

南美白对虾微冻贮藏期间蛋白质品质变化及预测模型的建立

孙康婷^{1,2}, 陈胜军^{2,3,4*}, 潘创², 胡晓², 邓建朝², 李春生²

¹ 广东海洋大学食品科技学院 广东湛江 524088

² 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
国家水产品加工技术研发中心 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 572000

⁴ 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 以南美白对虾为原料,研究微冻条件(-3℃)下不同贮藏时间其肌肉蛋白质品质特性的变化,利用相关蛋白质指标建立径向基函数神经预测模型。结果表明:与新鲜虾样品相比,在微冻贮藏 30 d 后,表面疏水性、羧基含量、TCA 溶解肽、肌原纤维小片化指数、疏水相互作用力、二硫键含量分别显著上升到(68.12±0.19)μg,(2.02±0.08)nmol/mg pro,(6.29±0.14)μmol 酪氨酸/g 肌肉,55.11±2.79,(7.82±0.17)mg/mL,(5.77±0.06)mg/mL;Ca²⁺-ATPase、总巯基含量、离子键、氢键含量、内源荧光强度分别显著下降到(0.13±0.13)U/mg pro,(68.45±0.47)μmol/g pro,(3.12±0.48)mg/mL,(1.67±0.14)mg/mL,579.71±20.67,使虾肌肉蛋白质发生不同程度的变性、氧化和降解,蛋白质的三级结构发生变化。电泳结果表明,贮藏时间延长,大分子质量蛋白质发生降解。建立的径向基函数神经预测模型的预测值和试验值之间的误差均在±10%内,表明该模型可以较好地预测微冻贮藏过程中南美白对虾肌肉蛋白质品质的变化。

关键词 南美白对虾;微冻;蛋白质品质变化;径向基函数神经预测模型

文章编号 1009-7848(2023)07-0317-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.032

南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)是世界上养殖最广泛的甲壳类动物之一。最早捕获于太平洋,目前作为经济上重要的甲壳类资源,在亚洲和南美洲国家进行商业养殖^[1]。南美白对虾营养丰富,蛋白含量高,在运输和流通过程中品质极易劣变,蛋白质发生不同程度的氧化、降解和变性。随着居民生活水平的提高,水产品的安全和营养备受关注。如何在流通过程中行之有效地维持水产品品质较为关键。温度控制是流通过程中的一个关键控制点,低温储藏常被用于提高水产品的货架期^[2]。目前低温保鲜技术根据温度的不同分为冷藏、冰温、微冻和冻藏^[3]。近年来的研究表明微冻能显著延长水产品的保鲜期,约比冷藏保鲜延长 1.5~4 倍,尤其对耐冻性较差的水产品的保鲜效果

更为显著^[4-5]。Ge 等^[4]采用-5℃微冻结合明胶包埋哈氏仿对虾(*Parapenaeopsis hardwickii*),研究发现,该保藏方法可有效抑制 Ca²⁺-ATPase 活力,降低 pH、TVB-N 和 TBA 值,使保藏期限达到 23 d。刘欢等^[6]发现,与冰藏(0℃)相比,微冻(-2℃)可较好地保持大鲵(*Andrias davidianus*)的肌肉品质。

目前,品质监测预测模型在水产品质量安全方面应用较为广泛^[7],如阿伦尼乌斯(Arrhenius)模型是这些产品最常用的方法,同时,径向基函数神经网络(Radial basis function neural network, RBFNN)模型也在水产品质量监测中得到广泛应用。Xu 等^[8]研究发现 RBFNN 模型是预测-28~-12℃冻藏大管鞭虾(*Solenocera melanthero*)整个贮藏期品质变化的有效工具,且 RBFNN 模型优于 Arrhenius 模型。Liu 等^[9]研究虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)鱼片在 9,6,3,0,-3℃贮藏过程中的菌落总数,电导率(EC)、K 值、感官评价的变化,并建立前馈人工神经网络(ANN),相对误差均低于 10%,可以作为虹鳟鱼质量变化建模的潜在工具。然而,目前鲜有微冻贮藏条件下南美白对虾肌肉蛋白质

收稿日期: 2022-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072147);中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助(2020TD69,2020TD73);海南省科技计划三亚崖州湾科技城联合项目(320LH037)

第一作者: 孙康婷,女,硕士生

通信作者: 陈胜军 E-mail: chenshengjun@scafi.ac.cn

品质变化和应用 RBFNN 预测品质变化的模型报道。本文以南美白对虾为研究对象,比较微冻(-3℃)贮藏条件下表面疏水性、Ca²⁺-ATPase、总巯基含量、羰基含量、TCA 溶解肽、肌原纤维小片化指数(Myofibril fragmentation index, MFI)、化学作用力(离子键、氢键、疏水相互作用力、二硫键)的变化,同时通过荧光分光光度计、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析蛋白变化,用已有的蛋白质变化数据建立 RBFNN 品质预测模型,旨在为南美白对虾蛋白质品质的预测提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

活体南美白对虾,广东省广州市华润万家超市,平均体质量为(13.0±0.1)g/尾。

微量总巯基测试盒、超微量 Ca²⁺ATPase 测试盒、羰基含量测试盒,南京建成生物工程研究所;NuPAGE™ Bis-Tris 预制胶(12%)、NuPAGE™ MOPS SDS 电泳缓冲液(20×),英潍捷基(上海)贸易有限公司;BeyoColor™ 彩色预染蛋白、5X 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;其它试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

