋白酶 D 活性变化如图 5 所示, 组织蛋白酶 D 活性在 0~8 h 显著性增加 ( $P<0.05$ ), 在 8 h 到达最大值, 为初始值的 1.23 倍, 而后随着贮藏时间的延长其活性降低, 最终其活性与初始值相近。WANG 等<sup>[7]</sup>发现草鱼死后 12 h 内组织蛋白酶 B 活性呈升高趋势, 组织蛋白酶 D 活性先升高后降低, 且在 8 h 达到最大值。沈妮<sup>[22]</sup>研究了 4℃ 冷藏的带鱼在贮藏期间内组织蛋白酶 B、L 活性变化, 结果表明组织蛋白酶 B、L 活性在 0~3 d 内呈升高趋势。组织蛋白酶 B、L 的最适 pH 为 6.5~7.0, 而组织蛋白酶 D 的最适 pH 为 5.5 以下<sup>[19]</sup>, 本研究中鱼肉 pH 变化范围为 6.5~7.0, 因此, 在鱼肉软化过程中组织蛋白酶 B、L 可能比组织蛋白酶 D 贡献更大。

钙激活蛋白酶是一种存在于肌浆中的半胱氨酸蛋白酶<sup>[23]</sup>。冷藏期间罗非鱼钙激活蛋白酶活性变化如图 6 所示。钙激活蛋白酶活性整体呈先增加后降低的趋势, 在 0~12 h 内显著性增加 ( $P<0.05$ ), 12~48 h 内其活性显著性降低 ( $P<0.05$ ), 最终值与初始值相比降低了 25.4%。葛黎红<sup>[8]</sup>对草鱼贮藏期内钙激活蛋白酶活性变化进行研究, 发现在整个贮藏期间内钙激活蛋白酶活性呈先上升后下降的趋势, 且在 12 h 时其活性达到最大值, 这与该实验结果一致。钙激活蛋白酶活性增加的原因可能是内质网中积累的钙离子大量释放导致钙激活蛋白酶被激活, 其活性降低可能是由于其本身的自溶作用以及鱼肉中的钙蛋白酶抑素发挥作用<sup>[24]</sup>。从钙激活蛋白酶活性变化来看, 其在贮藏前 12 h 内发挥作用, 随着贮藏时间的延长, 对鱼肉软化的贡献降低。

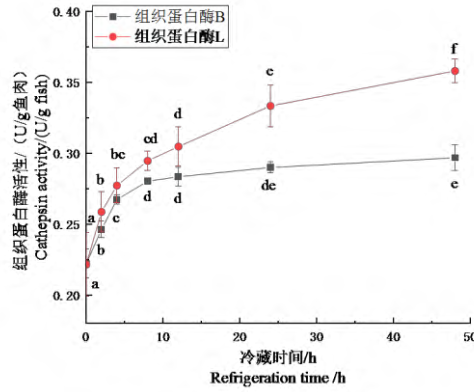


图 4 冷藏过程中罗非鱼鱼肉组织蛋白酶 B、L 活性变化  
Fig.4 Changes of cathepsin B、L activity of tilapia during refrigeration

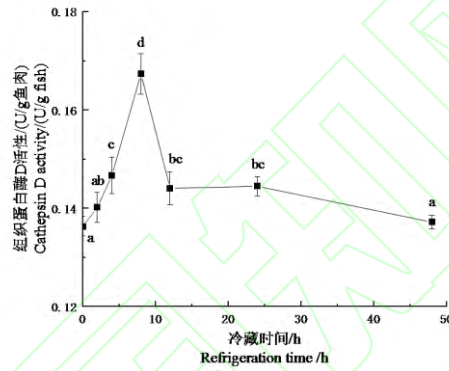


图 5 冷藏过程中罗非鱼鱼肉组织蛋白酶 D 活性变化  
Fig.5 Changes of cathepsin D activity of tilapia during refrigeration

