

# 魚類肌肉的構造及組成與其死後蛋白質水解引起的變化

## The Muscle Structure and Composition of Fish and Their Changes Caused by Postmortem Proteolysis

邱思魁

Tze-Kuei Chiou

國立臺灣海洋大學生命科學院食品科學系名譽教授

Received 11 February 2020; revised 12 May 2020; accepted 27 May 2020; available online 24 June 2020

### 摘要

本文介紹魚類肌肉的構造與組成，以及死後蛋白質水解引起在消費及加工利用上重要的品質變化。內容重點：(1)肌肉組織與構造，包括海產食品的肌肉組織、肌肉的本質、結締組織、魚類肌肉構造與蛋白質、海產食品的蛋白質分類等項，(2)主要肌肉組分的生化性質，包括肌纖維、肌內結締組織、肌內脂等項，(3)魚類死後的肌肉代謝與肌肉收縮，(4)魚類死後肌肉構造的變化，包括早期細胞內事件引起肌原纖維的斷片化、內源性肌肉蛋白酶的活化、肌肉中主要的構造變化等項，(5)蛋白質水解與其引起的肌肉變化，包括蛋白質水解、魚肉中觀察到的蛋白質水解、魚類和貝類的軟化、肌肉龜裂、熱加工過程中魚肉膠體的脆弱化/軟化、肌肉的質地變化等項，(6)水生動物的蛋白質水解酵素，(7)蛋白酶的貢獻角色，包括對死後自家消化變化的貢獻、在魚貝類肌肉軟化上所扮演的角色等項。

**關鍵字：**魚類肌肉、肌肉蛋白質、肌肉構造變化、蛋白質水解、肌肉軟化、蛋白酶。

### 一、前言

魚類和貝類出現柔軟的(soft)或糊狀的(mushy)質地似乎是嚴重的問題，因為限縮貯藏期限，繼而影響市場銷售。在死後處置(postmortem handling)和儲藏過程中，

肌肉蛋白質會被內源性或微生物的蛋白酶降解(Shigemura *et al.*, 2004; Sriket *et al.*, 2011c)，尤其時間長的貯藏甚且不當的條件下，包括核苷酸以及含氮化合物的自家消化 (autolysis) 等的變化也更為明顯 (Selvakumar *et al.*, 2002; Aubourg *et al.*, 2007)。

通常，魚貝類在地區流通上大都冰

---

\*作者電子信箱：[chioutk@mail.ntou.edu.tw](mailto:chioutk@mail.ntou.edu.tw)

藏，這會造成容易出現質地的問題，即稱為軟化(softening)或糊狀(mushiness)，這樣的變質(deterioration)經常是在貯藏期間受到消化酵素(digestive enzyme)活性的作用，從而縮短貯藏壽命可達一週(Pornrat *et al.*, 2007; Sriket *et al.*, 2010)。冰冷藏的(ice-chilled)魚貝類發生糊狀肉質，乃肌肉組織逐漸且連續地降解，包括肌束膜(perimysium)和內肌膜(endomysium)的結締組織(connective tissue)、以及位於 Z-線(Z-line)和 H-區(H-zones)等的蛋白質，受到消化酵素或肝胰臟酵素(hepatopancreatic enzymes)的作用(Papadopoulos *et al.*, 1989; Pornrat *et al.*, 2007; Sriket *et al.*, 2010)。魚貝類的消化器官例如肝胰臟同時具有胜肽酶〔或肽酶〕(peptidase)和蛋白酶(protease)活性，例如胺基肽酶(aminopeptidase)、明膠分解蛋白酶(gelatinolytic protease)、胰蛋白酶(trypsin)和胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、以及膠原蛋白分解蛋白酶(collagenolytic protease)等(Cao *et al.*, 2000b; Aoki *et al.*, 2003; Sriket *et al.*, 2011a)，其中的膠原蛋白分解酵素對肌肉軟化的影響很大(Brauer *et al.*, 2003; Sriket *et al.*, 2011c)，膠原蛋白酶(collagenases)定義為：在生理條件下，能夠降解膠原蛋白的天然三重螺旋構造之蛋白酶(Aoki *et al.*, 2003)。此外，肌肉中原有的蛋白酶也參與質地軟化等作用(Yoshida *et al.*, 2009; Felberg *et al.*, 2010; Sriket *et al.*, 2011a)，這些內源性肌肉蛋白酶包括：細胞溶質的鈣蛋白酶(cytosolic

calpains)、溶酶體的組織蛋白酶(lysosomal cathepsins)和包含彈性蛋白酶(elastase)及膠原蛋白酶組成的結締組織蛋白酶。在死後貯藏初期魚類組織的質地變質，特別重要的酵素包括鈣蛋白酶( $\mu$ -及 m-鈣蛋白酶；活性所需的鈣離子濃度不同，前者在  $\mu\text{mole}$  而後者在  $\text{mmole}$  範圍)及組織蛋白酶 B/H/L，以及天門冬胺酸組織蛋白酶 D (aspartic cathepsin D)等。

因此在肌肉軟化的現象上，瞭解蛋白酶如何地作用，尤其具有膠原蛋白水解活性的酵素，有助於漁民或業者面對在死後處置或儲存期間，去預防或延遲那些蛋白酶所涉及的品質損失，盡可能維持魚類和貝類原有品質的高市場價值。蛋白酶的作用基質對象為蛋白質，亦即魚貝類的肌肉，基本上包括肌肉的組織構造與其構成的各種肌肉蛋白質(muscle proteins)等。換言之，捕撈後漁獲物除非立即凍結貯藏，在冰藏或低溫冷藏的流通時，即通常在貯藏中後期微生物活性開始發揮明顯的腐敗作用之前，內源性酵素催化的各種反應包括蛋白質水解(proteolysis)等仍主導死後貯藏的變化，這終將修飾甚至破壞組織結構與其構成蛋白質，肌肉的質地連帶也受到影響，因而可能發生肉質的軟化、龜裂(gapping)等問題。如上所述，這些即為本文內容的重點。

## 二、肌肉組織與構造

1.海產食品的肌肉組織(Tahergorabi *et al.*, 2011)

肌肉組織是利用於加工處理而製成各種食品產品的魚類可食用部分，這些肌肉在結構、組成和功能上通常都與陸生動物相似。海產食品(seafood)包含兩種肌肉類型：橫條紋為特徵的橫紋肌(striated muscle)，無此特徵者為平滑肌(smooth muscle) (Torres *et al.*, 2007)，橫紋肌再分為白[色]肌(white muscle)和暗色肌(dark muscle)，白色肉即普通肉(ordinary muscle)分布於所有的部位，暗色肉包括位於魚體表層(任何的魚類)、特別在側線下方附近更多(海洋表層洄游魚類)的表層血合肉(superficial dark muscle)，以及在脊骨周圍深部的真血合肉(true dark muscle) (鯉魚、鮭魚等外洋洄游性中型及大型魚)，含量因魚種而異。普通肉是由分隔的肉塊(稱為生肌節 myotome/myomere)組成(圖 1)，這些肉塊被結締組織(connective tissue)之肌隔(myocommata/myosepta)包圍。