T50 型均质机,德国 IKA 公司;Sigma-K30 台式高速冷冻离心机,德国 Sigma 公司;Sunrise 吸光酶标仪,瑞士 Tacan 公司;Cary Eclipse 荧光分光光度计,美国 VARIAN 公司;Mini Gel Tank PAGE 电泳系统,美国赛默飞科技公司;Image Scanner III 扫描仪,美国 EPSON 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品预处理 用碎冰使虾猝死,流水清洗后去除头部,吸干表面水分,将去头虾随机分成 7 组,自封袋密封,置于-3℃冰箱中冷藏。分别在 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 d 取出样品,解冻后测定以下各项指标。

1.3.2 肌原纤维蛋白的提取和测定 参照孟粉等^[7]的方法,提取肌原纤维蛋白。肌原纤维蛋白的含量用 Bradford 法测定。

1.3.3 肌原纤维表面疏水性的测定 参照 Chelh 等^[10]的方法,测定肌原纤维表面疏水性。

1.3.4 肌原纤维蛋白总巯基、羰基和 Ca²⁺ATPase 的测定 按照微量总巯基试剂盒、羰基试剂盒和 Ca²⁺ATPase 试剂盒说明书进行测定。

1.3.5 TCA 溶解肽的测定 参照张喜才^[11]和齐慧林^[12]的方法,测定 TCA 溶解肽。准确称取 3 g 搅碎后的虾肉,加入 9 倍体积的 5%三氯乙酸,冰浴(0℃)条件下充分匀浆 1 min,冰浴放置 1 h,在 4℃, 5 000×g 离心 5 min,取上清液 1 mL 加入 5 mL 混合液(A液:B液按照体积比 50:1 混合,现用现配。A液:10 g NaCO₃, 2 g NaOH, 0.5 g 酒石酸钾钠定容至 500 mL;B液:0.5 g CuSO₄·5H₂O 定容至 500 mL),反应 10 min,再加入 0.5 mL 的福林酚反应 30 min,在波长 680 nm 下测 OD 值。同时配制 30, 60, 90, 120, 150 μg/mL 质量浓度的酪氨酸标准溶液,绘制波长 680 nm 下酪氨酸的标准曲线。样品所测的 OD 值代入标准曲线可得到酪氨酸的含量,结果表示为每克肌肉中含有的酪氨酸的量(μmol 酪氨酸/g 肌肉)。

1.3.6 MFI 的测定 参照孙红霞等^[13]的方法,稍作修改。准确称取 1 g 搅碎后的虾肉,加入 15 倍体积预冷的 MFI 缓冲液(100 mmol/L KCl, 11.2 mmol/L K₂HPO₄, 8.8 mmol/L KH₂PO₄, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl₂),冰浴(0℃)条件下充分匀浆 1 min,过 200 目筛,在 2℃, 1 000×g 离心 15 min 后弃上清,于沉淀中加入 15 倍体积的 MFI 缓冲液,沉淀充分悬浮后相同条件下离心弃上清。沉淀用 2.5 mL 预冷的 MFI 缓冲液充分悬浮后,得肌原纤维蛋白悬浮液,调节蛋白质质量浓度至 0.5 mg/mL,在波长 562 nm 处用酶标仪测定吸光度,将所得结果乘以 200 即可得到 MFI 值。

1.3.7 分子作用力的测定 参考 Sun 等^[14]的方法,稍作修改。取 2 g 样品分别与 10 mL 的 SA (0.05 mol/L NaCl)、SB (0.6 mol/L NaCl)、SC (0.6 mol/L NaCl+1.5 mol/L 尿素)、SD (0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素)和 SE (0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素+1.5 mol/L β-巯基乙醇)混合,在 2 500 r/min 匀浆 5 min 后,于 4℃静置 1 h, 8 000 r/min 离心 10 min。用 Bradford 法测定蛋白质的含量,确定离子键(SB 和 SA 中溶解的蛋白质含量之差)、氢键(SC 和 SB 中溶解的蛋白质含量之差)、疏水相互作用力(SD 和 SC 中溶解的蛋白质含量之差)、二硫键

(SE 和 SD 中溶解的蛋白质含量之差)含量。

1.3.8 内源荧光强度的测定 参照石径^[15]的方法,稍作修改。用 Tris-maleate 缓冲溶液(0.6 mol/L KCl-0.02 mol/L Tris-maleate, pH 7.0)将肌原纤维蛋白溶液质量浓度调整至 1 mg/mL,在激发波长 295 nm,发射波长 310~400 nm 扫描范围,1 200 nm/min 扫描速度,5 nm 激发和发射狭缝宽度的条件下测定内源荧光强度图谱。

1.3.9 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 参照 Pan 等^[16]的方法,将肌原纤维蛋白溶液与上样缓冲液(5×)按照 3:1(V/V)比例混合后,沸水加热 5 min。用 12%的预制凝胶在 Mini Gel Tank PAGE 系统进行 SDS-PAGE 分析。上样量统一为 10 μg,加入胶孔中,以 100 V 的恒压电泳 70 min。电泳结束后取下凝胶,考马斯亮蓝试剂盒进行染色和脱色,使用 Image Scanner III 扫描仪扫描电泳条带。条带的分子质量通过与蛋白分子质量 Marker(6.5~270 ku)进行比较确定。

