

鱼类贮藏期间鲜度指标 K 值变化及鲜度评价

汤水粉*, 罗方方, 钱卓真, 吴成业

(福建省水产研究所, 厦门 361013)

摘要:目的 研究鱼类肌肉在不同贮藏条件下的鲜度指标 K 值及鲜度变化情况。方法 鱼类肌肉在不同条件下贮藏, 肌肉中的 ATP 关联物用高氯酸溶液提取后用高效液相色谱进行检测, 通过公式计算出 K 值。结果 K 值与鱼类的新鲜度变化趋势有较好的规律性, 随着贮藏时间延长 K 值增大, 温度越低变化越缓慢。在 28~30 °C 条件下只能贮藏数小时, 4~5 °C 条件下可延长至 5 d, -2~0 °C 条件下贮藏大于 15 d。结论 K 值客观地反映了鱼类贮藏过程中的鲜度变化情况, 适合于作为鲜度的判定指标。

关键词: 鱼类; 鲜度; 鲜度指标 K 值; 高效液相色谱法

Study on freshness of fishes during different storage stage by the freshness quality index (K value)

TANG Shui-Fen*, LUO Fang-Fang, QIAN Zhuo-Zhen, WU Cheng-Ye

(Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China)

ABSTRACT: Objective To monitor the freshness quality index (K value) of fishes during different storage stage, in order to examine the changes in freshness. **Methods** ATP-related compounds of fishes which stored in different stage were extracted by perchloric acid and determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Then the change of K value was calculated and monitored. **Results** K value showed a better regularity with the freshness of fishes, which increased with the storage time and changed more slowly when lower the temperature. In the condition of 28~30 °C, the fishes stored only several hours, while in 4~5 °C and -2~0 °C, the storage time was 5 d and 15 d, respectively. **Conclusion** It is envisaged that K value reflect the fish freshness objectively and could be suitable as the freshness quality index of fishes during storage stage.

KEY WORDS: fishes; freshness; freshness quality index K value; high performance liquid chromatography

1 引言

水产品营养丰富, 是蛋白质、无机盐和维生素的良好来源, 也是深受人们欢迎的美味佳肴。但是, 鲜活水产品由于内源性蛋白酶活跃, 死后自溶速度快, 营养物质容易发生变化, 如腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)降解、蛋白质变性等, 会影响鱼肉品质与风味。为了获得高鲜度的水产品, 提高人们的生活品质, 考察水产品在不同保存条件下鲜度的变

化有重要意义。

目前用来评定水产品鲜度的方法主要有感官评价^[1]、挥发性盐基氮(TVB-N)^[2,3]、三甲胺、 K 值^[4]以及微生物指标细菌总数^[5]等。其中, K 值是以核苷酸的分解产物作为指标的鱼类鲜度判定方法, 也是最能反映鱼类鲜度变化的一个指标。一般认为, 鱼类死后肌肉内 ATP 会降解为腺苷二磷酸(adenosine diphosphate, ADP)、腺苷酸(adenosine monophosphate, AMP)、肌苷酸(inosinic acid, IMP)、次黄嘌呤核苷

*通讯作者: 汤水粉, 工程师, 主要研究方向为水产品质量安全。E-mail: powder2005@126.com

*Corresponding author: TANG Shui-Fen, Engineer, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China. E-mail: powder2005@126.com

(inosine, HxR), 最后转化成次黄嘌呤(hypoxanthine, Hx), 导致肌肉呈苦味^[6,7]。K 值就是 ATP 的降解产物 HxR、Hx 量之和对 ATP 关联物总量(ATP + ADP + AMP + IMP + HxP + Hx)的百分比^[8,9]。K 值能反映鱼体死后从僵硬到自溶阶段 ATP 降解反应进行的程度, 反映其新鲜度。K 值越小表示鲜度越好, 反之, 越大则鲜度越差。一般即杀的鱼 K 值在 10%以下, 推荐作为生鱼片的新鲜鱼 K 值大约在 20%以下, 20%~40%为二级鲜度, 60%~80%为初期腐败鱼^[10]。自 1959 年 Saito^[9]提出以 ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx 降解过程来评定鱼类鲜度后, 国内外学者纷纷对多种鱼类和虾类在贮藏期间的 K 值变化作了研究。目前, 水产品鲜度指标 K 值的测定方法主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[11-13]、传感器法^[14]、电泳分析测定法^[15]、电子鼻^[16]等。其中高效液相色谱法灵敏度高, 选择性和特异性好, 能够对低浓度的样品具有很好的定性和定量的确定, 是水产品质量检测最常用的方法。而挥发性盐基氮(TVB-N)是目前判别鱼类鲜度的经典指标^[17], 一般新鲜鱼的 TVB-N 值为 15 mg/100 g 以下^[18], 而其安全指标按《鲜、冻动物性水产品卫生标准》^[19]规定, 淡水鱼、虾的 TVB-N 含量要 20 mg/100 g, 海水鱼、虾 30 mg/100 g。