未烹煮的生鮮肌肉大抵是半透明的，由許多的纖維(fibers)組成(Brown,

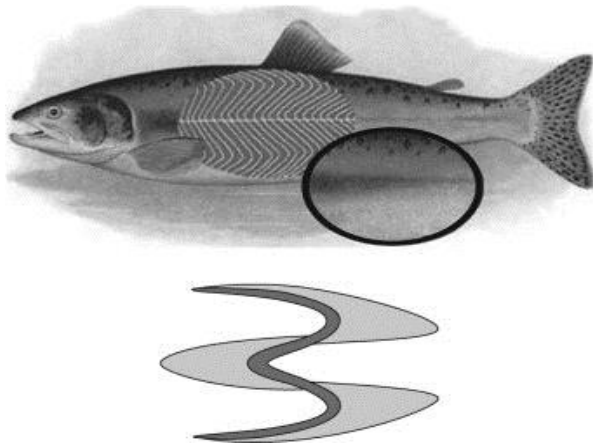


圖 1. 魚類肌肉(上圖)和單一的魚類肌肉塊(生肌節；下圖)表示生肌節的折疊(生肌節被結締組織的肌隔分隔)。來源：Tahergorabi *et al.* (2011)。

1986)，肌纖維(muscle fibers)為肌肉構造的較小構成單元，透過結締組織的內肌膜集合成束，並覆蓋著肌隔。肌纖維由許多彼此平行的肌原纖維(myofibrils)組成，肌原纖維之間間隙被肌漿蛋白質(sarcoplasmic proteins)所充滿 (Suzuki, 1981; Lanier *et al.*, 2005)。

## 2. 肌肉的本質(Eskin *et al.*, 2013; Listrat *et al.*, 2016)

肌肉的基本構成單元為纖維，一種多核的圓柱形細胞，周圍被稱為肌膜/肌鞘(sarcolemma)的外層膜圍住，這些纖維聚集成束，被結締鞘(connective sheath)之肌束膜所束縛，纖維束又透過結締組織集合在一起，並被結締組織鞘之外肌膜(epimysium)覆蓋。對肉類與魚類的質地和食用性都重要的結締組織，包括纖維狀蛋白質(fibrous proteins)、膠原蛋白(collagen)、網硬蛋白(reticulin)及彈性蛋白(elastin)等。較之於畜肉，魚類肌肉的結締組織含量低甚多，故，嫩化(tenderization)有關的問題少。

### (1) 宏觀尺度

骨骼肌(skeletal muscle)由大約 90% 肌纖維和 10% 結締組織及脂肪組織(adipose tissue)組成。骨骼肌中的結締組織分為圍繞每條肌纖維的內肌膜、圍繞肌纖維束的肌束膜、圍繞肌肉全部的外肌膜等(Astruc, 2014a; 2014b)，肌肉組織構造如圖 2 所示，骨骼肌也含有脂肪及量更少的血管與神經組織。在魚類，可食部位的魚片(fillets)是由數塊肌肉(生肌節)組成，它們

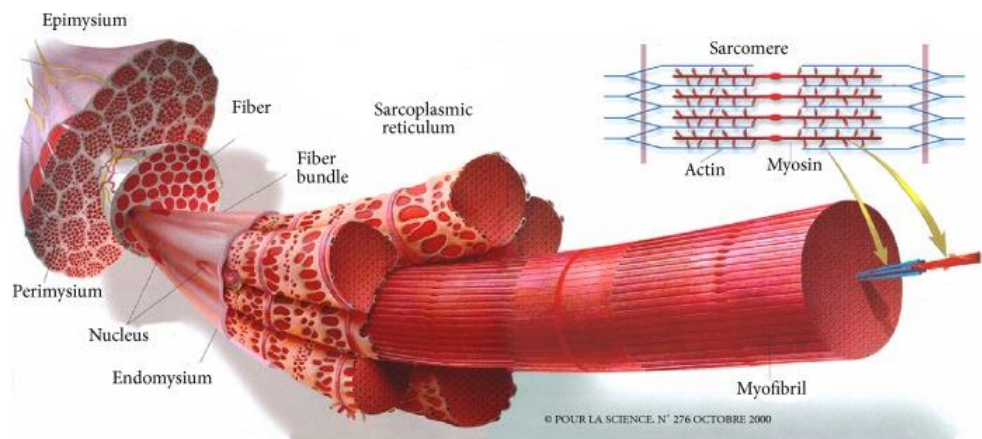


圖 2. 肌肉的一般組織圖。骨骼肌主要由肌纖維及結締組織組成，後者在肌肉中的分布：包圍每條肌纖維的內肌膜、將纖維束的肌肉分隔之肌束膜、及將肌肉的外部封包之外肌膜。在纖維內，肌原纖維占據幾乎整個胞內體積，肌纖維的收縮單元為肌小節。來源：Listrat *et al.* (2016)。

交錯嵌合並被數毫米厚的結締組織鞘(肌隔)所分隔，肌隔自脊骨軸延伸至皮膚，呈現結構的連貫性，其作用乃確保一個生肌節的纖維收縮力傳遞至另一個生肌節，且直通至骨骼及皮膚，這具有肌肉和結締鞘交替的特殊結構，稱為體節組織(metameric organization)。上市體形大小的圓體魚(round fish)，魚片的生肌節類似 W 形狀(圖 3)，但橫切面的組織更複雜(圖 4)，肌隔可視為家畜肌肉的外肌膜，魚類的其它肌內(intramuscular)結締組織如同在陸生動物看到的。魚類肌肉的唯一特徵即宏觀上三種主要肌肉類型為解剖學上隔離的：白[色]肌、淺表層的紅[色]肌(red muscle) (沿著皮膚)和中層的粉紅[色]肌(pink muscle)，這些的肌肉存在每個生肌節中(圖 4)。魚片也含有肌內脂肪組織，位於肌纖維(myofibers)之間的生肌節和在肌束膜內，但主要存在於將生肌節分隔之肌隔。

## (2)微觀尺度

肌纖維為細長而多核的紡錘形細胞，大致上直徑 10~100  $\mu\text{m}$ ，長度為數 mm (魚類)至數 cm (陸上動物)，所有物種的纖維大小都隨著動物年齡而增大，是出生後肌肉生長的重要參數。肌纖維原生質膜(plasma membrane)即是肌膜/肌鞘，纖維的橫切面積取決於代謝和收縮類型(後述)。在魚類，纖維的大小分佈根據肥大的(hypertrophic; 由於體積增加而導致細胞大小增大)和增生的(hyperplastic; 由於細