1.3.10 径向基函数神经网络(RBFNN)预测模型的建立 RBFNN 是一种线性良好的前向网络,具有最佳逼近、训练简洁、学习收敛速度快以及克服局部最小值问题的性能。RBF 神经网络由输入层、隐藏层、输出层构成。RBFNN 预测模型采用 SPSS Statistics 19 构建^[17],选择贮藏时间为因子,蛋白质品质特性指标为因变量,其余参数为系统默认值进行分析。

1.3.11 径向基函数神经网络(RBFNN)预测模型的验证 采用模型预测值与试验值进行比较,以验证预测模型的准确性。采用均方误差(Mean squared error, MSE),决定系数(R-Square, R^2),相对误差(%)来评估模型的预测精度。

1.4 数据分析

每组试验重复 3 次,使用 SPSS Statistics 19 对数据进行单因素方差分析和差异显著性($P < 0.05$)分析,并建立径向基函数神经网络模型,采用 Origin 2021 作图。

2 结果与分析

2.1 贮藏期间南美白对虾表面疏水性、 Ca^{2+} -ATPase 的变化

蛋白质表面疏水性、 Ca^{2+} -ATPase 是衡量蛋白

质变性程度的有效指标,蛋白质变性时表面疏水性上升, Ca^{2+} -ATPase 活性下降^[18]。肌原纤维蛋白表面疏水性可根据其与溴酚蓝的结合能力来确定^[19]。由图 1 可知,与新鲜的虾相比,随着贮藏时间的延长表面疏水性显著增加($P < 0.05$),溴酚蓝结合量从 43.13 μg 上升至 68.12 μg,在 30 d 内上升了 58%。这可能是由于蛋白质之间的亚甲基的形成导致蛋白质构象的变化,进而导致疏水氨基酸基团如脂肪族和芳香族氨基酸的暴露^[20]。

同时由图 1 可知,随着贮藏时间的延长, Ca^{2+} -ATPase 活性显著下降($P < 0.05$),从 0.33 U/mg prot 下降到 0.13 U/mg prot,在 30 d 内下降率达到了 60.6%,且贮藏前期下降较慢,在 15 d 后下降速率比贮藏前期快。在贮藏期间,由于肌球蛋白构象的改变和破坏,致使酶活中心崩塌, Ca^{2+} -ATPase 活性下降。同时, Ca^{2+} -ATPase 活性与巯基的氧化密切相关,尤其是肌球蛋白头部的巯基^[21]。

2.2 贮藏期间南美白对虾总巯基、羰基的变化

总巯基含量是衡量蛋白质氧化程度的一个指标。由图 2 可知,新鲜样品的总巯基含量随着贮藏时间的延长显著下降($P < 0.05$),所得结果与 Ca^{2+} -ATPase 活性一致,且总巯基在贮藏初期的下降趋势更加显著。Chen 等^[22]发现-3 °C 的南美白对虾(*L. vannamei*)贮藏 4 周后总巯基含量与 0 周相比下降 52.97%。本文与其研究结果相似,南美白对虾在贮藏期间总巯基逐步下降,下降的原因可能是半胱氨酸残基巯基被氧化成二硫键^[23]。

由氨基酸残基衍生的羰基化合物的形成被认为是评价蛋白质氧化的可靠指标,这些氨基酸主要在肌原纤维蛋白中被检出,肌原纤维蛋白是食品中蛋白质的主要成分^[24]。新鲜样品的羰基含量随贮藏时间的延长显著上升($P < 0.05$),此变化与总巯基含量的变化趋势相反。随着贮藏时间的延长,水产品中肌原纤维蛋白的某些氨基酸残基受到自由基的攻击,氧化成羰基,因此羰基含量上升^[18]。

2.3 贮藏期间南美白对虾 TCA 溶解肽、MFI 的变化

TCA 溶解肽含量反映了蛋白质的降解情况^[25],TCA 溶解肽含量高,表明蛋白质降解程度高。由图 3 可知,与新鲜的虾相比,随着贮藏时间

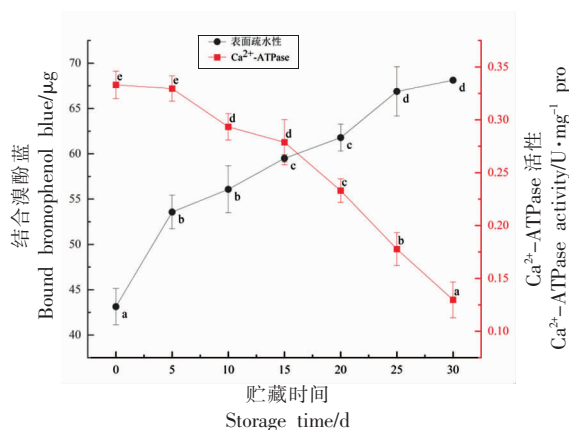


图1 微冻过程中南美白对虾表面疏水性、 Ca^{2+} -ATPase 的变化

Fig.1 Changes in surface hydrophobicity, Ca^{2+} -ATPase of *L. vannamei* during partial freezing