本实验以温度、时间为变量, 通过分析鱼体肌肉中 ATP 关联物的含量对不同鱼类鲜度指标 K 值的变化进行了探讨, 同时结合 TVB-N 实验及感官实验, 揭示它们的变化规律及内在联系, 为水产品保鲜提供理论指导。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

Waters 2695 液相色谱仪、Waters 2487 紫外检测器、Empower 工作站软件(Waters 公司); 漩涡振荡器(德国 IKA); Eppendorf 5804R 高速冷冻离心机(艾本德中国有限公司); pH 计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); Log Tag 卡片式温度记录仪(北京天悦生科技有限公司)。

ATP 关联物标准品(纯度 98%, 德国 Dr. Ehrenstorfer); 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氢氧化钠、高氯酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为 Millipore Academic 制备的超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备及贮藏

鲈鱼、草鱼、罗非鱼等鲜活的鱼购于当地的水产品市场, 去头、去鳞、去皮、去内脏, 沿脊背取肌肉部分; 真鲷、鲷鱼、红甘鱼等生鱼片购于日本料理店。将肌肉部匀质混匀, 制备的样品如不能及时检测, 于 -18 ℃ 以下贮存备用。其中草鱼、罗非鱼为淡水鱼, 鲈鱼、真鲷、鲷鱼、红甘鱼为海水鱼。

将制备好的鱼肉样品分别于 28~30 ℃、4~5 ℃ 和 -2~0 ℃ 条件下贮藏, 贮藏期间用 Log Tag 卡片式温度记录仪实时监控温度变化。定期对样品进行 K 值和 TVB-N 水平测定, 直到 K 值大于 60%, 即鱼肉进入初期腐败。

2.2.2 K 值测定

称取均质后的样品 (2.00 ± 0.05) g 放入 50 mL 离心管内, 加入冷却后的 10%的高氯酸溶液 20 mL, 涡旋振荡 1 min, 在 4 ℃ 下 8000 r/min 离心 10 min, 取出上清液。再用 5%的高氯酸溶液 20 mL 重提沉淀物中的待测物, 在 4 ℃ 下 8000 r/min 离心 10 min, 合并上清液。用 10 mol/L 的 NaOH 溶液调提取液 pH 值近 6.0, 然后再用 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液继续调节 pH 至 6.0~6.4。

将已中和到 pH 6.0~6.4 的提取液, 用蒸馏水定容至 50 mL。在 4 ℃ 下 8000 r/min 离心 10 min, 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 滤液于 4 ℃ 下保存, 待测。

HPLC 条件: 色谱柱 AQ-C₁₈ 柱, 250 mm×4.6 mm(*i.d.*), 粒径 5 μm; 或性能相当者。流动相为 0.02 mol/L KH₂PO₄+0.02 mol/LK₂HPO₄ (v:v=1:1)的缓冲液, 用磷酸调节至 pH=6.0。进样量 20 μL, 流速 1.0 mL/min, 柱温 35 ℃, 254 nm 检测。外标法定量。

图 1 是 6 种 ATP 关联物标准品的 HPLC 图谱。6 种 ATP 关联物在 35 min 内得到有效分离, 基线平稳、重现性好。出峰顺序依次为 ATP、IMP、ADP、Hx、AMP、HxR。