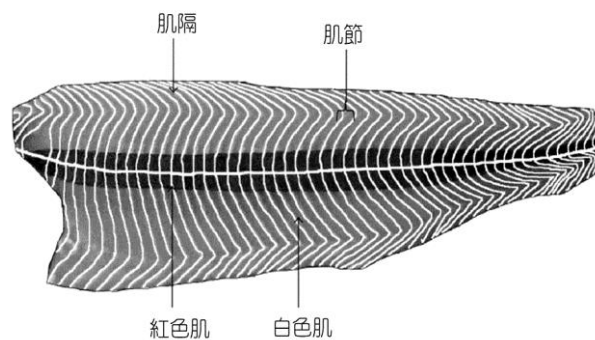


圖 3. 鮭魚的縱向面魚皮下面的魚片，表示兩肌肉型態的生肌節的 W-形狀。來源：Listrat *et al.* (2016)。



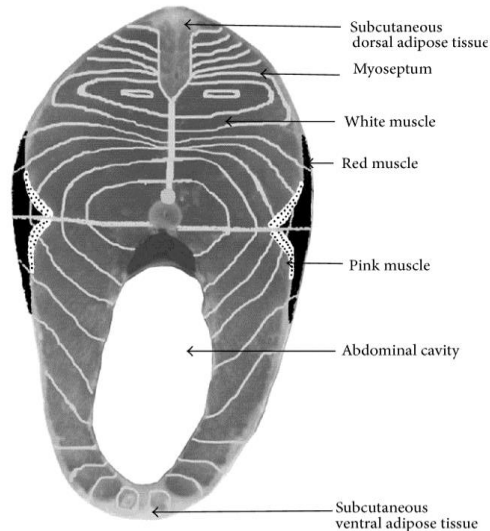


圖 4. 鱒魚的橫切肉塊中肌肉質量的組織及分布。  
來源：Listrat *et al.* (2016)。

胞數量增加而導致肌肉體積增加)生長階段等的重要性而變化。大的和小的纖維同時存在，形成在魚類常看到的所謂馬賽克(mosaic)般的結構(圖 5)。

不論種類，排列成束的肌原纖維(myofibril)幾乎占據了肌纖維的整個胞內體積。單一肌纖維由直徑 1~2  $\mu\text{m}$  的肌原纖維組成，是肌肉收縮的基本單元。與哺乳動物不同的，魚類骨骼肌在結締組織薄片之間排列的纖維長度相對短許多，短橫薄片(肌隔)的結締組織將魚類肌肉分隔成

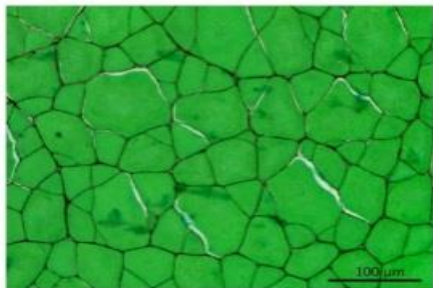


圖 5. 鱸魚(*Dicentrarchus labrax*)白色肌經 sirius red 及 fast green 染色。肌肉由粗與細纖維(直徑分別約 100 與 10  $\mu\text{m}$ )組成。來源：Listrat *et al.* (2016)。

與脊骨數目對應的片段(即生肌節)(Dunajski, 1979)。單一條肌原纖維被細小管網狀物即肌漿[質]網(sarcoplasmic reticulum)隔開，每條纖維的內部是稱為肌漿(sarcoplasm)的液體基質，含有粒腺體(mitochondria)、酵素、肝醣(glycogen)、腺苷三磷酸(ATP)、肌酸(creatine)和肌紅素(myoglobin)等。

以相位差顯微鏡觀察肌原纖維的組織結構，由於暗帶(或 A-帶 A-bands)和明帶(或 I-帶 I-bands)的交替存在，可看出交錯狀的橫紋，這樣的肌原纖維結構在魚類和肉類非常相似。A-帶中有一較明亮的帶(H-區)穿過，H-區的中心也有更暗的線即 M-線(M-line)，而 I-帶的中央有一條暗線稱 Z-線，肌原纖維的基本構成單元是肌[小]節(sarcomere)，即兩相鄰的 Z-線之間即為一個肌小節，如圖 6 所示。以電子顯細不同的兩種絲狀(filaments)，細肌絲(thin filament)主要由肌動蛋白(actin)、肌鈣蛋白-T/I-C (troponin-T/I-C) (調節肌肉的收(myosin)分子集合組成，具有 ATPase (ATP 酶)活性催化 ATP 降解為腺苷二磷酸(ADP)，提供肌肉收縮所需的化學能。

粗肌絲及細肌絲除外，還有肌聯蛋白(connectin)和結蛋白(desmin)構成的絲狀細胞骨架結構(filamentous cytoskeletal structure) (Young *et al.*, 1980)，肌聯蛋白是肌肉中「間隙肌絲 gap filaments」的主要肌原纖維蛋白質(myofibrillar proteins)，遍及所有骨骼肌的肌小節中都存在 (Maruyama *et al.*, 1976)，Locker and Leet

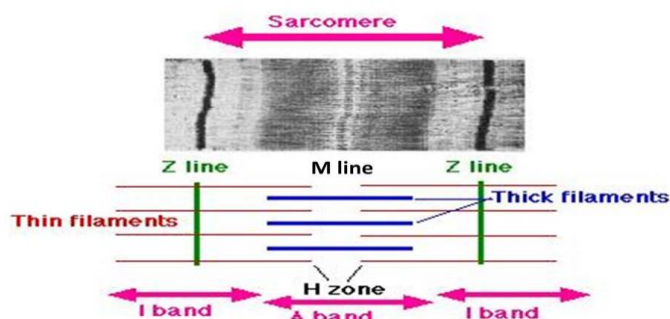


圖 6. 肌肉的最小收縮單元之肌小節。來源：Wikipedia (2020)。

(1976a; 1976b) 指出在過度伸張 (overstretched) 牛肉的纖維中，間隙肌絲跨越粗肌絲與細肌絲之間的區域，Locker (1984) 指出每條間隙肌絲在 A-帶形成一個核心。Connectin (肌聯蛋白) 的發現較早，後來得知 connectin 即是 titin (肌聯蛋白)，titin 由 titin-1、-2 和 -3 等三個區分組成，佔雞胸肉肌原纖維蛋白質的 10~15% (Wang *et al.*, 1979)，但 titin-3 後來已知是不同的蛋白質，稱為伴肌動蛋白 (nebulin) (Wang and Williamson, 1980)。又研究指出結蛋白位在雞骨骼肌中 Z-盤 (Z-disk) 的外圍 (Lazarides and Hubbard, 1976; Granger and Lazarides, 1978)，可能扮演維持相鄰肌小節的調準 (alignment)，使每條肌原纖維的收縮過程一致。肌漿 (肌纖維的細胞質 cytoplasm) 中含有許多可溶性蛋白質，包括醣解途徑 (glycolytic pathway) 的酵素和肌紅素，肌紅素攜帶氧氣至線粒體，並染紅細胞，油滴 (lipid droplets) 之外，還含有肝醣顆粒，代表肌肉細胞的主要的局部能量儲備。

