



蛋白质降解指示冷藏罗非鱼片品质劣变研究

刘寿春^{1,2}, 钟赛意³, 李平兰¹, 马长伟^{1,*}, 杨信廷²

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 国家农业信息化工程技术研究中心, 北京 100097;
3. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524005)

摘要: 通过测定蛋白分解菌、蛋白降解产物、蛋白溶解性以及肌原纤维蛋白和肌浆蛋白的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)条带变化反映蛋白降解作用对冷藏罗非鱼片腐败进程的影响。结果表明: 蛋白分解菌、pH值、氨基态氮含量的变化与肌肉蛋白降解程度具有良好对应关系。当蛋白分解菌少于6.10(lg(CFU/g))时, pH值呈弱酸性, 氨基态氮含量无明显增加, 肌原纤维蛋白和肌浆蛋白的SDS-PAGE条带模式无明显变化。当蛋白分解菌不少于7.60(lg(CFU/g))时, pH值呈中性至弱碱性, 氨基态氮快速增加, SDS-PAGE条带开始扩展分解, 蛋白降解作用持续增强。当肌原纤维蛋白SDS-PAGE中45~29kD处第3条带消失, 并在小于等于29kD处出现新条带时是鱼肉腐败的重要标志。

关键词: 冷藏罗非鱼片; 蛋白质降解; 品质劣变; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Protein Degradation Indicating Quality Deterioration of Chilled Tilapia Fillets

LIU Shou-chun^{1,2}, ZHONG Sai-yi³, LI Ping-lan¹, MA Chang-wei^{1,*}, YANG Xin-ting²

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
2. National Engineering Research Center for Information Technology in Agriculture, Beijing 100097, China;
3. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524005, China)

Abstract: The effect of protein degradation on the spoilage progress of chilled tilapia fillets was evaluated by measuring proteolytic bacteria, proteolytic compounds, protein solubility, and SDS-PAGE patterns of myofibrillar protein and sarcoplasmic protein. The results showed that the extent of muscle protein degradation was associated with changes in proteolytic bacteria, pH and amino nitrogen. When proteolytic bacteria were less than 6.10 (lg(CFU/g)), weakly acidic pH and no obvious changes in amino nitrogen or SDS-PAGE patterns of myofibrillar protein and sarcoplasmic protein were observed. While proteolytic bacteria reached or exceeded 7.60 (lg(CFU/g)), neutral or alkaline pH, a rapid increase in amino nitrogen, and outspread strips indicating protein degradation in SDS-PAGE patterns were observed. Therefore, the disappearance of the third band (45–29 kD) and the appearance of new bands with a molecular weight less than or equal to 29 kD in SDS-PAGE pattern of myofibrillar protein may be an important indicator of protein degradation.

Key words: chilled tilapia fillets; protein degradation; quality deterioration; SDS-PAGE

中图分类号: TS254.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)02-0241-05

鱼死后肌肉的内源蛋白酶和外源微生物作用使蛋白质降解产生低级氮类等化合物最终导致鱼肉腐败。肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, MFP)是肌肉最重要的组成成分, 在低温条件下容易变性, MFP降解会导致肌束进一步瓦解和中断, 使鱼肉软化。冻藏鱼肉由于蛋白变性或降解导致色泽退变、肌肉软化、鲜味物质流失、蛋白质盐溶性下降、凝胶成型性差等问题^[1-3], 冷藏条件下也避免不了MFP变性以及冷却收缩引起的蛋白变性^[4]。

冰藏沙丁鱼MFP发生变性导致其含量下降, 而肌浆蛋白(sarcoplasmic protein, SPP)含量维持相对稳定水平; MFP的收缩变性导致蛋白小片化, 而MFP降解则会使碎肉和鱼糜软化、凝胶性劣化^[5]。但目前很少研究淡水鱼冷藏过程中蛋白质降解或变性对品质的影响。本实验探讨淡水罗非鱼片冷藏过程中蛋白质降解作用对肌肉腐败进程以及系水力的影响, 明确引起蛋白降解的微生物数量, 为深入研究鱼肉腐败机理和品质评价提供参考。

收稿日期: 2011-12-04

基金项目: 欧盟第六框架科技计划项目(FP6-016333-2); 国家星火计划项目(2010GA600001); 国家“863”计划项目(2011AA100706)

