

蛋白质组学技术研究凡纳滨对虾冰藏期间肌肉蛋白的变化

郑鸯鸯¹, 吉薇¹, 吉宏武^{*1,2,3,4}, 苏伟明^{1,2,3}, 刘书成^{1,2,3,4}

(1. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东 湛江 524088; 3. 广东省海洋食品工程技术研究中心, 广东 湛江 524088; 4. 水产品深加工广东省普通高校重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 凡纳滨对虾是中国主要的对虾品种, 深受消费者的欢迎, 但对虾在运输销售过程中极易发生组织软化、肌肉自溶。为了揭示凡纳滨对虾在冰藏过程中的肌肉蛋白的变化规律, 筛选出其鲜度的指示蛋白, 作者将新鲜凡纳滨对虾依次冰藏 0、2、4、6、8 d, 采用蛋白质组学技术研究冰藏期间肌肉蛋白的变化。实验结果表明, 肌球蛋白重链 1 和腺苷酸脱氨酶在冰藏期间生成的降解产物为差异蛋白 I19 和 I14, 两者的灰度值均随冰藏时间呈上升趋势。其中, 差异蛋白肌球蛋白重链 1 的灰度值变化与冰藏时间呈良好的线性正相关, 决定系数 R^2 为 0.920; 差异蛋白腺苷酸脱氨酶的灰度值与时间用二次多项式回归拟合效果较好, 决定系数 R^2 达到 0.986。因此, 肌球蛋白重链 1 和腺苷酸脱氨酶对凡纳滨对虾新鲜度具有指示作用, 有望成为对虾冰藏期间的新鲜度指示蛋白。

关键词: 蛋白质组学; 凡纳滨对虾; 冰藏; 肌肉蛋白

中图分类号: TS 254.4 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.01.14

Proteomics of Muscle Protein Changes of *Litopenaeus vannamei* During Iced Storage

ZHENG Yangyang¹, JI Wei¹, JI Hongwu^{*1,2,3,4}, SU Weiming^{1,2,3}, LIU Shucheng^{1,2,3,4}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Zhanjiang 524088, China; 3. Guangdong Engineering Research Center of Seafood; 4. Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: *Litopenaeus vannamei* is the main shrimp species in our country and popular among consumers. But the shrimp is prone to rapid postmortem quality loss during transportation and circulation, which will reduce its market price. In order to reveal the change rule of *Litopenaeus*

收稿日期: 2016-09-19

基金项目: 中国现代农业产业技术体系基金项目(CARS-47); 广东省产学研合作项目(2013B090600155); 广东海洋大学创新强校项目(GDOU2014050203, GDOU2013050314)。

* 通信作者: 吉宏武(1962—), 男, 博士, 教授, 主要从事水产品高值化加工与利用研究。E-mail: jihw62318@163.com

引用本文: 郑鸯鸯, 吉薇, 吉宏武, 等. 蛋白质组学技术研究凡纳滨对虾冰藏期间肌肉蛋白的变化[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(01): 93-99.

vannamei muscle protein and screen out the protein indicator of freshness, proteomics technologies were used to study the changes in muscle protein during 0, 2, 4, 6, 8 days of postmortem storage. Results shown that differentially expressed protein spots I19 and I14 were generation of degradation products of myosin heavy chain type 1 and adenosine monophosphate deaminase, whose gray value were both on the rise over the storage time. The gray value of myosin heavy chain type 1 shown a good linear positive correlation with iced storage time and its correlation coefficient R^2 of 0.920. The gray value of adenosine monophosphate deaminase shown a good quadratic polynomial regression and its correlation coefficient R^2 of 0.986. Therefore, myosin heavy chain type 1 and adenosine monophosphate deaminase could indicate the freshness of *Litopenaeus vannamei* and they could be protein indicators of freshness.