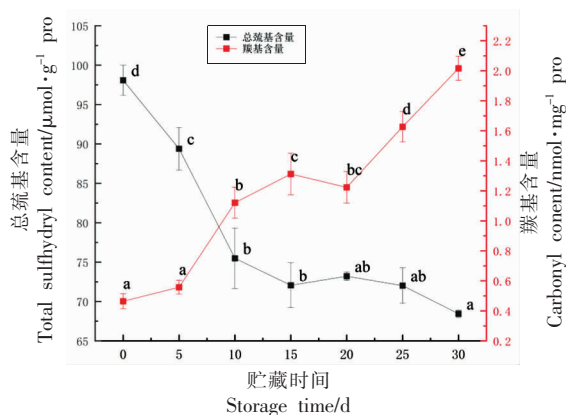


图2 微冻过程中南美白对虾总巯基、羰基的变化

Fig.2 Changes in total sulfhydryl content, carbonyl content of *L. vannamei* during partial freezing

的延长 TCA 溶解肽显著增加 ($P < 0.05$), TCA-溶解肽含量从初始值 (1.42 ± 0.14) μmol 酪氨酸/g 肌肉增长到 30 d 的 (6.29 ± 0.14) μmol 酪氨酸/g 肌肉。初始水平(作为酪氨酸当量)可能表示水产品中的内源性寡肽以及收获后处理过程中产生的降解产品。TCA 溶解肽在贮存过程中含量的增加可能表明内源性和微生物蛋白酶的活动, 蛋白质持续发生溶解^[26]。

肌原纤维小片化指数(MFI)作为肌原纤维蛋白降解的有用标志, 既可以评估剪切力和肉嫩度, 也可以评估肌原纤维内部结构受到破坏的程度^[27]。在本试验中随着贮藏时间的延长, MFI 显著增加 ($P < 0.05$), 且在贮藏 15 d 后 MFI 值增加速率

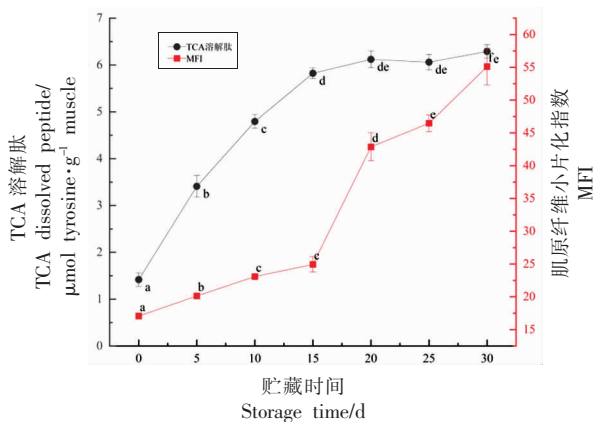


图3 微冻过程中南美白对虾 TCA 溶解肽、MFI 的变化

Fig.3 Changes in TCA soluble peptides, MFI of *L. vannamei* during partial freezing

加快。蛋白质的网状结构被破坏, 使蛋白质网状结构的强度降低, 特别是构成肌纤维束膜中的粗丝更容易溶解, 导致 MFI 值增加^[28]。

2.4 贮藏期间南美白对虾分子作用力的变化

离子键、氢键、疏水相互作用和二硫键是维持蛋白质三维网络结构的作用力。从表 1 可以看出, 随贮藏时间延长, 离子键、氢键下降, 而二硫键、疏水相互作用力上升。由于蛋白质分子内部的巯基基团在微冻过程中被氧化成二硫键, 蛋白质原有的结构可能会受到化学键变化的影响。二硫键的形成导致肌凝蛋白重链聚集, 肌原纤维蛋白的盐溶性降低, 导致离子键含量降低。此外, 由于微冻贮藏期间蛋白质的展开和芳香族氨基酸的暴露, 疏水相互作用力含量增加, 氢键的数量随着疏水相互作用的减少而增加^[29]。

2.5 贮藏期间南美白对虾内源荧光强度的变化

色氨酸荧光检测广泛应用于跟踪蛋白质的三级结构变化, 因为色氨酸残留物的内在荧光对微环境的极性和荧光能量特别敏感^[30]。当蛋白质是折叠状态时, 色氨酸残基主要位于蛋白质内核的疏水环境中, 此时被激发的色氨酸的荧光强度相对较高。图 4 为微冻过程中南美白对虾内源荧光强度的变化, 在激发波长 295 nm 的新鲜虾肉的肌原纤维蛋白在 335.93 nm 处具有最高的荧光强度, 随着贮藏时间的延长, 内源荧光强度出现不同程度的降低, 且在贮藏前期内源荧光强度大幅度