作者简介: 刘寿春(1980—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为食品质量与安全控制。E-mail: scl2006cau@yahoo.com.cn

*通信作者: 马长伟(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为畜水产品加工及贮藏工程。E-mail: changweima@263.net



1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜活淡水罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)来自北京国家罗非鱼良种场, 击杀加工成生鲜鱼片, 托盘加盖保鲜膜包装, 加碎冰于保温箱中, 一层鱼一层冰确保0~4℃运往实验室, 并于0℃恒温冷库贮藏。从捕捞、加工、运输至实验室分析12h内完成。贮藏过程每隔一段时间随机取5片鱼片进行分析。

甲基红、次甲基蓝、盐酸、氢氧化钠、无水硫酸铜、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、十二烷基磺酸钠、硫酸铵、甲醇、甲醛(均为分析纯) 北京蓝弋生化试剂有限公司; 干酪蛋白胨琼脂 青岛海博生物技术有限责任公司; 蛋白Marker 美国Sigma-Aldrich公司。

1.2 仪器与设备

百分之一电子天平 上海天平仪器厂; 凯氏定氮仪 北京通润源机电技术有限责任公司; 酸式滴定管 泰兴市铭泰科教仪器设备有限公司; 垂直电泳槽 美国Bio-Rad公司; 稳压稳流型电泳仪 北京市六一仪器厂; 凝胶成像系统 上海小源科技有限公司; 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 蛋白分解菌测定

无菌操作取25g鱼片置于225mL无菌生理盐水中, 振荡均匀, 做10倍系列稀释, 选取适宜稀释度接种于酪蛋白胨琼脂, 30℃培养72h, 计算菌落周围带有透明圈的菌落个数, 即为蛋白分解菌(proteolytic bacteria, PB)。

1.3.2 蛋白质溶解性测定

总蛋白含量按照GB/T 5009.5—1985《食品中蛋白质的测定方法》凯氏定氮法测定。水溶性蛋白质(water soluble protein, WSP)和盐溶蛋白质(salty soluble protein, SSP)提取步骤^[2]如下: 2g混匀鱼肉泥加18mL、4℃蒸馏水, 均质2min, 9000×g离心20min, 重复操作一次, 两次离心所得上清液定容至25mL, 即为WSP。沉淀物用4倍预冷含0.6mol/L KCl磷酸缓冲液(50mmol/L, pH7.0)均质2min, 4℃静置30min, 9000×g离心15min, 沉淀物重复洗涤一次, 两次离心所得的上清液定容至25mL, 即为SSP。蛋白质含量测定按照GB/T 5009.5—1985《食品中蛋白质的测定方法》进行。

1.3.3 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白降解模式

肌原纤维蛋白(MFP)提取^[6]: 准确称取混匀鱼肉泥, 加4倍体积磷酸缓冲液(50mmol/L, pH7.0), 漂洗3次后, 取沉淀, 再加4倍体积磷酸缓冲液(含50mmol/L磷酸盐, 0.1mol/L NaCl溶液, 0.2% Triton溶液), 4℃、3000×g离心15min, 取沉淀, 加入等体积的磷酸缓冲液(含50mmol/L磷

酸缓冲液, pH7.5)匀浆, 20℃静置30min, 4℃、3000×g离心15min, 收集沉淀, 即为MFP, 于-80℃保存备用。肌浆蛋白(SPP)提取^[7]: 称取混匀鱼肉泥, 加4倍体积磷酸缓冲液(50mmol/L, pH7.0)均质1min, 4℃、10000×g离心15min, 取上清液, 沉淀, 重复上述操作, 合并两次上清液定容至25mL, 即为SPP, 于-80℃保存备用。MFP和SPP提取液经过蛋白质浓度测定和调整, 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)^[8], 其中分离胶10%, 浓缩胶4%, 上样量20μL, 约含15μg蛋白质。采用稳压方式跑胶, 待样品进入分离胶后, 调至120V稳压电泳。电泳结束, 摇床染色, 脱色, 保存。电泳胶片采用凝胶成像系统扫描。