### 3. 結締組織 (Eskin *et al.*, 2013)

肌細胞中的間隙空間占有三種蛋白

質：膠原蛋白、網硬蛋白和彈性蛋白，統稱結締組織。圍繞肌纖維的內肌膜層是細網狀膠原纖維 (collagenous fibrils) 組成，彈性蛋白在肌肉中的分布稀落，與血液、毛細管和神經系統一起 (Asghar *et al.*, 1984)。這些肌纖維集成束，被更厚的結締組織之肌束膜包圍，這些結締組織匯集在肌肉末端的粗肌腱纖維 (thick tendon fibrils)，如圖 7 所示 (Etherington and Sims, 1981)。肌肉收縮時，移動透過肌腱傳遞至骨骼，肌腱中的膠原蛋白其彈性有限，使得肌肉收縮轉換成為高度的移動。

結締組織的主要蛋白質是膠原蛋白，一種醣蛋白 (glycoprotein)，最初即認為由兩種多肽鏈 (polypeptide chains;  $\alpha_1$ -及  $\alpha_2$ -鏈) 組成，形成三重螺旋結構 (triple helical structure)。至少 10 種  $\alpha$ -鏈構成目前已知的各種類型的膠原蛋白，膠原蛋白 I

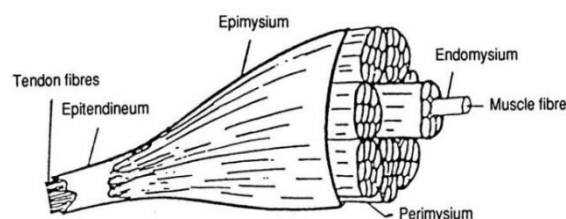


圖 7. 肌肉中的結締組織。來源：Etherington and Sims (1981)。

型和 III 型是肌肉中最多量的，IV、V、VI、XII、XIV、XV 和 XIX 型等較少，其差別在於一級結構和胺基酸組成(Asgar *et al.*, 1984)。形態學上，三個離散的膠原蛋白貯藏處——內肌膜、肌束膜和外肌膜，構成了嵌在蛋白聚醣(proteoglycans)基質上的膠原蛋白和彈性蛋白纖維的立體網狀構造(Lepetit, 2008)。內肌膜圍繞每條肌纖維及覆蓋基底膜(basement membrane)的結締組織層(McCormick, 1999)。肌束膜占肌內結締組織的大部分，關鍵影響肉類質地的差異(Lewis and Purlow, 1990)。外肌膜圍繞各個肌肉的結締鞘，並與肌腱相連而連結其它的肌肉(McCormick, 1999)，非常堅韌、耐剪切(shear)且難溶解。膠原蛋白纖維(collagen fiber)的次單元(subunit)為膠原蛋白單體的原膠原蛋白(tropocollagen)，由三條多肽  $\alpha$ -鏈組成，一條多肽鏈交錯重疊另一條鏈的樣式排列。

外肌膜和肌束膜兩者的主要組成成分是膠原蛋白 I 型，而 III、IV 和 V 型主要存在於內肌膜(Bailey and Peach, 1968; Bailey and Sims, 1977)。由於膠原蛋白是結締組織的主要成分，對肉類質地的影響很大，Bailey (1972)指出可接受的肉類質地需要膠原蛋白分子之間有些的交聯(cross-linking)，這樣的鏈結過少或過多導致肉質是較嫩或者較硬。年齡較老動物的肉質韌度(toughness)偏高，可歸因於膠原纖維中數量多且穩定的交聯(Eyre *et al.*, 1984; Reiser *et al.*, 1992)，這些穩定的交聯

的相對數量決定烹煮肉的質地(Bailey and Light, 1989; Bailey, 1989)。

主要肌肉蛋白質的分類與功能，彙整如表 1 所示。

#### 4. 魚類肌肉的構造與蛋白質(Venugopal and Shahidi, 1996; Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)

魚類肉片的肌肉是順延著魚體兩側的大塊體側肌(lateral muscles)形成，通常白色至灰白色，另在皮下肌肉(subcutaneous muscles)含有相當量的肌紅素/肌紅蛋白，為紅色或深色肉(血合肉)。魚類肌肉被結締組織的薄膜(肌隔)分隔成片段(生肌節)，每片生肌節都是由與魚體的長軸平行而伸長的肌纖維組成，長度小於 20 mm，直徑 0.02~1 mm，每條肌纖維被含有薄膠原纖維之肌膜/肌鞘圍住，這些細纖維和肌隔在生肌節-肌隔接合點合併一起，相對的，陸地動物的肌肉塊更加拉長而形成了腱(Lampila, 1990)。一條肌纖維具有細胞的所有成分，由 1000 至 2000 個肌原纖維集成，直徑可達 5  $\mu\text{m}$ 。肌原纖維被片段化成為肌小節，由細肌絲和粗肌絲構成，顯現出 Z-線所分界的重折光帶(anisotropic band; A 帶)和單折光帶(isotropic band; I 帶)交替排列。肌肉收縮時，肌凝蛋白組成的粗肌絲和肌動蛋白的二重螺旋組成的細肌絲互相重疊和滑動。脊椎動物的粗肌絲含有 200~400 個肌凝蛋白分子，與收縮機制有關的蛋白質尚有原肌凝蛋白和肌鈣蛋白，都位於細肌絲上(Skaara and Regenstein, 1990; Suzuki,

表 1 主要肌肉蛋白質的類型與功能(Toldrá, 2006)