表 1 微冻过程中南美白对虾分子作用力的变化

Table 1 Changes in intermolecular bonds of *L. vannamei* during partial freezing

贮藏时间/d	离子键/mg·mL ⁻¹	氢键/mg·mL ⁻¹	疏水相互作用力/mg·mL ⁻¹	二硫键/mg·mL ⁻¹
0	6.95 ± 0.14 ^d	6.12 ± 0.07 ^e	2.68 ± 0.10 ^a	2.71 ± 0.11 ^a
5	6.61 ± 0.40 ^d	5.10 ± 0.22 ^d	2.74 ± 0.11 ^{ab}	2.76 ± 0.20 ^{ab}
10	4.87 ± 0.21 ^e	4.66 ± 0.04 ^d	2.82 ± 0.04 ^{ab}	3.05 ± 0.14 ^{bc}
15	4.49 ± 0.12 ^e	3.49 ± 0.04 ^e	3.14 ± 0.16 ^b	3.33 ± 0.24 ^e
20	4.60 ± 0.10 ^e	3.20 ± 0.19 ^e	4.31 ± 0.44 ^c	3.77 ± 0.06 ^d
25	3.82 ± 0.27 ^b	2.32 ± 0.54 ^b	4.43 ± 0.05 ^c	3.81 ± 0.10 ^d
30	3.03 ± 0.65 ^a	1.67 ± 0.14 ^a	7.82 ± 0.17 ^d	5.75 ± 0.06 ^e

降低,随后逐渐降低。荧光强度的逐渐降低表明长期的贮藏会导致虾肉肌原纤维蛋白色氨酸残基的暴露和三级结构的变化。

2.6 贮藏期间南美白对虾 SDS-PAGE 的变化

SDS-PAGE 电泳图谱中蛋白质条带的弱化、消失或新条带的出现都是蛋白质变性、降解的具体体现^[31]。图 5 可以看到肌球蛋白重链和轻链、肌动蛋白、原肌球蛋白和尚不明的结构性调节蛋白条带,样品在贮藏期间蛋白质发生一定的变化,

分子质量 175 ku 附近的蛋白质在 20 d 电泳条带发生降解,分子质量 95 ku 附近的条带在逐渐消失,在 17~23 ku 之间条带密度清晰而在贮藏后期减弱甚至消失,推测这些蛋白质与对虾品质的变化相关,可能是由于外源蛋白酶将大分子质量的蛋白质降解形成小分子质量的蛋白质。电泳分析结果表明,在贮藏期间虾肉肌肉蛋白质发生降解,且贮藏时间长,蛋白质降解程度高。

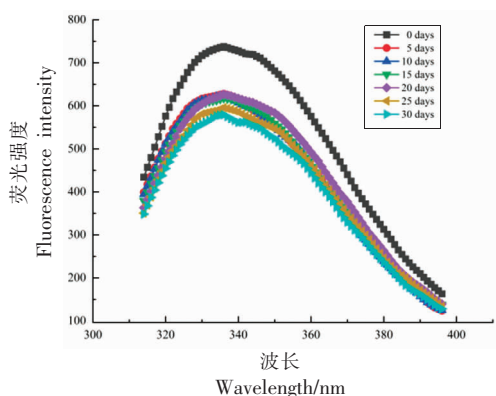


图 4 微冻过程中南美白对虾内源荧光强度的变化
Fig.4 Changes in endogenous fluorescence intensity of *L. vannamei* during partial freezing

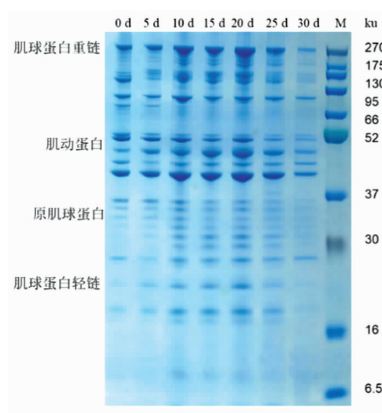


图 5 微冻过程中南美白对虾 SDS-PAGE 的变化
Fig.5 Changes in SDS-PAGE of *L. vannamei* during partial freezing

2.7 径向基函数神经网络预测模型的建立

SPSS (Statistical package for the social science) 软件不仅具有数据管理、统计分析、图表分析、输出管理等基本统计功能,而且相比于 Metlab 等软件,使用 SPSS 建立 RBFNN 模型免去了繁琐的编程,具有简便、易操作的特点^[32]。南美白对虾在 -3 °C 微冻贮藏过程中,蛋白质品质指标的试验

值用于 RBFNN 模型的建立。图 6 是 RBF 神经网络结构,从右到左依次是输入层、隐藏层、输出层。在本次试验预测模型的建立中,输入层有 10 个单元;隐藏层有 8 个单元,激活函数为 Softmax,隐藏层的单元是系统根据原始记录特性计算的最佳结构组成的;输出层有 7 个单元,激活函数为恒等式函数,误差函数为平方和函数。

表2 蛋白质品质特性指标预测值和实测值之间的MSE、 R^2 、相对误差(%)
 Table 2 MSE, R^2 , relative error (%) between predicted value and measured value of protein quality characteristics