1.3.4 氨基态氮测定

参考GB/T 5009.39—1996《酱油卫生标准的分析方法》甲醛滴定法。准确称取5g混匀鱼肉泥, 均质后用蒸馏水定容至100mL, 过滤, 吸取20mL滤液, 加60mL蒸馏水, 开动磁力搅拌器, 用0.050mol/L NaOH标准溶液滴定至pH8.2; 再加入10mL甲醛, 混匀, 用NaOH标准溶液继续滴定至pH9.2, 记下两次NaOH消耗量, 计算氨基态氮含量/(mg/100g)。

1.3.5 系水力测定

系水力测定采用高速离心法^[9], 准确称取混匀鱼肉泥置于离心管中, 10000×g、4℃离心15min, 立即取出倒置于滤纸吸干, 等水分完全晾干后, 称质量, 前后差值与初始肉质量之比为鱼肉的失水率。失水率越大, 系水力越差。

2 结果与分析

2.1 冷藏过程蛋白分解菌的变化

由于某些蛋白分解菌(PB)耐冷生长, 且能分解蛋白质和氨基酸产生低级含氮化合物, 因此在冷藏鱼肉中不能忽视其致腐能力。如图1所示, 初始PB为4.73(lg(CFU/g)), 由于0℃低温贮藏, 6d以前处于生长延滞期, 随后快速进入对数期(6~17d), 21d以后处于稳定期达到9.43(lg(CFU/g)), 随后呈轻微下降趋势。13d PB数量已超过国际微生物委员会规定的7.0(lg(CFU/g)), 如此高含量说明鱼片腐败与PB可能存在密切关系。在冷藏淡水鲈鱼片微生物种群中, 具有蛋白分解能力的菌株占48%, 对其进行分离纯化, 并接种于生鱼汁和脱脂奶培养基中, 发现假单胞菌为主要的蛋白分解菌, 且能产生高活性的蛋白酶^[10]。在鲑鱼肉压榨汁和无菌鲑鱼肉块中, 假单胞菌能分泌高活性蛋白酶产生异味和挥发性盐基氮, 同时使鱼肉软化, 表明蛋白分解菌具有强致腐能力^[11]。同时在冰藏鲑鱼^[12]、沙丁鱼^[13]、竹荚鱼^[14]和大比目鱼^[15]中, PB对鱼

肉蛋白分解具有重要贡献。然而在冰藏16d的鲳鱼、安康鱼和鲑鱼中,发现采用不同质地的冰(冰片、泡沫冰等)能有效抑制微生物生长, PB数量也较低($<4(\lg(\text{CFU/g}))^{[16]}$ 。

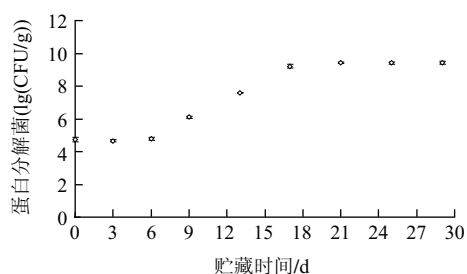


图1 罗非鱼片冷藏过程蛋白分解菌的变化

Fig.1 Change in proteolytic bacteria during chilled storage of tilapia fillets

2.2 冷藏过程pH值及氨基态氮的变化

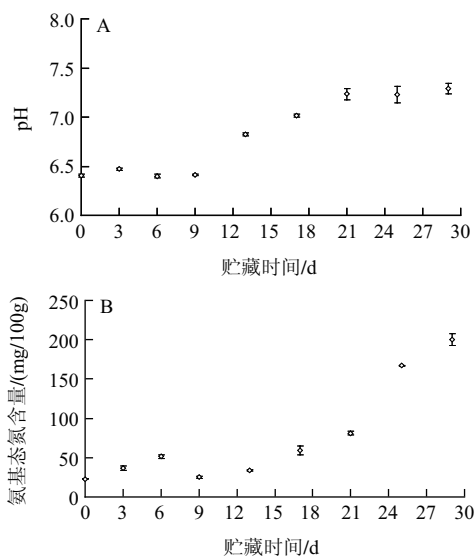


图2 罗非鱼片冷藏过程pH值(A)和氨基态氮含量(B)的变化

Fig.2 Changes in pH (A) and amino nitrogen (B) during chilled storage of tilapia fillets