K 值是 ATP 的分解产物 HxR 与 Hx 总量占 ATP 关联物总量的百分比, 通过 ATP 关联物含量的变化可计算出 K 值。

$$K \text{ 值} = \frac{M_{\text{HxR}} + M_{\text{Hx}}}{M_{\text{ATP}} + M_{\text{ADP}} + M_{\text{AMP}} + M_{\text{IMP}} + M_{\text{HxR}} + M_{\text{Hx}}} \times 100\%$$

式中: M_{ATP} 、 M_{ADP} 、 M_{AMP} 、 M_{IMP} 、 M_{HxR} 、 M_{Hx} 为样品中 ATP、AMP、ADP、IMP、Hx、HxR 的含量, 单位均为微摩尔每克(μmol/g)。

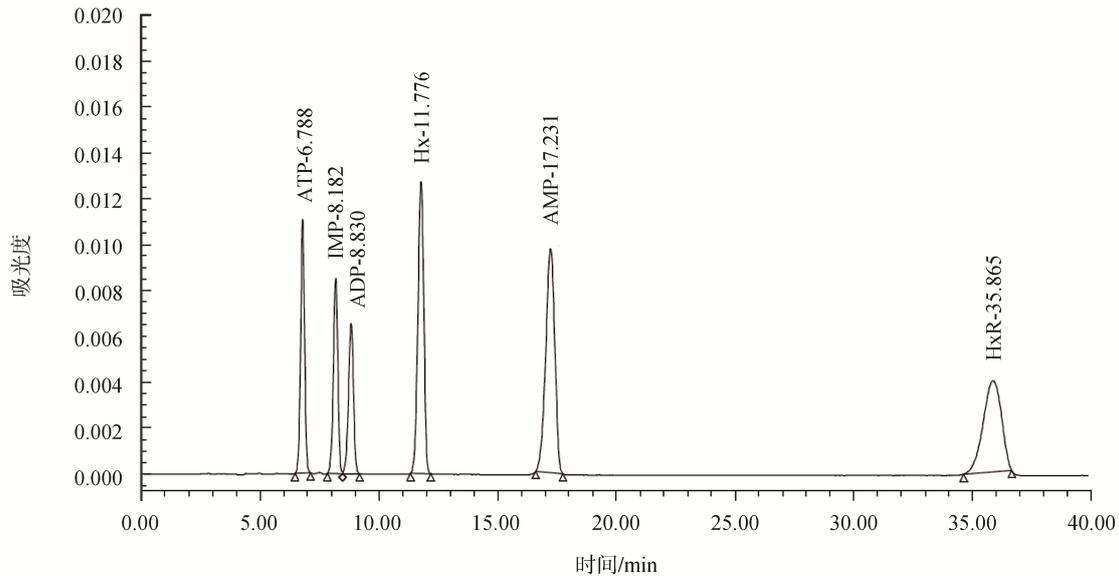


图 1 6 种 ATP 关联物标准色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard mixture of six ATP-related compounds

2.2.3 挥发性盐基氮实验

将试样绞碎搅匀, 称取约 (10.00 ± 0.05) g, 置于锥形瓶中, 加 100 mL 二次水, 不时振摇, 浸渍 30 min, 再用半微量扩散法对滤液进行测定, 方法参见 GB/T 5009.44-2003《水产品中挥发性盐基氮的测定》^[20]。

3 结果与讨论

3.1 腺苷三磷酸(ATP)关联物的变化

提取水产品中的 ATP 及其关联物, 进行 HPLC 检测, 通过计算样品中 ATP 关联物的含量, 对其鲜度指标 K 值进行分析。

3.1.1 ATP、ADP、AMP、IMP 含量的变化

实验发现, 真鲷、鲷鱼、红甘鱼、鲈鱼、草鱼和罗非鱼经过约 2 h 的宰杀及前处理, 肌肉内的 ATP 降解较快, 待检测时, 几乎全部降解, 其含量最高只有 $0.06 \mu\text{mol/g}$, 而肌肉中 IMP 含量却迅速升高。这可能是由于宰杀及前处理过程中, 肌肉中高活性的三磷酸腺苷酶的作用, 使 ATP 迅速经由 ADP、AMP 转化为 IMP, 使 IMP 含量上升(见图 2, 图 3)。如真鲷肌肉中 IMP 含量可达 $12 \mu\text{mol/g}$, 鲈鱼、草鱼和罗非鱼比真鲷、鲷鱼、红甘鱼肌肉中的 IMP 含量略低。IMP 是 ATP 降解的中间产物, 也是重要的鲜味物质。即杀的鱼, 肉质鲜美, 这与其高含量的 IMP 密切相关。然后, IMP 不断地分解, 直至几乎完全分解; 各种鱼体