蛋白質	類型	功能
肌凝蛋白 Myosin	肌原纖維的	主要收縮的
肌動蛋白 Actin	肌原纖維的	主要收縮的
原肌凝蛋白 Tropomyosin	肌原纖維的	調節的
肌鈣蛋白-T/C/I Troponin-T/C/I	肌原纖維的	調節的
$\alpha$ -及 $\beta$ -輔肌動蛋白 $\alpha$ - and $\beta$ -Actinin	肌原纖維的	調節的
肌聯蛋白 Titin	肌原纖維的	細胞骨架的
伴肌動蛋白 Nebulin	肌原纖維的	細胞骨架的
細絲蛋白 Filamin、聯絲蛋白 Synemin、紐蛋素 Vinculin	肌原纖維的	Z-線
結蛋白 Desmin	肌原纖維的	Z-線處的肌原纖維連接
肌酸激酶 Creatine kinase	肌原纖維的	M-線
M-蛋白質 M-protein	肌原纖維的	M-線
粒線體的酵素 Mitochondrial enzymes	肌漿的	呼吸
溶酶體的酵素 Lysosomal enzymes	肌漿的	胞內的消化
其它細胞溶質的酵素 Other cytosolic enzymes	肌漿的	醱解、糖質新生、檸檬酸循環、中性 pH 的蛋白質水解
肌紅素 Myoglobin	肌漿的	天然色素
血紅素 Hemoglobin	肌漿的	血液色素
細胞色素 Cytochrome	肌漿的	呼吸色素
膠原蛋白 Collagen	結締的	彈性(elasticity)
彈性蛋白 Elastin	結締的	構造抗性(structure resistance)
蛋白聚醣及醣蛋白 Proteoglycans and glycoproteins	結締的	基質(ground substance)

1981)。肌肉主要由肌原纖維蛋白質組成，在魚類，占蛋白質總量的 60~80%，高於在哺乳動物的 40%。虹鱒白色肌的總蛋白質中，肌原纖維區分或結構蛋白質 (structural proteins) 占 64%，肌漿蛋白質占 30% (Howgate, 1979)，魚類的肌漿蛋白質占全部肌肉蛋白質的 20~50%，主要由醱解酵素和其它參與細胞代謝的酵素等組成(Nakagawa *et al.*, 1988a; 1988b)，而結締組織蛋白質(膠原蛋白)占 3~10%。

欠缺如哺乳動物中的腱系統將肌肉束(muscle bundles)連接至骨骼，魚類的肌細胞平行排列，與繫在骨骼和皮膚的結締組織鞘(肌隔)連接。哺乳動物和魚類骨骼肌的特徵是收縮蛋白質(contractile

proteins)精確地建構成為條紋狀肌原纖維，亦即重複將構造單元的肌小節串聯排列(圖 8)。結蛋白中間肌絲(intermediate filaments)處於戰略位置上橫向連接各個肌原纖維的 Z-盤，使肌小節相互連接至肌膜；換言之，在脊椎動物骨骼肌中 Z-盤連結鄰近的肌小節，故其完整性對於各別肌小節中肌動蛋白及肌凝蛋白肌絲的交互作用是重要的(Takahashi, 1996)。一個中間肌絲晶格(lattice)封包且連結所有肌小節至膜細胞骨架(membrane cytoskeleton) (稱為肋狀體 costamere)、線粒體、細胞核和肌漿網。

肋狀體及中間肌絲是固定結構性細胞組成分，肋狀體在 Z-盤處將外圍肌原纖



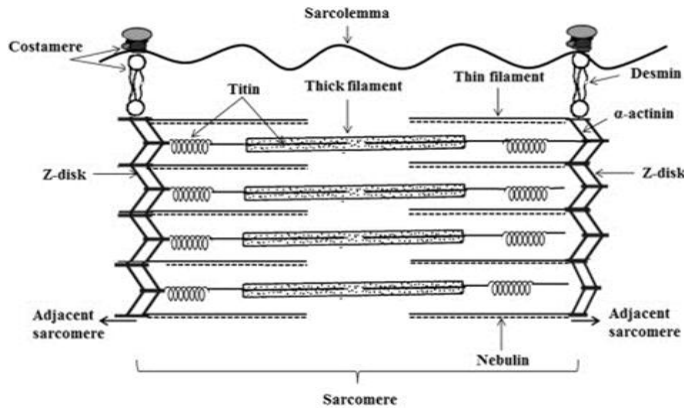


圖 8. 肌原纖維的主要組成分示意圖。來源：Ahmed *et al.* (2015)。

維與肌膜連接之細胞骨架結構，構成的蛋白質包括：血影蛋白(spectrin)、紐蛋素(vinculin)、 $\alpha$ -輔肌動蛋白( $\alpha$ -actinin)、肌萎縮蛋白(dystrophin)、踝蛋白(talin)及細絲蛋白(filamin)，而中間肌絲主要包括結蛋白，在 Z-盤處連結肌原纖維，結蛋白由四個分子量 53 kDa 的次單元組成，圍繞骨骼肌中的 Z-盤，並在 Z-盤處連接相鄰的肌原纖維 (Huff-Lonergan and Lonergan, 1999)，對維持肌纖維的拉張力(tension)強度和結構完整性，結蛋白中間肌絲是不可欠缺的。肌萎縮蛋白(400 kDa)為肋狀體的主要組成分，是富含紐蛋素的亞肌膜橫向細胞骨架(sub-sarcolemmal transverse cytoskeleton)，透過 C 末端與跨膜蛋白(transmembrane proteins)結合，以及透過 N-末端與纖維狀(F-)肌動蛋白肌絲(fibrillary actin/F-actin filaments)結合。 $\alpha$ -輔肌動蛋白已知是脊椎動物肌肉中 Z-盤的主要組成分，連結相鄰的肌小節，結構強大而足以傳遞由個別肌小節的細肌絲和粗肌絲交互作用所產生的拉張力。在骨骼肌的肌原纖維中， $\alpha$ -輔肌動蛋白與 Z-盤

的穩定性及組織有關(Goll *et al.*, 1991; Vigoreaux, 1994)。

肌凝蛋白是約 500 kDa 不對稱的六聚體蛋白質，包含數個結構和功能區域(domains)，肌凝蛋白組合成為粗肌絲，在肌肉中的功能形式。聚合成為細肌絲的肌動蛋白是肌肉中含量第二多的蛋白質，肌動蛋白細肌絲和肌凝蛋白粗肌絲之間的交互作用產生肌肉收縮力。聯結蛋白是肌原纖維中第三高含量的蛋白質，迄今發現的最大蛋白質(3000~3700 kDa) (Huff-Lonergan *et al.*, 2010)，在活生的骨骼肌，肌聯蛋白約占肌原纖維的總彈性的 30% (Takahashi and Saito, 1979)，占魚類肌肉的肌原纖維蛋白質總量的 13% (Seki and Watanabe, 1984)；由  $\alpha$ -肌聯蛋白(titin-1)及  $\beta$ -肌聯蛋白(titin-2)組成，以很薄的彈性肌絲形式存在，將 Z-盤的  $\text{NH}_2$ -末端連接至肌凝蛋白肌絲的  $\text{COOH}$ -末端區域(Maruyama, 1997)，亦即在橫紋肌細胞中，聯結蛋白至少有兩項的功能：提供模板(template)給肌凝蛋白粗肌絲、結合 Z-線中的  $\alpha$ -輔肌動蛋白(Koretz *et al.*, 1993)