Keywords: proteomics, *Litopenaeus vannamei*, iced storage, muscle protein

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 属于对虾科、滨对虾属^[1], 是中国主要的对虾品种, 也是我国出口对虾的主要品种^[2], 深受消费者的欢迎。但是凡纳滨对虾水分含量高, 内源酶种类丰富, 运输销售过程中极易出现肌肉自溶、组织软化等问题, 致使品质下降、贮藏时间缩短而影响其商业价值。文献报道指出, 内源酶和微生物作用引起的肌原纤维蛋白等细胞骨架成分的蛋白质降解是水产品肌肉软化、腐败变质的主要原因^[3-6]。

澳大利亚学者 Wilkins 和 Williams 早在 1994 年最先提出了“蛋白质组”这个概念^[7], 定义为一个基因组表达的所有蛋白质。蛋白质组研究的是不同时间和空间上发挥功能的特定蛋白质群体, 目的是要从蛋白质水平上探索蛋白质的作用方式、调控机制、功能机理以及蛋白质群体内的相互作用^[8]。蛋白质组数据库是生物信息学的重要信息来源, 通过这些已建数据库展开蛋白质的生物信息学分析能够提供各种生理机制过程中参与决定肌肉品质的蛋白质结构和功能等方面的信息^[9]。近年来, 蛋白质组学已被广泛应用到水产品的研究中。早期蛋白质组学对水产品的研究主要集中在分类学上, 随后蛋白质组学又逐步成为了解免疫应答机制的一种手段, 如 Jiang H 等^[10]利用比较蛋白质组学从中国对虾肝胰脏中鉴定出 33 种能够承受低氧环境的蛋白、Silvestre F 等^[11]指出抗生素对斑节对虾血淋巴蛋白表达的影响会被外部养殖条件所误导。对于大西洋三文鱼、鳟鱼、鲢鱼、鳙鱼等这些具有重要商业价值的鱼种, 目前研究内容主要涉及鱼类病原体或致敏蛋白、筛选表征新鲜度和品质的标记物、营养价值^[12]。Lanfen

Fan 等^[13]利用蛋白质组学技术研究了对照组和处理组凡纳滨对虾血细胞中的冷应激蛋白, 结果表明血蓝蛋白在凡纳滨对虾对环境的调节机制中起重要作用。张帅^[14]优化了凡纳对虾肌肉双向电泳体系, 采用质谱鉴定出了精氨酸激酶、肌动蛋白 T2 和磷酸丙酮酸水合酶这 3 种差异蛋白能用作新鲜度指示蛋白。李婷婷^[15]筛选出 8 个能代表大黄鱼品质变化的差异蛋白质。李学鹏^[16]采用蛋白质组学技术研究中国对虾在冷藏过程中的肌肉蛋白质变化, 指出腺苷钴胺胺合成酶可作为新鲜度指示蛋白。此外, Verrez. Bagnis 等^[17]利用单向和双向电泳探索黑鲈在保藏期间肌肉蛋白质变化情况, 最后提出了潜在鱼肉新鲜度指示蛋白, Capillas 和 Moral 指出鹅肌肽可以作为冰藏鳕鱼的新鲜度指示物。

蛋白质组学研究可以应用到水产品新鲜度的评价上, 虽然目前有关于凡纳滨对虾蛋白质组学的研究, 但是对 0℃冰藏这一更接近实际流通过程对虾保藏温度的研究鲜有报道。为此, 作者以凡纳滨对虾为原料, 以 0℃作为贮藏温度, 把蛋白质组学技术应用到凡纳滨对虾冰藏期间肌肉蛋白的变化, 旨在寻找能代表新鲜度的指示蛋白, 以期探索出凡纳滨对虾肌肉蛋白质的降解情况与其品质性状之间的相关性信息。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

干胶条 (24 cm, pH 4-7): BIORAD 公司产品; 蛋白酶抑制剂 PMSF、二硫苏糖醇 (DTT)、二硫苏糖醇 (DTT)、甘氨酸、甘油、N,N-二甲基丙烯酰胺

(Acylamide):Amresco 公司产品;胎牛血清标准品 BSA、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(N,N'-methylenebisacrylamide)、碳酸氢铵,Sigma 公司产品;IPG Buffer(pH4-7)、水化盘、覆盖油:GE 公司产品;过硫酸铵、四甲基乙二胺(TEMED)、碘乙酰胺(IAA)、硫脲(Thiourea)、脲(Urea),购于 Amersham;胰酶、三氟乙酸、低熔点琼脂糖:Promega 公司产品;普通琼脂糖公司产品 Gene tech companylimited 公司产品;甲醇、乙腈:Fisher 公司产品;HCCA:ABI 公司产品;丙酮:Baker 公司产品。