品质指标	MSE	R^2	贮藏时间/d						
			0	5	10	15	20	25	30
总硫基含量	0.5798	0.9951	试验值	89.3900	75.4867	72.0533	73.2133	72.0167	68.4533
			预测值	87.8800	75.4900	73.3500	72.9100	72.0200	68.3800
TCA 溶解肽	0.0045	0.9987	相对误差/%	-1.6892	0.0044	1.7996	-0.4143	0.0046	-0.1071
			试验值	3.4080	4.7942	5.8217	6.1197	6.0599	6.2871
表面疏水性	0.0215	0.9997	预测值	3.5405	4.7942	5.7729	6.2241	6.0599	6.2641
			相对误差/%	3.8874	0.0006	-0.8375	1.7064	0.0006	-0.3652
二硫键	0.0029	0.9974	试验值	53.5733	56.0767	59.4967	61.7800	66.8767	68.1200
			预测值	53.3500	56.0800	59.7300	61.5900	66.8800	68.2200
MFI	0.4289	0.9992	相对误差/%	-0.4168	0.0059	0.3921	-0.3075	0.0049	0.1468
			试验值	2.7767	3.0767	3.3300	3.7700	3.8100	5.7700
离子键	0.0120	0.9940	预测值	2.7600	3.0800	3.4700	3.7800	3.8100	5.7600
			相对误差/%	0.1224	0.1073	4.2042	0.2653	0.0000	-0.1733
疏水相互作用力	0.0086	0.9975	试验值	20.1333	23.0889	24.9333	42.8667	46.4667	55.1111
			预测值	20.1000	23.0889	24.5000	42.4000	46.4667	53.5000
氢键	0.0015	0.9995	相对误差/%	-0.1654	0.0000	-1.7378	-1.0887	0.0000	-2.9234
			试验值	6.5967	4.8733	4.4867	4.6033	3.8233	3.1233
Ca ²⁺ -ATP 酶	0.0000	0.9991	预测值	6.6100	4.8700	4.4300	4.5400	3.8200	3.4000
			相对误差/%	0.0476	-0.0677	-1.2637	-1.3751	-0.0863	8.8592
羧基含量	0.0006	0.9979	试验值	2.7400	2.8167	3.1500	4.3067	4.4267	7.8200
			预测值	2.7100	2.8200	3.1400	4.5500	4.4300	7.8300
相对误差/%	0.0000	0.9995	相对误差/%	-1.0949	0.1172	-0.3175	5.6493	0.0745	0.1279
			试验值	5.0767	4.6567	3.4867	3.1967	2.3500	1.6700
相对误差/%	0.0000	0.9991	预测值	5.1400	4.6600	3.4900	3.1200	2.3500	1.6400
			相对误差/%	1.2469	0.0709	0.0946	-2.3993	0.0000	-1.7964
相对误差/%	0.0000	0.9991	试验值	0.3297	0.2933	0.2787	0.2330	0.1777	0.1297
			预测值	0.3250	0.2930	0.2910	0.2390	0.1780	0.1360
相对误差/%	0.0000	0.9979	相对误差/%	-1.4255	-0.1023	4.4133	2.5751	0.1688	4.8574
			试验值	0.4643	1.1210	1.3120	1.2230	1.6267	2.0163
相对误差/%	0.0000	0.9979	预测值	0.5840	1.1210	1.3140	1.1790	1.6270	2.0550
			相对误差/%	-0.0646	0.0000	0.1524	-3.5977	0.0184	1.9194

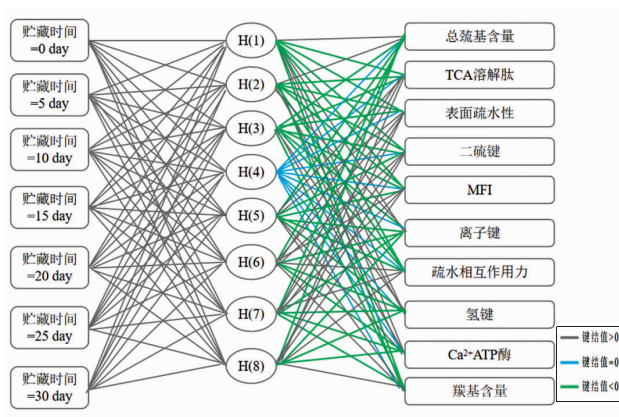


图 6 RBF 神经网络结构

Fig.6 RBF neural network structure

2.8 径向基函数(RBF)神经网络预测模型的验证

为了验证径向基函数(RBF)神经网络预测模型对南美白对虾微冻过程中蛋白质品质的预测效果,将模型对各指标的预测值和实测值进行比较,分别计算各指标预测值和实测值之间的均方误差(MSE)和决定系数(R^2),展示得出预测模型对每个指标的拟合效果,同时,通过计算模型对每个指标预测值与实际值之间的相对误差来评价 RBF 神经网络模型对每个指标预测的准确性。预测模型相对误差的可接受范围为 $\pm 10\%$,由表 2 可知,建立的 RBF 神经网络预测模型的相对误差均在 $\pm 10\%$ 以内,试验结果整体显示 RBF 神经网络模型预测的准确度高,可以成为微冻贮藏过程中南美白对虾蛋白质品质监测可靠的模型。

3 结论

本试验首先对微冻贮藏期间南美白对虾肌肉蛋白质品质特性指标进行测定,与鲜虾相比,不同的试验组的肌肉蛋白均发生了不同程度的变性、氧化和降解,表现为表面疏水性、羰基含量、TCA 溶解肽、肌原纤维小片化指数上升;Ca²⁺-ATPase、总巯基含量下降。化学作用力的结果显示贮藏时间延长,引起离子键、氢键含量上升和疏水相互作用力、二硫键含量的下降。通过色氨酸荧光强度的测定发现,贮藏 30 d 后荧光强度显著降低,表明色氨酸所处的微环境发生了变化。SDS-PAGE 图谱也显示贮藏后期,大分子蛋白发生了不同程度