肌肉中 ADP 含量很低, 而且下降速度非常缓慢, 低温条件下几乎保持相对恒定; AMP 的含量始终保持在在一个较低水平, 新鲜鱼也不到 $0.15 \mu\text{mol/g}$, 而且变动不明显。

3.1.2 Hx 和 HxR 含量变化

HxR 和 Hx 是 ATP 分解的最终积累物质。贮藏过程中不同种类的水产品肌肉内 HxR 的含量均先呈逐渐上升趋势, 且 HxR 在生成的同时也不断分解, 最后生成 Hx (见图 2, 图 3), 使 Hx 含量一直呈上升趋势。Hx 被认为是导致异味的物质, 随着贮藏时间的延长, Hx 快速上升, 最终导致鱼体腐败味的产生。

上述实验结果进一步证实了鱼类宰杀后, 肌肉中的 ATP 逐渐降解, 最后生成 Hx 的代谢途径。

3.2 K 值变化

将鱼肉在不同温度下贮藏, 观察不同鱼类中的 ATP 及其降解物的变化情况, 发现贮藏温度对 ATP 关联物的变化规律有较大影响, 从而影响 K 值的变化。

图 4 是不同品种鱼类在 $28\sim 30^\circ\text{C}$ 贮藏期间的 K 值变化。从试验结果可以看出随着贮存时间的增加, K 值呈上升趋势。草鱼、鲈鱼分别在 4 h 和 5.5 h 内 K 值达到 60% 以上; 相比之下, 真鲷、鲷鱼贮藏时间比较长, 真鲷在 8 h、鲷鱼在 15 h 时, K 值达到 60%。此后的 1~2 h, K 值迅速增大到 80%。草鱼比鲈鱼、真鲷和鲷鱼的贮藏时间较短, 可能是由于在淡水鱼体内