pH值变化是鱼肉腐败的重要特征之一。如图2A所示,在贮藏期的前9d鱼肉的pH值变化很小(6.40~6.47),9d以后pH值持续快速增加,在第13天和第17天分别达到6.82和7.01,表明鱼肉中碱性物质不断积累,使pH值逐渐从弱酸性向中性和弱碱性偏移。多数学者认为pH值不能反映鱼肉新鲜度,因它随季节、鱼种、宰杀方式、包装的变化而差异较大。也有学者认为: $\text{pH} \leq 6.5$, 新鲜鱼; $6.5 < \text{pH} \leq 6.8$, 略有降解,可食用; $6.8 < \text{pH} \leq 7.0$, 临界值; $\text{pH} > 7.0$, 降解并不可食用^[17]。但在真空和气调包装中含有 CO_2 ,其pH值差异较大。当鱼肉降解产生的碱性物质足够多时,能使pH值升高。在鲫鱼有氧冷藏过程中, pH值持续上升可反映肌肉蛋白质降解情况^[17],而不同致死方法的挣扎程度对养殖鱼类产生的乳酸含量不

同,导致pH值有差异,其中活杀法产生的乳酸含量显著低于挣扎致死法^[18]。氨基态氮是指以 α -氨基酸形式存在的氮元素含量,可一定程度反映蛋白质水解情况,但含量过高对鱼鲜度有负作用^[19]。如图2B所示,当鱼鲜度很好时($<3\text{d}$),氨基态氮增加缓慢(22.79~36.98mg/100g),此时主要由内源酶作用引起;当鱼鲜度明显下降时($\geq 13\text{d}$),其含量迅速增加(33.85~200.24mg/100g),氨基态氮的逐渐积累表明蛋白质降解作用不断增强。蔡慧农等^[19]发现冷藏前期(3d)罗非鱼肉pH值轻微下降,随后逐渐回升,与氨基态氮的变化趋势较为一致。

2.3 冷藏过程蛋白质溶解性的变化

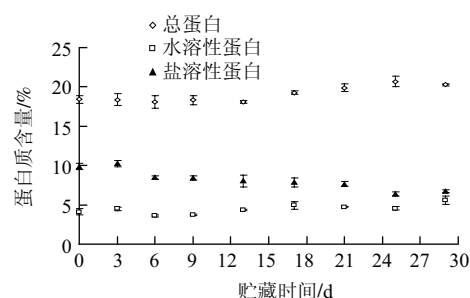


图3 罗非鱼片冷藏过程蛋白质含量的变化

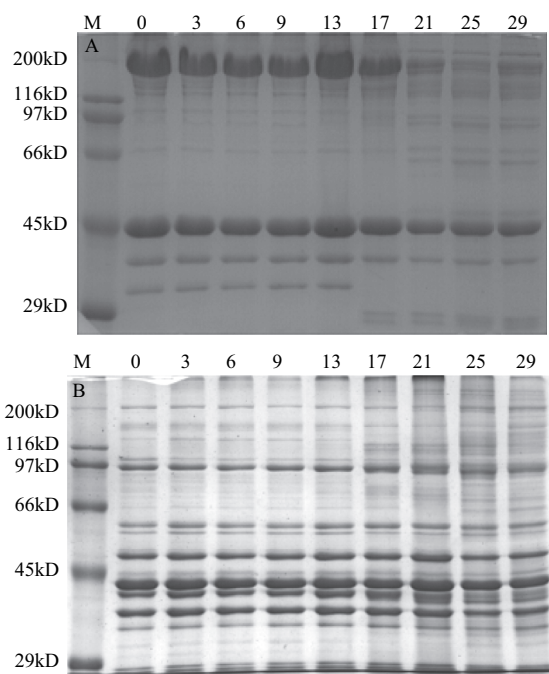
Fig.3 Change in protein content during chilled storage of tilapia fillets