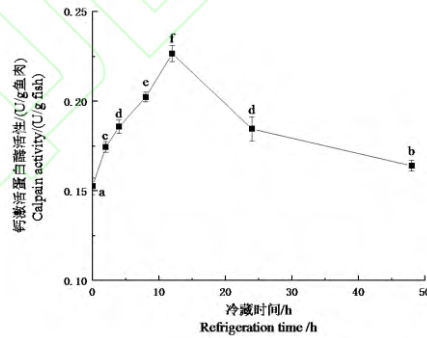


图 6 冷藏过程中罗非鱼鱼肉钙激活蛋白酶活性变化  
Fig.6 Changes of calpain activity of tilapia during refrigeration

### 2.5 贮藏过程中罗非鱼鱼肉 HSP70 含量变化

热休克蛋白是机体在应激条件下大量合成的分子伴侣蛋白，研究者发现热休克蛋白在肉类质构品质劣化过程中具有重要作用<sup>[24-25]</sup>。动物被宰杀后，肌细胞在应激条件下热休克蛋白被大量合成并与肌原纤维蛋白结合稳定其结构<sup>[26]</sup>。何燕富<sup>[10]</sup>通过蛋白质组学发现 HSP 70 含量与罗非鱼质构品质具有相关性，但并未对机理进行深入研究。宰杀后冷藏罗非鱼鱼肉中 HSP 70 含量变化如图 7 所示，HSP 70 含量呈先升高后下降的趋势，且在 4 h 时达到最大值，为初始值的 1.33 倍，在 4~48 h 内呈下降趋



势, 48 h 时相比初始值下降了 22.27%。细胞损伤的刺激导致 HSP 70 的合成, HSP 70 含量在短时间内剧烈增加。HSP 70 含量减少可能是由于内源蛋白酶的作用, 张喜才<sup>[9]</sup>通过体外模拟实验发现石斑鱼中组织蛋白酶 L 对 HSP 70 具有良好的降解效果, 其降解率达到 90%。

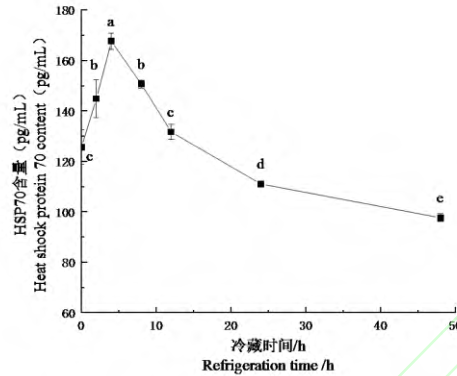


图7 冷藏过程中罗非鱼鱼肉中 HSP 70 含量变化  
Fig.7 Changes of HSP70 content in tilapia during refrigeration

## 2.6 MFI、内源蛋白酶活性、HSP70 含量、dMHC 和 dAC 含量相关性分析

罗非鱼鱼肉贮藏期间内 MFI 和 HSP 70 含量变化与组织蛋白酶 B、L、D、钙激活蛋白酶活性、dMHC 及 dAC 含量的相关性分析如表 2 所示。鱼肉 MFI 与组织蛋白酶 B、L 活性呈极显著正相关 ( $P \leq 0.01$ ), 与组织蛋白酶 D 和钙激活蛋白酶活性无显著相关 ( $P > 0.05$ ), 表明组织蛋白酶 B、L 是可能直接参与鱼肉质构劣化的组织蛋白酶, 这与葛黎红<sup>[8]</sup>的研究结果一致。可能的原因是组织蛋白酶 B、L 的最适 pH 值与贮藏期间鱼肉 pH 值范围相同, 使其能发挥最大作用, 且组织蛋白酶 B、L 能降解的肌原纤维蛋白种类多于组织蛋白酶 D 和钙激活蛋白酶。

鱼肉 MFI 与 dMHC 和 dAC 含量均呈极显著正相关 ( $P \leq 0.01$ ), 表明肌原纤维粗丝和细丝的解离导致鱼肉肌原纤维完整性破坏; MFI 与 HSP 70 含量呈显著负相关 ( $P \leq 0.05$ ), 且 HSP 70 含量与 dMHC 和 dAC 呈极显著负相关 ( $P \leq 0.01$ ), 表明在鱼体死后 HSP 70 可能与肌原纤维粗丝和细丝结合稳定其结构。HSP 70 含量与组织蛋白酶 B 和钙激活蛋白酶活性无显著性相关 ( $P > 0.05$ ), 与组织蛋白酶 D 活性呈显著正相关 ( $P \leq 0.05$ ), 与组织蛋白酶 L 呈显著负相关 ( $P \leq 0.05$ ), 表明组织蛋白酶 L 可能具有降解 HSP 70 的能力, 这与张喜才<sup>[9]</sup>的研究结果一致。