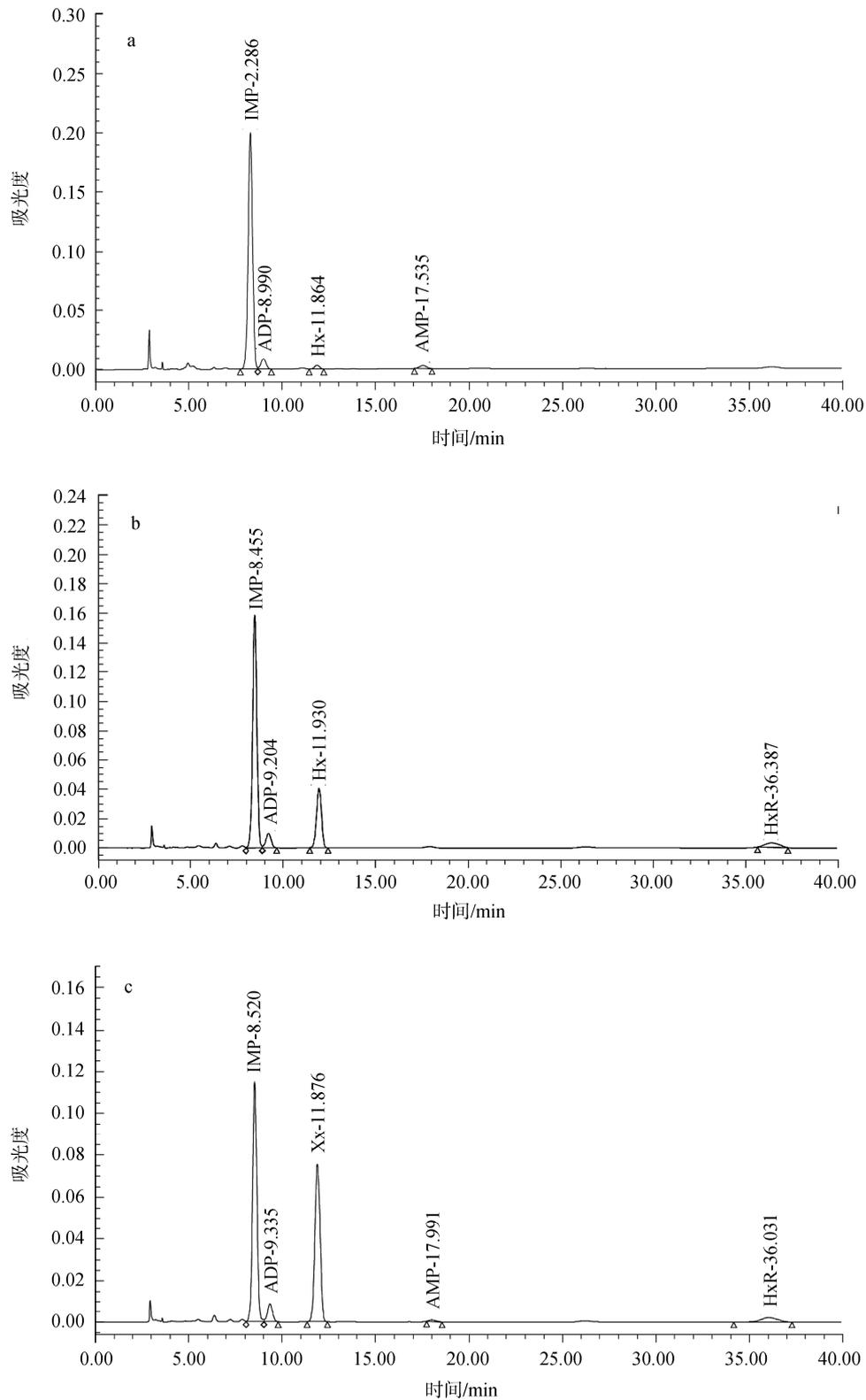
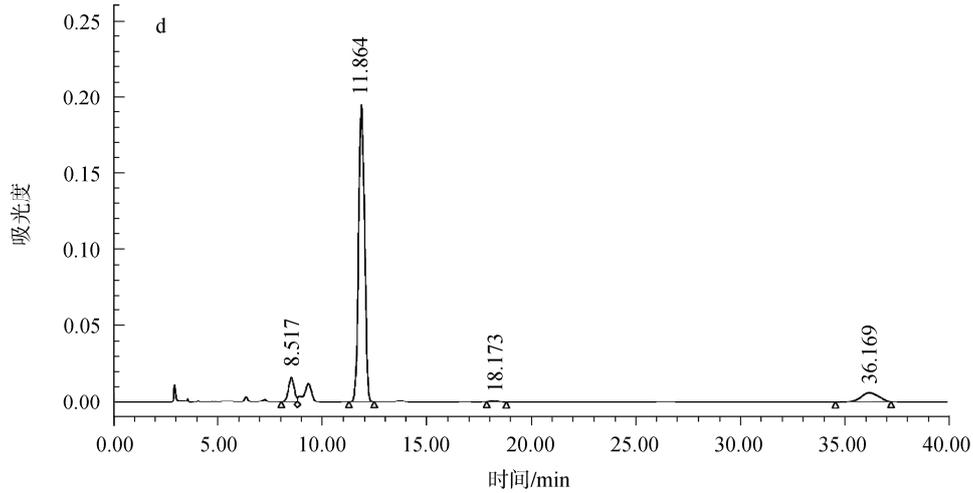


图 2 真鲷宰杀后肌肉中 ATP 关联物的含量变化色谱图

Fig.2 Change of six ATP-related compounds in *Pagrosomus major* after killed

(a) 即杀后; (b) 贮藏期间; (c) 贮藏期间; (d) 腐败后

(a) after finish killing; (b) during the storage; (c) during the storage; (d) rotting fish muscle