1.2 仪器与设备

MALDI-TOF-TOF 质谱仪:德国布鲁克(Bruker Dalton)Autoflex speed™ 公司产品;等电聚焦仪:GE ETTAN IPGPHOR3 公司产品;垂直电泳槽:GE ETTAN DALTsix 公司产品;超声仪:宁波新芝生物科技股份有限公司产品。

1.3 样品预处理

用蒸馏水将鲜活的凡纳滨对虾清洗后立即冰粹致死。置于 0℃冰箱中冰藏,取样时间依次为 0、2、4、6、8、10 d。

1.4 双向电泳 (Two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)

用裂解液(20 mmol/L Tris、2 mol/L 硫脲、7 mol/L 尿素、2 g/dL CHAPs)溶解、提取凡纳滨对虾肌肉第二腹节组织中的蛋白,再用分光光度计进行蛋白质定量。干胶条泡胀后进行一向等电聚焦,程序参数设置如表 1 所示。等电聚焦结束后,采用 12.5 g/dL 的二向胶进行丙烯酰胺凝胶电泳,参数设置如表 2 所示。

表 1 等电聚焦程序参数设置

Table 1 Setting of IEF parameters

步骤	电压/V	升压模式	t/h	作用
S1	300	恒压	0.25	除盐
S2	500	恒压	1	除盐
S3	1 000	线性	1	升压
S4	10 000	线性	3	升压
S5	10 000	恒压	4	聚焦

表 2 二向 SDS-PAGE 电泳参数设置

Table 2 Setting of SDS-PAGE parameters

步骤	功率/W	t/h	作用
S1	2	0.75	浓缩
S2	17	4	分离

1.5 染色

本实验所用分析胶采用银染法,主要包括固定、敏化、漂洗、银染、漂洗、显色、终止和漂洗。银染的分析胶上样量一般为 120 μg。作者所用质谱胶采用考马斯亮蓝染色法,以质量分数 0.12% G-250、质量分数 10% (NH₄)₂SO₄ 和体积分数 20% 甲醇为染色液。主要包括固定、漂洗、染色和终止。考染的质谱胶上样量一般为 1 200 μg。

1.6 图像扫描和分析

染色完的凝胶当天扫描,采用 Image Master 2D platinum 5.0(GE)专业图像分析软件读取分析二维图像数据。两组 2-DE 图谱中同一蛋白点的灰度值之比>1.5,且 t-test 检验 $p<0.05$,才可判断为差异蛋白点。当一组 2-DE 图谱中蛋白点灰度值高于另一组图谱中同一蛋白点灰度值 1.5 倍时记为上调,灰度值低于 1.5 倍时则记为下调。

1.7 质谱检测

利用德国布鲁克(Bruker Dalton)Autoflex speed™ MALDI-TOF-TOF 质谱仪进行质谱分析。参数设置:UV 波长为 355 nm,重复速率为 200 Hz,加速电压为 20 000 V,最优质量分辨率为 1 500。扫描质量范围为 700~3 200,收集信号。