表2 罗非鱼冷藏期间MFI、组织蛋白酶B、L、D和钙激活蛋白酶活性、HSP70含量、dMHC和dAC含量的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of MFI, cathepsin B, L, D and calpain activities, HSP70 content, dMHC and dAC content in tilapia during refrigeration

	组织蛋白酶B活性	组织蛋白酶L活性	组织蛋白酶D活性	钙激活蛋白酶活性	dMHC	dAC	MFI
热休克蛋白 70 含量	-0.315	-0.503*	0.465*	0.322	-0.636**	-0.629**	-0.434*
MFI	0.938**	0.934**	0.173	0.348	0.825**	0.814**	1

## 3 结论

贮藏期间, 随着冷藏时间延长, 罗非鱼样品中反应质构变化的指标 MFI 品质下降, 组织蛋白酶 B、L 活性、dMHC 和 dAC 含量呈现升高的趋势, pH 呈下降的趋势, 组织蛋白酶 D、钙激活蛋白酶活性和 HSP 70 含量呈先升高后降低的趋势。通过相关性分析可知组织蛋白酶 B、L 可能是破坏肌原纤维完整性的两个关键作用酶; 鱼体死后 HSP 70 可能与肌原纤维粗丝和细丝结合稳定其结构, 组织蛋白酶 L 的介入可能导致 HSP 70 的降解, 造成鱼肉肌原纤维粗丝和细丝的解离。因此, 为了提高鱼片产品的质量, 可以采取抑制组织蛋白酶 B、L 活性, 维持 HSP 70 含量稳定来缓解鱼肉在贮藏期间质构劣化。