图3显示罗非鱼片冷藏过程中总蛋白、水溶性蛋白和盐溶性蛋白含量的变化。整个贮藏过程中鱼片总蛋白含量在18.11%~20.68%之间变化,贮藏13d后总蛋白含量呈上升趋势,可能有氧包装与外界空气交换较多,肌肉表面水分散失快,干物质含量增加导致总蛋白含量增加。根据溶解性不同,蛋白质可分为盐溶性蛋白(SSP)、水溶性蛋白(WSP)和不溶性蛋白。由图3可知, WSP呈先下降再波动上升趋势,初始含量4.10%增加至末期5.61%, SSP从9.87%下降至末期6.73%, 总体呈持续下降趋势。MFP是SSP的主要成分^[4], MFP降解成低分子质量蛋白质或多肽,在低离子强度($I=0.05$)的盐溶液中溶解性增强。贮藏温度会影响肌肉蛋白质溶解性。斑点叉尾鲷鱼碎肉 0°C 贮藏过程中SSP呈下降趋势,漂洗过程能去除WSP中含有的酶类使得其SSP得率高于未漂洗样品^[20]。冻藏过程产生冰晶会对MFP造成损伤, Ca^{2+} -ATPase 活性下降,引起MFP变性,从而表现在SSP含量下降^[21]。然而在大西洋鲑鱼片冰藏过程中SSP持续上升(3.9%~5.5%),其WSP变化不大(增加0.2%);鲑鱼片在微冻贮藏过程SSP先下降后回升,始末含量增加0.8%,而WSP呈波动变化,始末增加0.6%^[2]。因此, WSP增减与SSP变化可能有关,而pH值也会影响SSP的溶解性^[22]。

2.4 冷藏过程肌原纤维蛋白和肌浆蛋白SDS-PAGE降解模式

SDS-PAGE电泳图谱中高分子质量条带的扩展、模

糊、弱化、消失以及低分子质量条带的出现、浓度增强是蛋白质不断降解的外在表现。由图4A可知,贮藏过程中MFP主要变化表现在肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)(200kD)和29kD附近条带的高度降解,肌动蛋白(actin, 45kD)在整个贮藏过程中无明显变化。0d新鲜时MFP各条带明亮清楚,在200~45kD处有7条带(不包括45kD),在45~29kD处有3条带(包括45kD)。从第3天开始,在97kD附近新增了1条带,此时在200~116kD之间的条带不断降解而变得模糊。从第13天开始,200~66kD之间的条带开始变得模糊,表明降解作用增强。从第17天开始,200~97kD之间的条带变得越来越模糊,45~29kD处的第3条带已完全消失,且在小于等于29kD附近新增2条带。随后66~45kD处新增2条带,分别靠近66kD和45kD,这两条带浓度和亮度逐渐增强。200~66kD之间的条带逐步降解成低分子质量条带,且低分子质量条带的浓度逐步增强的同时也在不断降解。总体而言,MFP降解过程中,actin变化最小,MHC和29kD附近的条带在贮藏17d后降解作用持续增强。



M.表示蛋白标记Marker; 0、3、6、9、13、17、21、25、29d分别表示贮藏时间。

图4 罗非鱼片冷藏过程肌原纤维蛋白(A)和肌浆蛋白(B)的降解情况
Fig.4 Degradation of myofibrillar protein (A) and sarcoplasmic protein (B) during chilled storage of tilapia fillets

相比之下,SPP与MFP的构成不同,其SDS-PAGE蛋白条带分布有明显差别。如图4B所示,SPP的主要构成为45kD附近的条带,0~13d SPP条带无明显变化,与0d原有条带基本相似。从第17天开始出现降解,表现在116kD附近新增1条带,且浓度逐渐增强;97~66kD处条

带的降解使得原有条带逐渐模糊,新条带开始出现;在小于等于45kD处的第3条带开始扩展,逐渐降解;随着贮藏时间的延长,原本含量很少的MHC(200kD)处也有降解趋势。总体上,SPP降解过程主要表现为:贮藏17d,200~66kD和小于45kD处的条带开始明显扩展和降解,这与MFP降解时间相近,但SPP降解过程中几乎没有条带缺失,只在原有条带上分解出新条带。