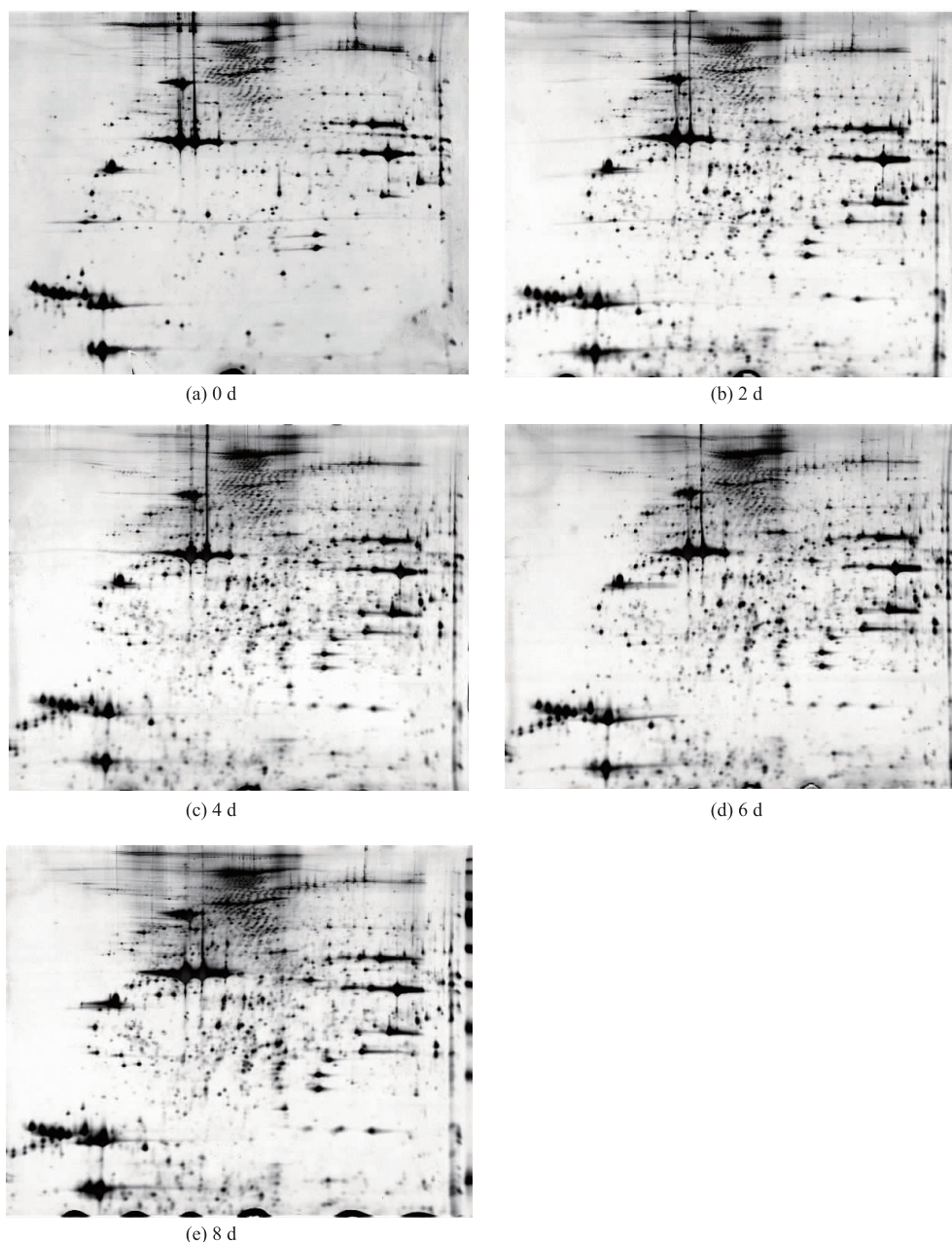
数据库检索:利用软件 flexAnalysis (Bruker Dalton)过滤基线峰、识别信号峰。采用 BioTools (Bruker Dalton)软件进行 NCBI 数据库搜索,寻找相关的匹配蛋白质。

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾不同冰藏时间点肌肉蛋白质的 2-DE 图谱

采用 24 cm pH4-7 IPG 胶条,分析胶采用银染法,蛋白上样量为 120 μg,进行等电聚焦。采用 12.5 g/dL 的二向胶对提取后的不同冰藏(0℃)时间的凡纳滨对虾肌肉蛋白进行 2-DE 分离,银染后获得清晰度和分辨率较高的蛋白质分离图谱,如图 1 所示。

对不同冰藏时间的肌肉蛋白质 2-DE 图谱依次进行两两比对。2 d 与 0 d 对比的 2-DE 图谱中差异蛋白共有 200 个,4 d 与 0 d 对比的差异蛋白共有 190 个,6 d 与 0 d 对比的差异蛋白共有 171 个,8 d 与 0 d 对比的差异蛋白共有 167 个。再对上述所有差异斑点进行多重比对,筛选得到 2-DE 图谱上相



注: 每张图谱一向等电聚焦的 pH 范围从左到右为 4~7, 蛋白质标准品相对分子质量范围 $1.5 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^5$ 。

图 1 不同冰藏时间下凡纳滨对虾肌肉蛋白质的双向电泳图谱

Fig. 1 2-DE gels of muscle protein of *Litopenaeus vannamei* during iced storage

同位置的重复点所对应的差异斑点 17 个, 依次挖取相应的斑点进行 MALDI-TOF-TOF 鉴定。

2.2 凡纳滨对虾冰藏期间差异蛋白的鉴定与分析

在 17 个筛选到差异斑点中, 12 个蛋白斑点得到了成功的鉴定。在成功鉴定的蛋白斑点中, 肌原纤维蛋白占的最多, 占了 1/2 以上, 包括肌球蛋白、肌动蛋白和肌钙蛋白。肌球蛋白和肌动蛋白属于结