的降解。最后利用 SPSS 软件建立 RBFNN 模型,该模型的相对误差均在 $\pm 10\%$ 以内,具有较高的预测精度和较好的拟合特性,可作为一种肌肉蛋白质品质变化的监测模型,能够较好地预测微冻南美白对虾的肌肉蛋白质品质变化。

参 考 文 献

- [1] KIMBUATHONG N, LEELAPHIWAT P, HARNK-ARNSUJARIT N. Inhibition of melanosis and microbial growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using high CO₂ modified atmosphere packaging[J]. Food Chemistry, 2020, 312: 126114.
- [2] PAN C, CHEN S, HAO S, et al. Effect of low-temperature preservation on quality changes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: A review [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(14): 6121-6128.
- [3] 陈胜军, 陶飞燕, 潘创, 等. 虾产品低温贮藏保鲜技术研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2020, 10(1): 68-75.
CHEN S J, TAO F Y, PAN C, et al. Research progress of preservation technology of shrimp products at low temperature[J]. Chinese Fishery Quality and Standard, 2020, 10(1): 68-75.
- [4] GE Y, LI Y, WU T, et al. The preservation effect of CGA-Gel combined with partial freezing on sword prawn (*Parapenaeopsis hardwickii*)[J]. Food Chemistry, 2020, 313: 126078.
- [5] 李卫东, 陶妍, 袁骐, 等. 南美白对虾在微冻保藏期间的鲜度变化[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(11): 48-52.
LI W D, TAO Y, YUAN Q, et al. Changes in freshness of *Litopenaeus vannamei* during partial freezing storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(11): 48-52.
- [6] 刘欢, 马翼飞, 单钱艺, 等. 冰藏和微冻贮藏对大鲮肌肉品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(23): 199-204.
LIU H, MA Y F, DAN Q Y, et al. Effects of ice storage and partial freezing storage on muscle quality of *Andrias davidianus*[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(23): 199-204.
- [7] 孟粉, 秦求思, 董焯, 等. 超声波和 TGase 对重组草鱼肉形成过程中理化性质的影响[J]. 食品工业科

- 技, 2020, 23(41): 30-36.
- MENG F, QIN Q S, DONG Y, et al. Effects of ultrasonic wave and TGase on physicochemical properties of recombinant grass fish during formation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 23(41): 30-36.
- [8] XU Z, LIU X, WANG H, et al. Comparison between the arrhenius model and the radial basis function neural network (RBFNN) model for predicting quality changes of frozen shrimp (*Solenocera melantho*) [J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(11): 2711-2723.
- [9] LIU X, JIANG Y, SHEN S, et al. Comparison of arrhenius model and artificial neuronal network for the quality prediction of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during storage at different temperatures[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 60(1): 142-147.
- [10] CHELH I, GATELLIER P, LHOUTELLIER V R S. A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination[J]. Meat Science, 2006, 74(4): 681-683.
- [11] 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 changes of quality evaluation protein and mechanism of endogenous protease in grouper during cold storage[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [12] 齐慧林. 护色剂对调味鱼杀菌及储藏过程中颜色品质的影响研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- QI H L. Study on the effect of color protectors on color quality of flavoured fish during sterilization and storage[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020
- [13] 孙红霞, 黄峰, 丁振江, 等. 不同加热条件下牛肉嫩度和保水性的变化及机理[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 84-90.
- SUN H X, HUANG F, DING Z J, et al. Changes and mechanism of tenderness and water retention of beef under different heating conditions[J]. Food Science, 2018, 39(1): 84-90.
- [14] SUN Y, MA L, MA M, et al. Texture characteristics of chilled prepared Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) during storage [J]. International Journal of Food Properties, 2018, 21(1): 242-254.
- [15] 石径. 中华管鞭虾冻藏过程中品质变化规律及机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- SHI J. Study on the quality change law and mechanism of pipe whip shrimp during frozen storage[D]. Beijing: China Agricultural University, 2018.
- [16] PAN C, LIANG X, CHEN S, et al. Red color-related proteins from the shell of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*): Isolation, identification and bioinformatic analysis [J]. Food Chemistry, 2020, 327: 127079.
- [17] 邹慧琴, 李硕, 陶欧, 等. RBF神经网络在中医药领域中的应用及其在SPSS 17.0软件中的实现[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(2): 336-338.
- ZOU H Q, LI S, TAO O, et al. Application of RBF neural network in traditional Chinese medicine and its implementation in SPSS 17.0 software [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 33(2): 336-338.
- [18] 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. Study on the activity and quality of oxidative cathepsin during low temperature storage of bighead carp[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [19] LV M, ZHANG H, MEI K, et al. Effects of high pressure on myofibrillar protein and moisture distribution of shrimp (*Solenocera melantho*) muscle[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2020, 29(3): 220-228.
- [20] LEE J, PARK J W. Pacific whiting frozen fillets as affected by postharvest processing and storage conditions[J]. Food Chemistry, 2016, 201: 177-184.
- [21] 崔燕, 宣晓婷, 林旭东, 等. 超高压协同冷冻辅助脱壳对南美白对虾肌原纤维蛋白理化性质的影响[J]. 现代食品科技, 2019, 35(2): 32-39.
- CUI Y, XUAN X T, LIN X D, et al. Effects of ultrahigh pressure combined with freezing assisted hulling on physicochemical properties of myofibrin in *Penaeus vannamei* [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(2): 32-39.
- [22] CHEN S, TAO F, PAN C, et al. Modeling quality changes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during storage: Comparison of the arrhenius model and random forest model[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 45(1): e14999.
- [23] ZHANG L, LI Q, JIA S, et al. Effect of different stunning methods on antioxidant status, *in vivo* my-