续图 2

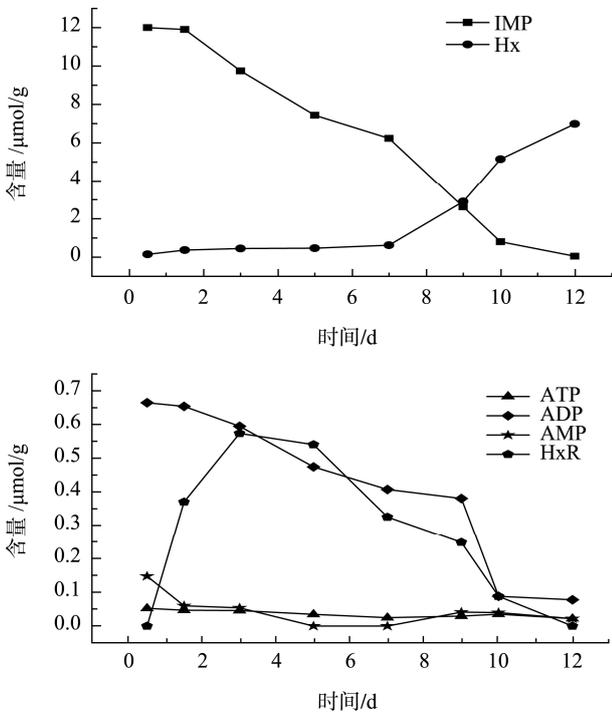


图 3 真鲷肌肉在 4~5 °C 条件下贮藏期间 ATP 关联物的含量变化

Fig. 3 Change of six ATP-related compounds in *Pagrosomus major* in condition of 4~5 °C

蛋白酶的最适温度接近室温, 所以它的自溶速度比海水鱼快, 容易腐败变质^[20]。

图 5 为鱼肉 4~5 °C 下贮藏时 K 值的变化曲线。可见, 当贮藏温度从 28~30 °C 降低到 4~5 °C 冷藏时, K 值的变化速度明显缓慢, 在第 4.5 d 时, 除了罗非鱼的 K 值为 46% 外, 真鲷、鲷鱼等其他鱼类的 K 值仍