构蛋白, 分别构成了肌原纤维蛋白的粗丝和细丝; 肌钙蛋白是肌肉的主要调节蛋白质, 直接参与钙所控制的肌肉收缩, 占肌原纤维蛋白的 5%。酶占了 1/4, 另外还成功鉴定出了唐氏综合症细胞粘附分子和血淋巴凝固蛋白, 结果如表 3 所示。

从表 3 可以看出, 一些不同的蛋白点, 如斑点 I19 和 J02、斑点 I62 和 J29、I72 和 J16 被鉴定为相

表 3 差异蛋白点 NCBI 数据库检索结果
Table 3 NCBI search results of differentially expressed protein spots

斑点编号	同源蛋白	蛋白登录号	相对分子质量	蛋白得分
I19	肌球蛋白重链 1	K4Q111_LITVA	221 173	223
I14	腺苷酸脱氨酶	A0A0M3R829_LITVA	91 874	13
I62	肌动蛋白 T2	Q6DTY3_LITVA	42 126	246
I75	精氨酸激酶	B0FRF9_LITVA	40 428	430
I72	肌球蛋白重链 2	K4Q2S1_LITVA	220 311	230
I170	唐氏综合症细胞粘附分子	D1KF55_LITVA	176 440	30
J64	肌钙蛋白 I	K7WDK6_LITVA	22 882	186
J02	肌球蛋白重链 1	K4Q111_LITVA	221 173	424
J16	肌球蛋白重链 2	K4Q2S1_LITVA	220 311	28
J63	超氧化物歧化酶	Q2VMZ2_LITVA	31 567	389
J29	肌动蛋白 T2	Q6DTY3_LITVA	42 126	121
J59	血淋巴凝固蛋白	A8DR94_LITVA	189 371	11

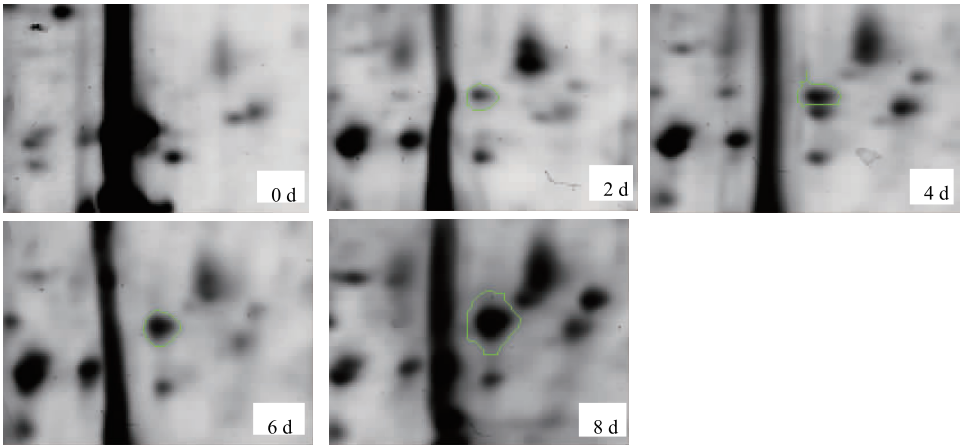
同的蛋白,这可能是由于蛋白异构体的存在和翻译后修饰所致^[18]。

为进一步筛选出随冰藏时间具有规律性变化的差异蛋白,对上述成功鉴定出的差异蛋白进行灰度值和灰度值差异倍数的分析。结果显示,初步筛选出 3 个随冰藏时间具有规律性变化的差异蛋白,分别为差异蛋白 I19、I14、I75。