而作為粗肌絲和肌小節的 Z-線之間的彈性連接元件(Wang and Jeng, 1992; Joseph *et al.*, 2001)。骨骼肌肌原纖維的另一重要組成分為伴肌動蛋白，與肌動蛋白細肌絲一同構成不可伸長的肌絲，座落於 I-帶的伴肌動蛋白是另一種高分子量蛋白質(600~900 kDa)，約占肌原纖維蛋白質總量的 3~4%，伴肌動蛋白肌絲的一端繫在 Z-線，並與肌聯蛋白肌絲平行，這些肌絲可能參與肌動蛋白肌絲的維持與調節(Huff-Lonergan *et al.*, 2010)。肌肉蛋白質的原肌凝蛋白及肌鈣蛋白都與肌肉收縮的調節密切關連，和肌動蛋白結合在一起的複合肌絲即是細肌絲；原肌凝蛋白是一種二聚體蛋白質，魚類肌肉中的原肌凝蛋白的同功型分佈已廣泛探討(Heeley and Hong, 1994)，肌鈣蛋白包含三個組成分，各司有特定功能，肌鈣蛋白-C 結合  $Ca^{2+}$ ，肌鈣蛋白-I 抑制肌動凝蛋白(actomyosin)的 ATPase 活性，肌鈣蛋白-T 提供讓肌鈣蛋白結合至原肌凝蛋白(圖 9)。

在骨骼肌中，[細]胞外基質

(extracellular matrix)或結締組織在結構上和功能上都很複雜(McCormick, 1994; Purslow, 1999)。膠原蛋白是胞外基質的主要成分，負責肌隔的完整性和肌肉的機械性質。結締組織是由封包肌肉的外肌膜、包圍肌纖維束的肌束膜及圍繞各別肌纖維的內肌膜等組成。在硬骨魚肌肉，膠原蛋白的主要兩種類型為 I 型和 V 型，各有不同的生化特性(Bremner, 1992; Sato *et al.*, 1989)。

#### 5. 海產食品的蛋白質分類(Tahergorabi *et al.*, 2011; Coppes Petricorena, 2015)

蛋白質是海產食品肌肉組織的最重要部分，占(濕重) 15~25% (Connell, 1980)。魚體重的 50~60%是肌肉，主要組成分為蛋白質(16~21%)，其餘為脂質(0.5~2.3%)、灰分(1.2~1.5%)及碳水化合物(0.5%左右)，水分 52~82%。魚類具有兩種肌肉類型：白色肌(普通肉)及紅色肌(血合肉)，白肉魚例如鱈魚(cod)及黑線鱈(haddock)的血合肉比率很低，而多脂魚

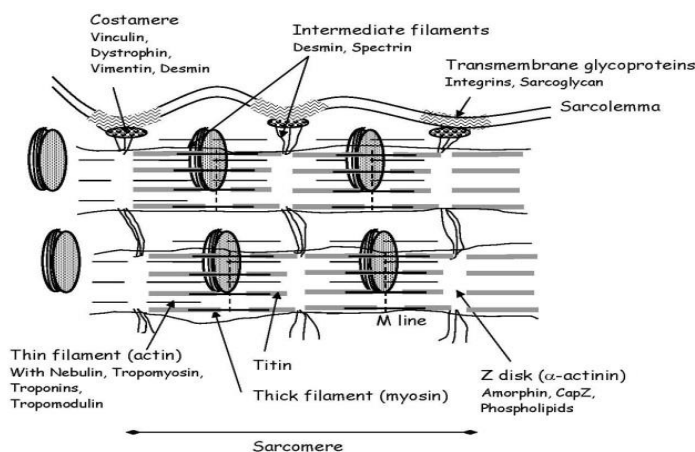


圖 9. 肌原纖維組織的示意圖。來源：Trinick (1994)及 Campbell (1995)。

(fatty fish) 例如 鱈魚 (herring) 及 鯖魚 (mackerel) 的血合肉比率高；但是，普通肉含較多的蛋白質(18~23%)。魚類蛋白質根據溶解性的特徵而分為三大類：肌原纖維蛋白質、肌漿蛋白質和基質蛋白質(stroma proteins)等，分別占肌肉蛋白質總量的 70~80%、20~30% 及 3%。

### (1) 肌原纖維蛋白質

構成肌原纖維的蛋白質，可溶於濃鹽溶液(離子強度 0.6 以上)，但在魚肉的常態生理離子強度下則不溶於水(在虹鱖，離子強度約 0.05)。肌原纖維蛋白質主要由肌凝蛋白(占 65~78%)組成，以及肌動蛋白、原肌凝蛋白、M-蛋白質(M-protein)、 $\alpha$ -輔肌動蛋白、 $\beta$ -輔肌動蛋白、c-蛋白質(c-protein) 及肌鈣蛋白-I/C 等(Vareltzis, 2000)，此外，在無脊椎動物發現的副肌凝蛋白(paramyosin)，脊椎動物的肌原纖維中並不存在，含量因種類而不同(Vercruyssen *et al.*, 2005)。魚類死後肌肉的縮短與其 pH 變化、以及蛋白質水解會導致肌原纖維的崩解，因而魚肉質地改變(Coppes Petricorena *et al.* 2002; Coppes Petricorena, 2011)。

肌原纖維蛋白質提供許多水產加工食品所需的功能特性。通常，海產食品的肌原纖維蛋白質的熱穩定性低於來自陸地動物者，pH 和離子強度等也影響熱穩定性，因而也影響熱誘導變性(heat-induced denaturation)。冷水域魚種的肌原纖維蛋白質穩定性通常低於溫水域種類者，此意謂兩海產食品的死後處置和冷凍條件要有所不同。蛋白質的膠化

(gelation) 與質地形成有關的流變性質(rheological properties)，以及進而消費者接受性等主要都取決於肌原纖維蛋白質的品質，但也會受到海產原料的種類、年齡、季節性、鮮度和加工參數例如蛋白質濃度、pH、離子強度和溫度等影響(Suzuki, 1981)。魚類肌肉組織的構造，如圖 10 所示。

肌動蛋白占魚類肌肉的肌原纖維蛋白質總量的 20% 左右。肌動蛋白萃取容易，但這特性卻衍生了問題，即要分離純化肌凝蛋白時，因一起萃出的肌動蛋白在溶液中會自發地形成肌動凝蛋白複合物，而阻礙肌凝蛋白的分離，因此，肌動凝蛋白是鹽溶性魚類肌肉蛋白質的主要形式。原肌凝蛋白和肌鈣蛋白調節肌肉的收縮，前者的分子量 68 kDa，含兩個次單元，是熱穩定性最高的肌肉蛋白質，容易