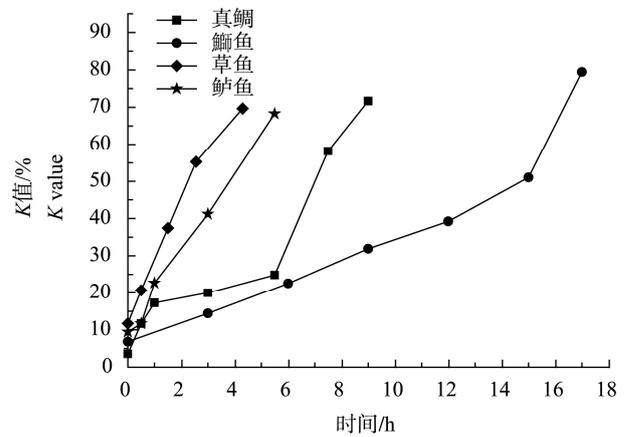


图 4 28~30 条件下 K 值变化

Fig. 4 Changes of K value in condition of 28~30

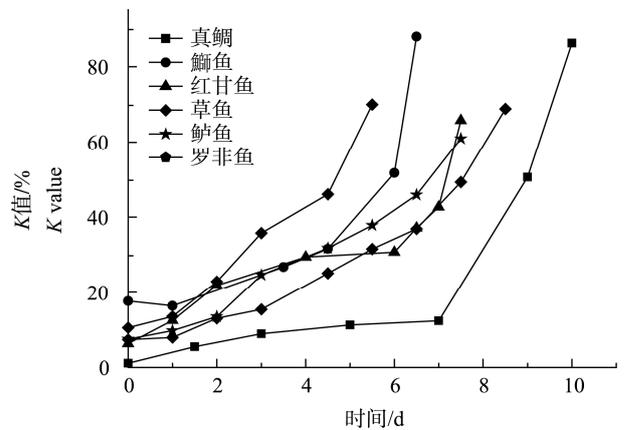


图 5 4~5 条件下 K 值变化

Fig. 5 Changes of K value in condition of 4~5

3.3 挥发性盐基氮水平变化

与 K 值变化规律一样, 鱼类在贮藏期间的 TVB-N 水平随着时间的延长而增大。以 4~5 °C 冷藏条件下不同鱼类的 TVB-N 变化情况为例(见表 1)。根据 GB 2733 的规定, TVB-N 的限量标准: 淡水鱼、虾 20 mg/100 g, 海水鱼、虾 30 mg/100 g。因此真鲷、红甘鱼、草鱼、罗非鱼贮藏时间分别 9 d、7.5 d、7 d 和 2 d, 与 K 值测定结果基本一致; 而鲫鱼在第 6.5 d 时, TVB-N 为 16.7 mg/100g, 鲈鱼在第 7.5 d, TVB-N 为 12.6 mg/100g, 这两种鱼肉的新鲜程度评价级别应为新鲜鱼。然而根据样品性状及味道判断, 此时鱼肉已经进入初期腐败。这与 K 值的测定结果及感官检验结果并不一致, 这可能是氨及胺类物质的挥发性随低温保藏时间的延长造成部分损失引起的^[17]。可见, TVB-N 指标不能正确地反映在低温条件下鱼体本身鲜度变化的过程。

4 结 论

本文以不同品种的淡水鱼、海水鱼为研究对象, 测定了鱼肉在不同贮藏条件下的鲜度指标 K 值和 TVB-N 水平的变化, 对其鲜度进行评价。随着贮藏时间的延长, K 值和 TVB-N 均呈上升趋势, 温度降低, 鲜度下降速度减缓。在 28~30 °C 条件下只能贮藏数小时, 4~5 °C 条件下可延长到至少 5 d, -2~0 °C 条件下贮藏时间大于 15 d。TVB-N 水平与 K 值之间具有较好的相关性, 但 TVB-N 水平变化与细菌代谢有关, 不能准确反映鱼体死后从僵硬到自溶阶段的新鲜程度。因此, 用 K 值作为鲜度指标更科学, 而且方法简单, 技术体系较为完善, 适合于判定鱼类在贮藏过程中的鲜度变化情况。

参考文献

- [1] Cheng JH, Sun DW, Zeng XA, *et al.* Recent advances in methods and techniques for freshness quality determination and evaluation of fish and fish fillets: A review [J]. DOI: 10.1080/10408398.2013.769934, 2013
- [2] 肖枫, 康怀彬, 辛利. 鲫鱼在冷藏过程中的鲜度变化[J]. 食品科学, 2007, 28(07): 508–511.
Xiao F, Kang HB, Xin L. Freshness variation of crucian carp (*carassius auratus*) during chilled storage [J]. Food Sci, 2007, 28(07): 508–511.
- [3] 姚燕佳, 张进杰, 顾伟钢, 等. 不同储藏温度对鲢鱼鲜度品质的影响[J]. 浙江大学学报, 2011, 37(2): 212–218.
Yao YJ, Zhang JJ, Gu WG, *et al.* Effect of storage temperature on freshness of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. J Zhejiang Univ, 2011, 37(2): 212–218.
- [4] 张钟若, 冯媛, 骆肇堯, 等. 几种淡水养殖鱼鲜度变化的特点[J]. 水产学报, 1994, 18 (1): 272–277.
Zhang ZX, Feng Y, Luo ZY, *et al.* Characteristics of freshness reduction in cultured fresh water fish [J]. J Fish Chin, 1994, 18 (1): 272–277.
- [5] 李学英, 许钟, 郭全友, 等. 大黄鱼冷藏过程中的鲜度变化[J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 442–450.
Li XY, Xu Z, Guo QY, *et al.* Changes of freshness in cultured *Pseudosciaena crocea* during chilled storage [J]. J Fish Sci Chin, 2009, 16(3): 442–450.
- [6] 关志苗. K 值-判定鱼品鲜度的新指标[J]. 水产科学, 1995, 14(1): 33–35.
Guan ZM. K value-The freshness quality index of fishes [J]. Fish Sci, 1995, 14(1): 33–35.
- [7] 杨文鸽, 薛长湖, 徐大伦, 等. 大黄鱼冰藏期间 ATP 关联物含量变化及其鲜度评价[J]. 农业工程学报, 2007, 23(6): 217–222.
Yang WG, Xue CH, Xu DL, *et al.* Changes of ATP—related compounds contents and freshness evaluation of *Pseudosciaena crocea* meat during iced storage [J]. Tran CSAE, 2007, 23(6): 217–222.
- [8] Saito T, Arai K, Matsugoshi M. A new method for estimating the freshness of fish [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1959, 24(9): 749–750.
- [9] Kuda T, Fujita M, Goto H, *et al.* Effects of retort conditions on ATP-related compounds in pouched fish muscle [J]. LWT, 2008, 41: 469–473
- [10] 励建荣, 李婷婷, 李学鹏. 水产品鲜度品质评价方法研究进展[J]. 北京工商大学学报, 2010, 28(6): 1–8.
Li JR, Li TT, Li XP. Advances in methods for evaluating freshness of aquatic products [J]. J Beijing Tech Bus Univ, 2010, 28(6): 1–8.
- [11] 邱伟强, 陈刚, 陈舜胜, 等. 离子对反相高效液相色谱法同时检测水产品中 6 种 ATP 关联化合物[J]. 水产学报, 2011, 35(11): 1745–1752.
Qiu WQ, Chen G, Chen SS, *et al.* Simultaneous determination of six ATP-related compounds in aquatic product using IP-RPLC [J]. J Fish Chin, 2011, 35(11): 1745–1752.
- [12] Va'zquez-Ortiz FA, Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sanchez ME, *et al.* Application of the freshness quality index (K value) for fresh fish to canned sardines from northwestern Mexico [J]. J Food Com Ana, 1997, 10, 158–165.