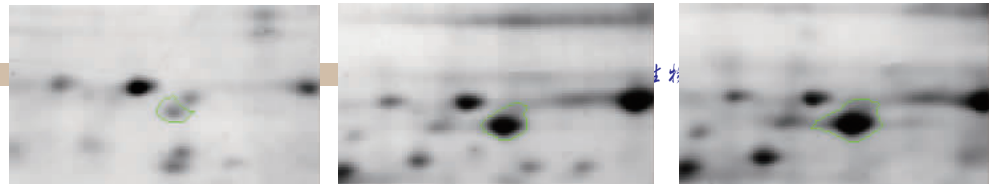
如图 2 所示,差异蛋白点 I19 和 I14 的灰度值均随冰藏时间呈持续上升趋势,且这 2 个差异蛋白点最先的灰度值很小基本为零,说明差异蛋白 I19 和 I14 是凡纳滨对虾肌肉中固有的蛋白或酶的降解产物,这与质谱鉴定结果一致,这 2 个差异蛋白依次为肌球蛋白重链 1 和腺苷酸脱氨酶。随冰藏时间越久,肌球蛋白重链 1 和腺苷酸脱氨酶产生的降解产物越多,因此这些差异蛋白点灰度值也随之升

高。而差异蛋白点 I75 为精氨酸激酶,在冰藏前期灰度值也一直上升,但到冰藏末期 8 d 时精氨酸激酶的降解产物本身也发生了降解,因此最后 I75 灰度值开始下降。无脊椎动物的精氨酸激酶与脊椎动物中的肌酸激酶类似,它属于磷酸激酶,参与细胞代谢。它将 ATP 上的磷酸基团转移给精氨酸,生成磷酸精氨酸和 ADP,这在无脊椎动物的能量代谢中有着重要作用。

凡纳滨对虾虾肉水分含量较高,同时富含蛋白质,肌肉组织较松软,主要由肌原纤维蛋白组成^[19],其中肌球蛋白是肌原纤维蛋白的重要组成成分,构成了肌原纤维蛋白的粗丝。肌球蛋白由 2 条重链和 4 条轻链组成,肌球蛋白重链 1(MHC1,I19)是肌球蛋白的其中一条重链。因此,凡纳滨对虾MHC1 的降解会造成肌肉组织结构的崩塌和肌肉的软化,致使