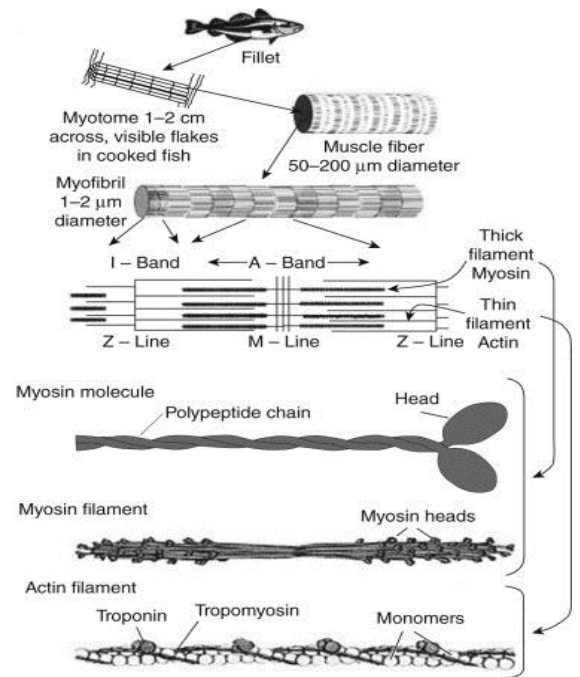


圖 10. 魚類肌肉組織的構造。來源：Hedges *et al.* (2002)。

純化取得。在肌肉收縮過程中，肌鈣蛋白是原肌凝蛋白作為鬆弛因子(relaxation factor)時所需的蛋白質。肌原纖維蛋白質的水溶解性會因溫度、pH 和離子強度而改變，過於偏酸或鹼性的 pH 和高溫都會造成蛋白質變性，使溶解度降低(Suzuki, 1981)。

## (2)肌漿蛋白質

由於大多數的組成分是肌紅素和水解酶(hydrolases)、氧化還原酶(oxidoreductases)、轉移酶(transferases)、磷酸化酶(phosphorylase)、磷酸果糖激酶(phosphofructose kinase)和轉麩醯胺酶(transglutaminase)，因此肌漿蛋白質的大部分被認為是酵素，然而，這群蛋白質通常會被膜蛋白污染，膜蛋白並非一定是可溶的。每種蛋白質的含量在種類之間的變動很大，例如有軟體類不含肌紅素。肌漿蛋白質含有稱為肌蛋白/肌凝蛋白原(myogen)的幾種各自類型的水溶性蛋白質，由於是完全水溶的，只要按壓魚肉組織或以低離子強度鹽水溶液萃取，就可自魚肉分離取得。與底棲魚類例如比目魚(plaice)和鯛魚(snapper)比較，表層魚類(pelagic fish)如沙丁魚(sardine)和鯖魚的肌漿蛋白質含量通常較高。由於肌漿蛋白質不會凝膠且保水力差，可能因而干擾膠體形成過程中肌凝蛋白之間的交聯(Sikorski *et al.*, 1994)。肌漿蛋白質包括肌紅素、血紅素(hemoglobin)、球蛋白(globins)、白蛋白(albumins)和一些水溶性的酵素等(Connell, 1980)。在海產食品加工業，魚種

鑑定是項重要的課題，有些國家甚至要求在包裝上標示魚種。十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)被應用於種類的鑑定，肌漿蛋白質作為標靶蛋白質(target proteins) (An *et al.*, 1989)。

## (3)基質蛋白質

通常，肌肉蛋白質含約 3%基質蛋白質，主要是由膠原蛋白及彈性蛋白(elastin)組成，在肌肉構造中，基質蛋白質構成結締組織。這些蛋白質完全不溶於水、酸或鹼溶液、或生理鹽水溶液都無法萃取。彈性蛋白非常耐濕熱，烹飪也不會影響。和普通肉比較，血合肉含有較多的基質蛋白質，但肌漿蛋白質含量較少。在一些魚類例如鯊魚(shark)、魷(ray)及鱈(skate)，基質蛋白質占總肌肉蛋白質的 10% (w/w) (Venugopal, 2009)。

## 三、主要肌肉組成分的生化性質(Listrat *et al.*, 2016)

骨骼肌大約含 75%水、20%蛋白質、1~10%脂肪及 1%肝醣。主要肌肉組成分的生化性質說明如下述。

### 1.肌纖維

肌纖維通常以其收縮和代謝性質為特徵(Lefaucheur, 2010; Astruc, 2014c)。收縮性質主要取決於粗肌絲中的肌凝蛋白重鏈同功型(myosin heavy-chain isoforms; MyHCs)，在大多數成熟哺乳動物的骨骼橫紋肌中，所表現的 MyHC 有四種類型：



I、IIa、IIx 和 IIb，這些 MyHCs 的 ATP 酶活性與收縮速度有關：慢速的(I 型)和快速的(IIa、IIx 和 IIb 型)，I 型纖維的收縮強度低但抗疲勞，在姿勢肌(postural muscle)和呼吸肌(respiratory muscle)中占大部分。肌肉收縮需要來自 ATP 的能量，但不同類型的肌纖維彼此的能量需求差異大(Picard *et al.*, 1998)。

肌肉中 ATP 的再生有兩種主要途徑，其一為氧化的(需氧的)途徑(oxidative pathway)，經由線粒體將丙酮酸(pyruvic acid)氧化，另一為醱解的(厭氧的)途徑(glycolytic pathway)，在肌漿內將丙酮酸轉變為乳酸，這兩途徑的相對重要性決定了代謝纖維(metabolic fiber)的類型：氧化型(紅色肌；富含氧氣載體和肌紅素)、或醱解型(白色肌；因氧氣需求的受限大，肌紅素幾乎不存在)。一般而言，比起醱解型白色纖維，氧化型紅色纖維的斷面積較小，

但纖維類型之間的差異程度也會因肌肉、以及同一肌肉內而改變，例如豬的半腱肌(semi-tendinosus muscle)紅色部位，氧化型纖維的斷面積大於醱解型者(Realini *et al.*, 2013)，牛的腹直肌(*Rectus abdominis* muscle)中的氧化型紅色纖維斷面積也大於白色醱解型纖維(Oury *et al.*, 2010)。肌纖維是動態的結構，可根據以下的途徑從某一類型轉變為另一類型：I ↔ IIA ↔ IIX ↔ IIB (Meunier *et al.*, 2010)。成熟哺乳動物骨骼肌的不同類型纖維類的性質，整理列表 2。不論種類，決定肌纖維組成的最重要因素是肌肉類型，這很可能與其特定的生理功能有關。任何肌肉其纖維的組成都依種類而變化，因此，豬最長肌(*Longissimus* muscle)所含的 I、IIA、IIX 和 IIB 型纖維分別約 10%、10%、25% 及 55%，牛最長肌中的 I、IIA 和 IIX 型纖維平均含 30%、18% 及 52%。肌纖維的組成

表 2 各種肌肉纖維類型的生物特徵(Lefaucheur, 2010)