研究表明-20℃冻藏鲢鱼肌肉中仍存在多种具有活性的组织蛋白酶B、H和L,对MFP降解和鱼糜软化具有重要影响^[22]。但内源蛋白酶活性相对比较弱,冷藏鱼肉的蛋白降解主要是由微生物作用引起^[23]。本实验中MFP降解与蛋白分解菌(PB)数量存在密切联系。贮藏9d,PB数量为6.10(lg(CFU/g)),此时鱼片感官仍可接受,MFP条带基本没有增减,蛋白降解作用较弱。贮藏13d时,感官接受临界点,PB数量达到7.60(lg(CFU/g)),200~97kD之间条带变得模糊。17d时,异味增强,感官不可接受,PB数量到达9.21(lg(CFU/g)),在45~29kD处第3条带消失,并在小于等于29kD处新增2条带,这是鱼肉腐败的重要特征。贮藏17d以后,PB达到稳定期,数量维持在9.4(lg(CFU/g))左右,MFP原有条带模糊淡化,且条带附近多个位点出现新条带,降解作用持续增强。因此,蛋白降解作用与PB数量呈现一定的依赖性,可能与PB细菌群体感应有关,但有待进一步研究。在许多与食品腐败有关的革兰氏阴性菌能产生细菌细胞交流的信号分子(如N-酰基-高丝氨酸内酯),且只有腐败细菌达到一定数量后才能检测到,这些信号分子与腐败细菌数量具有一定的相关性^[24-25]。总体而言,SDS-PAGE图谱能直观呈现肌肉蛋白的构成分布和降解情况,也能大体通过MFP中45~29kD处第3条带的消失和小于等于29kD处新条带的出现来评价鱼肉是否已腐败,但需要更紧密的取样间隔和更细致的蛋白标记,以便有效判断某些特异蛋白条带的存在与新鲜度之间的关系,蛋白降解到何种程度为货架期终点则需要进一步深入研究。同时PB数量与蛋白降解作用存在密切关系,6.10~7.60(lg(CFU/g))是否可作为PB细菌群体感应的临界范围有待进一步研究。

2.5 冷藏过程系水力的变化

系水力是指当肌肉受到外力作用时,保持原有水分的能力,表现为在外力作用下从肌肉释放出的液体量,常用作鲜肉和鱼糜制品的重要指标^[9]。系水力高,肉质多汁、鲜嫩、表面干爽;系水力低,则表面水分渗出、风味物质流失,凝胶成型性差。图5为罗非鱼片冷藏过程失水率的变化。从图5可看出,鱼片失水率随着贮藏时间延长不断下降,从初始13.11%下降至最低值21d的0.71%,随后又回升至末期2.30%。当失水率最低时,MFP降解作用剧烈,pH7.23,弱碱性又促进碱性蛋白酶活性激活蛋白降解,肌束中MFP之间的网络链接断裂,氨基态氮等

可溶性物质增加,内部渗透压增大,导致系水力上升,达到最大值后并维持在较稳定水平。表明蛋白降解程度越大,系水力越高,这与鲜肉时系水力高、品质好的性质不同。研究表明,死后肌肉蛋白结构的降解和MFP中肌丝的溶胀是决定系水力的潜在重要因素,MFP结构的主要成分Titin和Nebulin在死后肌肉系统中发生降解,其两者的完整性可能影响系水力^[26]。本实验鱼肉冷藏过程系水力不断升高可能是蛋白降解和腐败的外在表现。

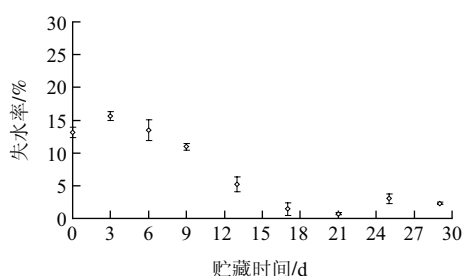


图5 罗非鱼片冷藏过程失水率的变化

Fig.5 Change in water loss rate during chilled storage of tilapia fillets

3 结论

罗非鱼片冷藏过程中,SDS-PAGE图谱能直观呈现MFP和SPP的降解情况,且蛋白降解程度越高,PB、氨基态氮、pH值以及系水力越高,且有变化的拐点,但盐溶蛋白含量呈下降趋势。PB6.10~7.60(lg(CFU/g))和pH6.82~7.01可认为是MFP降解的关键临界范围;当MFP的SDS-PAGE中45~29kD处第3条带消失,并在小于等于29kD处降解出2条新带是鱼肉腐败的重要表现;为日后靶向检测该类特异性小分子蛋白的出现指示鱼肉品质劣变进程提供重要的理论和实践指导。关于确切的PB数量、肌肉蛋白降解程度及其降解过程特异蛋白条带的特征用于指示鱼肉品质劣变进程有待今后深入研究。

参考文献:

- [1] BENJAKUL S, BAUER F. Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze-thaw cycles[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80(8): 1143-1150.
- [2] DUUN A S, RUSTAD T. Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets[J]. Food Chemistry, 2007, 105(3): 1067-1075.
- [3] 黄海, 辛荣, 王秀敏. 鱼肉蛋白在低温贮藏时生化特性变化研究进展[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(2): 149-155.
- [4] 须山三千三, 鸿巢章二. 水产食品学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1992.
- [5] PACHECO-AGUILAR R, LUGO-SANCHEZ M E, ROBLES-BURGUEÑO M R. Postmortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle[J]. Food Chemistry, 2006, 97(2): 244-247.
- [6] OGATA A H, ARANISHI F, HARA A K, et al. Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 76(4): 499-504.
- [7] LADRAT C, VERREZ-BAGNIS V, NOËL J, et al. *In vitro* proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L[J]. Food Chemistry, 2003, 81(4): 517-525.
- [8] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [9] CHÉRET R, CHAPLEAU N, DELBARRE-LADRAT C, et al. Effects of high pressure on texture and microstructure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fillets[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(8): 477-483.
- [10] KAZANAS N. Proteolytic activity of microorganisms isolated from freshwater fish[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1968, 16(1): 128-132.
- [11] SHAW B G, SHEWAN J M. Psychrophilic spoilage bacteria of fish[J]. Journal of Applied Microbiology, 1968, 31(1): 89-96.
- [12] RODRÍGUEZ Ó, LOSADA V, AUBOURG S P, et al. Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity[J]. Food Research International, 2004, 37(8): 749-757.
- [13] CAMPOS C A, RODRÍGUEZ Ó, LOSADA V, et al. Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*)[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103(2): 121-130.
- [14] RODRÍGUEZ, Ó, LOSADA V, AUBOURG S P, et al. Sensory, microbial and chemical effects of a slurry ice system on horse mackerel (*Trachurus trachurus*)[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(2): 235-242.
- [15] RODRÍGUEZ Ó, BARROS-VELÁZQUEZ J, PINEIRO C, et al. Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory quality and on the shelf life of farmed turbot (*Psetta maxima*)[J]. Food Chemistry, 2006, 95(2): 270-278.
- [16] BARROS-VELÁZQUEZ J, GALLARDO J M, CALO P, et al. Enhanced quality and safety during on-board chilled storage of fish species captured in the Grand Sole North Atlantic fishing bank[J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 493-500.
- [17] 陆利霞, 李霞, 孙芸. 鲫鱼贮藏鲜度评价物理特性指标的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5): 162-165.
- [18] 杨宏旭, 衣庆斌, 刘承初, 等. 淡水养殖鱼死后生化变化及其对鲜度质量的影响[J]. 上海水产大学学报, 1995, 4(1): 1-8.
- [19] 蔡慧农, 陈发河, 吴光斌, 等. 罗非鱼冷藏期间新鲜度变化及控制的研究[J]. 中国食品学报, 2003, 3(4): 46-50.
- [20] SUVANICH V, JAHNCKE M L, MARSHALL D L. Changes in selected chemical quality characteristics of channel catfish frame mince during chill and frozen storage[J]. Journal of Food Science, 2000, 65(1): 24-29.
- [21] SIDDIAIAH D, SAGAR REDDY G V, RAJU C V, et al. Changes in lipids, proteins and kamaboko forming ability of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) mince during frozen storage[J]. Food Research International, 2001, 34(1): 47-53.
- [22] LIU Hua, YIN Lijun, ZHANG Nan, et al. Isolation of cathepsin B from the muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and comparison of cathepsins B and L actions on surimi gel softening[J]. Food Chemistry, 2008, 110(2): 310-318.
- [23] 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, 1997, 62(4): 729-733.
- [24] GRAM L, RAVN L, RASCH M, et al. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78(1): 79-97.
- [25] MEDINA-MARTÍNEZ M S, UYTENDAELE M, DEMOLDER V, et al. Influence of food system conditions on *N*-acyl-*L*-homoserine lactones production by *Aeromonas* spp.[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 112(3): 244-252.
- [26] OFFER G, TRINICK J. On the mechanism of water holding in meat: the swelling and shrinking of myofibrils[J]. Meat Science, 1983, 8(4): 245-281.