- of fibrillar protein oxidation, and the susceptibility to oxidation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during 72 h postmortem[J]. Food Chemistry, 2018, 246: 121–128.
- [24] LUA X, ZHANG Y, XU B, et al. Protein degradation and structure changes of beef muscle during superchilled storage[J]. Meat Science, 2020, 168: 108180.
- [25] 张天义. 微波加热对猪肉中蛋白质及苯并芘形成的影响研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
ZHANG T Y. Study on the effect of microwave heating on the formation of protein and benzopyrene in pork[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013.
- [26] 贺永玲, 杨松, 闫晓明, 等. 鳊鱼发酵过程营养物质动态变化[J]. 食品工业, 2016, 37(2): 73–76.
HE Y L, YANG S, YAN X M, et al. Dynamic changes of nutrients during fermentation of mandarin fish[J]. Food Industry, 2016, 37(2): 73–76.
- [27] 朱文慧, 宦海珍, 李月, 等. 蛋白氧化对秘鲁鱿鱼肌肉品质及其结构的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(17): 25–29.
ZHU W H, HUAN H Z, LI Y, et al. Effects of protein oxidation on muscle quality and structure of squid from Peru[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(17): 25–29.
- [28] DU X, LI H, NUERJIANG M, et al. Application of ultrasound treatment in chicken gizzards tenderization: Effects on muscle fiber and connective tissue[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 79: 105786.
- [29] WANG X, XIE J. Evaluation of water dynamics and protein changes in bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during cold storage[J]. LWT—Food Science and Technology, 2019, 108: 289–296.
- [30] ZOU Y, XU P, WU H, et al. Effects of different ultrasound power on physicochemical property and functional performance of chicken actomyosin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113: 640–647.
- [31] 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. Changes of muscle protein in tilapia fillet during ice storage[J]. Southern Fishery Sciences, 2016, 12(2): 88–94.
- [32] 胡志洁. IBM SPSS Statistics 19.0 在挥发油提取工艺优化中的应用[J]. 计算机与应用化学, 2013, 30(4): 418–420.
HU Z J. Application of IBM SPSS Statistics 19.0 in volatile oil extraction process optimization[J]. Computer and applied chemistry, 2013, 30(4): 418–420.

The Changes and Prediction Model of Protein Quality of *Litopenaeus vannamei* during Partial Freezing Storage

Sun Kangting^{1,2}, Chen Shengjun^{2,3,4*}, Pan Chuang², Hu Xiao², Deng Jianchao², Li Chunsheng²

¹College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong

²Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Research and Development Center for Aquatic Product Processing, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300

³Key Laboratory of Efficient Utilization and Processing of Marine Fishery Resources of Hainan Province, Sanya Tropical Fisheries Research Institute, Sanya 572000, Hainan

⁴Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning

Abstract In this work, *Litopenaeus vannamei* was used as a raw material to study the changes of muscle protein quality characteristics at different storage times under partial freezing condition (−3 °C), and the radial basis function neural prediction model was established based on related protein indexes. The results showed that compared with fresh shrimp samples, after 30 d of partial freezing storage, the surface hydrophobicity, carbonyl content, TCA soluble peptide, myofibril fiber fragmentation index, hydrophobic interaction force, and disulfide bond content significantly increased to (68.12 ± 0.19) μg, (2.02 ± 0.08) nmol/mg pro, (6.29 ± 0.14) μmol tyrosine/g muscle, 55.11 ± 2.79, (7.82 ± 0.17) mg/

mL, (5.77 ± 0.06) mg/mL, respectively. Ca^{2+} -ATPase, total sulfhydryl content, ionic bonding, hydrogen bonding content, and endogenous fluorescence intensity significantly decreased to (0.13 ± 0.13) U/mg pro, (68.45 ± 0.47) $\mu\text{mol/g}$ pro, (3.12 ± 0.48) mg/mL, (1.67 ± 0.14) mg/mL, 579.71 ± 20.67 , respectively. Shrimp muscle proteins were denatured, oxidized and degraded in varying degrees, and the tertiary structure of proteins changed. The results of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis showed that the storage time was prolonged, and the large molecular weight proteins were degraded. Meanwhile, electrophoresis results showed that the storage time was prolonged and the large molecular weight protein was degraded. The error between the predicted value of the radial basis function neural prediction model and the experimental value was within $\pm 10\%$. The results showed that the model could predict the protein quality of *L. vannamei* during partial freezing storage.

Keywords *Litopenaeus vannamei*; partial freezing; protein quality change; radial basis function neural prediction model