(a) 斑点I19



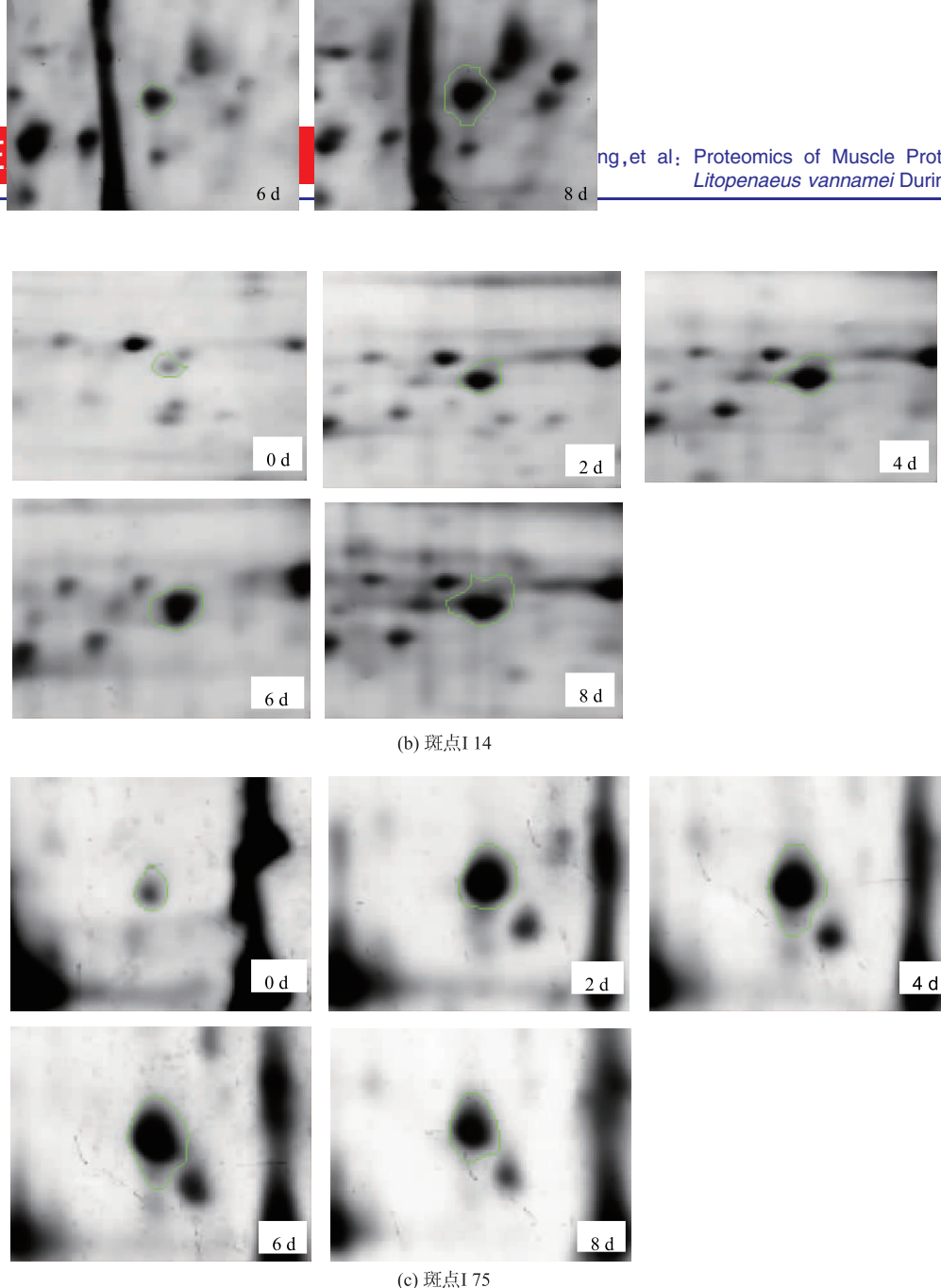


图2 凡纳滨对虾冰藏期间差异蛋白的局部放大2-DE图谱

Fig. 2 Local amplification of differentially expressed protein spots in the 2-DE maps of *Litopenaeus vannamei* during different storage times

对虾品质下降。对虾死后肌肉发生的第一个变化是内源酶活性引起的肌肉蛋白和结缔组织的降解^[20-22], 另外有文献报导指出蛋白酶水解活动能降解海鲱鱼和大西洋鳕鱼提取物中的肌球蛋白重链^[23-24]。

凡纳滨对虾在冰藏期间 MHC1 在冰藏期间被逐渐降解,降解产物的灰度值呈上升趋势。为寻找差异蛋白在冰藏期间的变化规律,对灰度值进行线性回归,结果表明差异蛋白点 I19 即 MHC1 的灰度值变化与冰藏时间呈良好的线性正相关,决定系数 R^2 为 0.920。差异蛋白 I14 腺苷酸脱氨酶是嘌呤核苷代谢中重要的酶类,它与冰藏时间用二次多项式回归拟合效果较好,决定系数 R^2 达到 0.986,而差异

蛋白点 I75 精氨酸激酶相关性较差。不同的虾类品种在不同的贮藏条件下,虾肉的蛋白质将会发生不同的变化。李学鹏^[16]在研究中国对虾 4℃ 和 -2℃ 冷藏过程中的肌肉蛋白质变化时,鉴定出的差异蛋白腺苷钴啉胺合成酶,它的灰度变化与冷藏时间有良好的线性关系,可以作为新鲜度指示蛋白。

3 结 语

作者通过蛋白组学技术研究了冰藏期间凡纳滨对虾肌肉蛋白的变化规律,实验结果表明,肌球蛋白重链 1 和腺苷酸脱氨酶在冰藏期间生成的降解产物为差异蛋白 I19 和 I14,两者的灰度值均随冰

藏时间呈上升趋势。其中,差异蛋白肌球蛋白重链 1 的灰度值变化与冰藏时间呈良好的线性正相关,腺苷酸脱氢酶的灰度值与时间用二次多项式回归拟

合效果较好。因此,肌球蛋白重链 1 和腺苷酸脱氢酶均对凡纳滨对虾新鲜度具有指示作用,有望成为新鲜度的指示蛋白。

参考文献:

- [1] 王克行. 虾类健康养殖原理与技术[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [2] BIAN Tao,ZHAO Yan,ZHANG Hong. Studies on quality changes of *Litopenaeus vannamei* under different refrigeration conditions[J]. **Aquatic Science**,2008,28(9):493-496.(in Chinese)
- [3] EZQUERRA BRAUER J M,SALAZAR LEYVA J A,BRINGAS ALVARADO L,et al. Effect of dietary protein on muscle collagen,collagenase and shear force of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. **European Food Research and Technology**,2003,217(4):277-280.
- [4] SRIKET C,BENJAKUL C,VISSANGUAN W et al. Low molecular weight trypsin from hepatopancreas of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*):Characteristics and biochemical properties[J]. **Food Chemistry**,2003,134(1):351-358.
- [5] SRIKET C,BENJAKUL S,VISSANGUAN W,et al. Collagenolytic serine protease in fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*):characteristics and its impact on muscle during iced storage[J]. **Food Chemistry**,2011b,124(1):29-35.
- [6] CHEN Shiyang,JI Hongwu,LI Chengyong. Degradation of myofibrillar protein by endogenous protease from *Litopenaeus vannamei*[J]. **Food Industry Science and Technology**,2015,36(5):149-155.(in Chinese)
- [7] WASINGER V C,CORDWELL S J,CERPA-POLJAK A,et al. Progress with gene product mapping of the molluscs: mycoplasma genitalium[J]. **Electrophoresis**,1995,16:1090.
- [8] CHENG Haiping,QIAN Xiaohong. Technological systems and advances in proteomics research [J]. **Advances in Biochemistry and Biophysics**,2000,27(6):584-588.(in Chinese)
- [9] YANG Lifu. Technology and prospect of proteomics research[J]. **Tropical Agricultural Science**,2007,27(2):58-62.(in Chinese)
- [10] JIANG H,LI F,XIE Y,et al. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress[J]. **Proteomics**,2009,9:3353-3367.
- [11] SILVESTRE F,HUYNH TT,BERNARD A,et al. A differential proteomic approach to assess the effects of chemotherapeutics and production management strategy on giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics**,2010,5:227-233.
- [12] IGNASI FORNÉ,JOAQUIN ABIÁN and CERDÁ. Fish proteome analysis:Model organisms and nonsequenced species [J]. **Proteomics**,2010,10:858-872.
- [13] FAN L,WANG A L,WU Y X. Comparative proteomic identification of the hemocyte response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. **Proteomics**,2013(80):196-206.
- [14] 张帅. 凡纳滨对虾 4℃冷藏条件下新鲜度表征蛋白的研究[D]. 杭州:浙江工商大学,2013.
- [15] 李婷婷. 大黄鱼保鲜技术及新鲜度指示蛋白研究[D]. 杭州:浙江工商大学,2013.
- [16] 李学鹏. 中国对虾冷藏过程中品质评价及新鲜度指示蛋白研究[D]. 杭州:浙江工商大学,2011.
- [17] VERREZ B V,LADRAT C,MORZEL,et al. Protein changes in post mortem sea bass(*Dicentrarchus labrax*) muscle monitored by one—and two-dimensional gel electrophoresis[J]. **Electrophoresis**,2001,22(8):1539-1544.
- [18] 蒋昊. 中国明对虾在胁迫条件下肝胰腺的差异蛋白质组学研究[D]. 北京:中国科学院海洋研究所,2009.
- [19] LI Jiao,LI Xuepeng,LI Jianrong,et al. Biochemical characteristics of muscle protein of *Penaeus chinensis* under cold storage[J]. **Food Science**,2011,32(5):16-21.(in Chinese)
- [20] AYALA M D,ABDEL I,SANTAELLA M,et al. Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream during post-mortem storage[J]. **LWT—Food Science and Technology**,2010(5):465-475.
- [21] DELBARRE-LADRAT C,CHERET R,TAYLOR R,et al. Trends in postmortem aging in fish:understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,2006,46:409-421.
- [22] TAYLOR R G,FJAERA S O,SKJERVOLD P O. Salmon fillet texture is determined by myofiber-myofiber and myofiber-myocommata attachment[J]. **Journal of Food Science**,2002,67:2067-2071.
- [23] FELBERG H S,SLIZYTE R,MOZURAITYTE R,et al. Proteolytic activities of ventral muscle and intestinal content of North Sea herring(*Clupea harengus*) with full and emptied stomachs[J]. **Food Chemistry**,2009,116:40-46.
- [24] WANG P A,MARTINEZ I,OLSEN R L. Myosin heavy chain degradation during post mortem storage of Atlantic cod (*Gadus morhua* L)[J]. **Food Chemistry**,2009,115:1228-1233.