- [13] Veciana-Nogues MT, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC. Determination of ATP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC [J]. *Food Chem*, 1997, 59(3): 467-472.
- [14] 奚春蕊, 包海蓉, 刘琴, 等. 基于金枪鱼 K 值变化的 MTT 快速传感器的研究及响应面设计 [J]. *食品工业科技*, 2013, 12: 131-136.
- Xi CR, Bao HR, Liu Q, *et al.* Study on MTT rapid sensor and response surface design based on change of K value of Tuna [J]. *Sci Tech Food Indus*, 2013, 12: 131-136.
- [15] 陶志华, 佐藤实. 滤纸电泳分析检测鱼的鲜度 K 值 [J]. *现代食品科技*, 2013, 10: 2509-2511.
- Tao ZH, Sato M. Determination of K value for fish freshness by filter paper electrophoresis [J]. *Mod Food Sci Tech*, 2013, 10: 2509-2511.
- [16] 黄星奕, 姚丽娅, 韩方凯, 等. 基于可视化嗅觉技术的鲢鱼 K 值快速无损检测研究 [J]. *现代食品科技*, 2014, 30(6): 233-237.
- Huang XY, Yao LY, Han FK, *et al.* Rapid non-destructive testing of K values of silver carps based on the olfactory visualization technique [J]. *Mod Food Sci Tech*, 2014, 30(6): 233-237.
- [17] 陆剑锋, 林琳, 叶应旺, 等. 斑点叉尾鲷在不同保藏温度下的鲜度变化 [J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(5): 187-191.
- Lu JF, Lin L, Ye YW, *et al.* The freshness variation of channel catfish (*ictalurus punctatus*) during storage at different temperatures [J]. *Food Res Devel*, 2012, 33(5): 187-191.
- [18] 陆利霞, 李霞, 孙荟, 等. 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.
- Lu LX, Li X, Sun H, *et al.* Study on the physical characteristics in freshness assessment of the stored crucian (*Carassius auratus*) [J]. *Food Ferm Ind*, 2007, 33(5): 162-165.
- [19] GB 2733-2005 鲜、冻动物性水产品卫生标准 [S].
- GB 2733-2005 Hygienic standard for fresh and frozen marine products of animal origin [S].
- [20] GB/T 5009.44-2003 水产品中挥发性盐基氮的测定 [S].
- GB/T 5009.44-2003 Method for analysis of hygienic standard of aquatic product [S].

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



汤水粉, 工程师, 主要研究方向为水产品质量安全。

E-mail: powder2005@126.com