## 参考文献

- [1] 袁圆玥, 岑剑伟, 李来好, 等. 二氧化碳麻醉对罗非鱼生理及品质的影响[J]. 南方水产科学, 2022, 18(4): 147-155.  
YUAN Y Y, CENG J W, LI L H, et al. Effect of carbon dioxide anesthesia on physiology and quality of tilapia[J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(4): 147-155.
- [2] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.  
Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021.
- [3] 刘瑞, 李睿智, 王嵬, 等. 碱性蛋白酶降解鲢鱼肌原纤维蛋白的组学分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(3): 43-52.  
LIU R, LI R Z, WANG W, et al. Proteomics analysis of myofibrillar proteins of silver carp in degraded by alcalase[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(3): 43-52.
- [4] OKITANI A, ICHINOSE N, ITOH J, et al. Liberation of actin from actomyosin in meats heated to 65 °C[J]. Meat Science, 2009, 81(3): 446-450.
- [5] LANA A, LONGO V, DALMASSO A, et al. Omics integrating physical techniques: Aged Piedmontese meat analysis[J]. Food Chemistry, 2015, 172: 731-741.
- [6] WANG D, ZHANG M, DENG S, et al. Postmortem changes in actomyosin dissociation, myofibril fragmentation and endogenous enzyme activities of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) muscle[J]. Food Chemistry, 2016, 197: 340-344.
- [7] 葛黎红. 内源蛋白酶在低温保鲜草鱼质构劣化中的作用与控制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.  
GE L H. Study on correlation of endogenous proteases with texture deterioration of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during chilled storage and quality control[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [8] 赵妍, 罗欣, 毛衍伟, 等. 小热休克蛋白对牛肉嫩度影响机制的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(12): 294-301.  
ZHAO Y, LUO X, MAO Y W, et al. Research progress on the mechanism of the effect of small heat shock protein on the beef tenderness[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(12): 294-301.
- [9] 张喜才. 石斑鱼冷藏过程中品质评价、蛋白变化以及内源性蛋白酶作用机制研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.  
ZHANG X C. Study on quality evaluation, protein changes and mechanism of endogenous protease of grouper (*Epinephelus coioides*) during refrigerated storage[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [10] 何燕富. 三种内源性蛋白酶对罗非鱼贮藏品质的影响机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.  
HE Y F. The effects of three endogenous proteases on storage quality of tilapia and its mechanism[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018.
- [11] 张诗泉, 刘永峰, 葛鑫禹, 等. 鸭肉宰后成熟过程中食用品质、营养品质及嫩度变化研究[J/OL]. 食品与发酵工业, 2022. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032891.  
ZHANG S Q, LIU Y F, GE X Y, et al. Study on the changes of edible quality, nutritional quality and tenderness during post-slaughter maturation of duck meat[J/OL]. Food and Fermentation Industries, 2022. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032891.
- [12] MIDDE K, RICH R, MARANDOS P, et al. Comparison of orientation and rotational motion of skeletal muscle cross-bridges containing phosphorylated and dephosphorylated myosin regulatory light chain[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(10): 7 012-7 023.
- [13] 岑剑伟. 冰温气调结合高压静电场对罗非鱼片保鲜及其机理研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.  
CEN J W. Effect of high voltage electrostatic field combined with modified atmosphere packaging and controlled freezing-point storage on the quality of tilapia fillet and its mechanism research[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [14] 陈春梅, 周惠健, 沈银涵, 等. 煮制时间对鹅肉蛋白结构的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 6-11.  
CHEN C M, ZHOU H J, SHEN Y H, et al. Effect of cooking time on the protein structure of goose meat[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 6-11.
- [15] 杨媛媛, 韩云胜, 李敬, 等. 舍饲、放牧对滩羊股二头肌纤维特性及宰后成熟过程中蛋白降解的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(8): 2 797-2 808.  
YAN Y, HAN Y S, LI J, et al. Effects of concentrates and pasture feeding on muscle fiber characteristics of biceps femoris in Tan sheep and its protein degradation during postmortem aging[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(8): 2 797-2 808.
- [16] AYALA M D, ABDEL I, SANTAELLA M, et al. Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage[J]. LWT, 2010, 43(3): 465-475.
- [17] RIVERA-SANTIAGO R F, SRISWASDI S, HARPER S L, et al. Probing structures of large protein complexes using zero-length cross-linking[J]. Methods, 2015, 89: 99-111.
- [18] OKITANI A, ICHINOSE N, KOZA M, et al. AMP and IMP dissociate actomyosin into actin and myosin[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008: 0807040972.
- [19] 施晓宇, 刘雪, 刘少伟, 等. 低温贮藏对鸡胸肉肌原纤维蛋白结构及热诱导凝胶性能的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(8): 2 594-2 601.  
SHI X Y, LIU X, LIU S W, et al. Effects of low temperature storage on the structure and heat-induced gelation properties of myofibrillar protein prepared from chicken breast muscle[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(8): 2 594-2 601.
- [20] CHEMAT F, KHAN M K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction[J]. Ultrasonics sonochemistry, 2011, 18(4): 813-835.
- [21] 卢涵. 鲮鱼肉低温贮藏过程中蛋白氧化、组织蛋白酶活性与品质变化规律的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.  
LU H. Protein oxidation, cathepsins activity and the quality changes of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) during low-temperature storage[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [22] 沈妮. 带鱼低温贮藏蛋白氧化、组织蛋白酶活性及鱼肉质地结构的变化规律[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.  
SHEN N. Protein oxidation, cathepsins activity, texture and structure of muscle changes of hairtail during low-temperature storage[D]. HangZhou: Zhejiang University, 2019.
- [23] 孙蕾蕾, 黄卉, 李来好, 等. 影响宰后鱼肉能量代谢和质构的酶及其活性测定方法研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(11): 348-355.  
SUN L L, HUANG H, LI L H, et al. Enzymes associated with postmortem energy metabolism and texture of fish muscle and assays to detect them[J]. Food Science, 2014, 35(11): 348-355.

- [24] MIDDLETON A J. A Structural Basis for Different Antifreeze Protein Roles[M]. Canada: Queen's University, 2012.
- [25] CARVALHO M E, GASPARIN G, POLETI M D, et al. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed[J]. *Meat Science*, 2014, 96(3): 1 318-1 324.
- [26] LOMIWES D, FAROUK M M, WIKLUND E, et al. Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: A review[J]. *Meat Science*, 2014, 96(1): 26-40.