	I	IIA	IIX	IIB
收縮速率 Contraction speed	+	+++	++++	+++++
肌原纖維ATP酶 Myofibrillar ATPase	+	+++	++++	+++++
收縮閾值 Contraction threshold	+	+++	++++	+++++
每日收縮時間 Contraction time per day	+++++	++++	+++	+
抗疲勞 Fatigue resistance	+++++	++++	++	+
氧化型代謝 Oxidative metabolism	+++++	++++	++	+
醱解型代謝 Glycolytic metabolism	+	++++	++++	+++++
肌酸磷酸 Phosphocreatine	+	+++++	+++++	+++++
肝醣 Glycogen	+	+++++	++++	+++++
三酸甘油酯 Triglyceride	+++++	+++	+	+
磷脂質 Phospholipids	+++++	++++	+++	+
血管形成 Vascularization	+++++	+++	+, ++	+
肌紅素 Myoglobin	+++++	++++	++	+
緩衝能力 Buffering capacity	+	+++	+++++	+++++
Z-線寬度 Z-line width	+++++	+++	+++	+
直徑 Diameter	++	+, ++	++++	+++++

註：+, 很低；++, 低；+++，中；++++，高；+++++，很高。

也受到品種、性別、年齡、活動量、環境溫度和飼養方法等的影響。

魚類也表現以收縮和代謝性質為特徵的不同肌纖維類型，但對照哺乳動物或鳥類，可觀察到魚類的兩種主要纖維類型之間是解剖學上隔離的，例如在鱒魚，快速纖維(fast fibers) (類似於哺乳動物的 IIB 纖維)位於魚體橫切面的中心，慢速纖維(slow fibers) (類似於哺乳動物的 I 型)存在於皮膚下方順沿著側線的周邊(Mascarello *et al.*, 1986)，除這兩種主要纖維類型之外，在某些魚種或發育階段也發現次要的類型，如中間類型的粉紅纖維(pink fiber) 類型(相當於 IIA 類型)。這白色和紅色纖維兩種主要類型分別與快速、慢速 MyHC 的表現有關(Rescan *et al.*, 2001)，但由於魚類中同樣的纖維內會有數種 MyHCs 同時存在，特別在直徑小的肌纖維中，故要將一種 MyHC 同功型與纖維類型做系統性地對照是有所困難的。

## 2. 肌內結締組織

圍繞肌纖維和肌纖維束的結締組織是鬆散的，由細胞和胞外基質組成，後者主要由包裹在蛋白聚醣(proteoglycans; PGs)基質中的膠原蛋白纖維的複合網狀物組成(Abbott, 1977; Bailey and Light, 1989; Astruc, 2014a)。膠原蛋白是纖維狀蛋白質的一個家族，不論類型，其基本結構單元(原膠原蛋白)是一種螺旋結構，三條互相纏繞形成的螺旋狀多肽鏈組成，原膠原蛋白分子透過鏈間的鍵結而穩定並形成直徑 50 nm 的纖維，這些纖維經由分子

內的鍵結(雙硫鍵或氫鍵)或分子間的鍵結(包括吡啶啉 pyridinoline 和脫氧吡啶啉 deoxypyridinoline)亦即交聯而趨於穩定。骨骼肌中發現各種類型的膠原蛋白，纖維狀膠原蛋白 I 型和 III 型是哺乳動物的主要類型(Bailey and Light, 1989)，在魚類則以膠原蛋白 I 型和 V 型居多(Sato *et al.*, 1991)。結締組織的其它主要組成分為 PGs (Nishimura, 2015)，PGs 是複合的多功能分子，由一個分子量 40~350 kDa 的核心蛋白質以共價鍵結合數十個糖胺聚醣鏈(glycosaminoglycan chains)而組成，並透過結合其它的 PG 和纖維狀蛋白(例如膠原蛋白)形成更大分子的複合物，另也結合陽離子(如鈉、鉀和鈣)和水(Iozzo and Schaefer, 2015)。肌肉中的膠原蛋白的交聯比例和程度，取決於肌肉類型、種類、基因型(genotype)、年齡、雌雄和身體運動量(Purslow, 2005)。膠原蛋白總含量占成年牛肌肉乾重的 1%至 15%，在商業屠宰體型大白豬的肌肉乾重介於 1.3% (腰大肌 *Psoas major*)至 3.3% (背闊肌 *Latissimus dorsi*) (Lebret *et al.*, 1998)，禽類的膠原蛋白佔肌肉乾重的 0.75~2% (Liu *et al.*, 1996)，在魚類也因魚種如從沙丁魚的 1% 至海鰻的 10% (Sato *et al.*, 1986)、以及即使同一種類和魚體前後段(尾部的量更多)的不同等而變動(Sikorski *et al.*, 1984)。PGs 只占肌肉乾重的一小部分(依肌肉而定，在牛 0.05%至 0.5%) (Dubost *et al.*, 2013)。

## 3. 肌內脂

魚類的肌內脂含量也是因種類而

異，從寡脂魚(lean fish)種類如鱈魚(cod)的 3% 以下至多脂魚種如大西洋鮭魚(Atlantic salmon)的 10% 以上(Hocquette *et al.*, 2010)，同一魚種之內也變動大，例如鮭魚肉的脂肪含量在 8% 至 24% 之間變動(Mørkøre *et al.*, 2001)。

#### 四、魚類死後的肌肉代謝與肌肉收縮

##### 1. 肌肉代謝(Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)

血液循環與氧氣供應停止之後，貯藏肝醣很快地處於厭氧下降解，乳酸蓄積於肌肉(Nazir and Magar, 1963; Iwamoto *et al.*, 1988; Watabe *et al.*, 1989)，導致魚肉 pH 從 7.4 附近降至 6，有時更低(Iwamoto *et al.*, 1988; Watabe *et al.*, 1989; Church, 1998)。死後數小時內(Mestre Prates, 2002)，肌肉滲透壓升高，ATP 量下降(Nazir and Magar, 1963; Iwamoto *et al.*, 1988; Watabe *et al.*, 1989)，氧化三甲胺(trimethylamine oxide)被內源性酵素作用及後來繁殖的細菌(當微生物活性出現)轉變為三甲胺(trimethylamine) (Church, 1998)，一氧化氮(NO)和活性氧(reactive species of oxygen)量也增加(Harper, 1999)。由於 pH 下降及滲透壓變化，線粒體和肌漿網變質而導致細胞溶質(cytosol)釋出鈣離子，游離鈣的濃度可達 0.2 mM (Mestre Prates, 2002)。

死後僵直(rigor mortis)的發生與程度，在生化特徵上為高能量的化合物完全耗盡。ATP 的耗盡啟動死後僵直程序(Bate-Smith and Bendall, 1947; Jeacocke,

1984)，當 ATP 低於 2  $\mu$ M (Reedy and Holmes, 1965)，肌動蛋白和肌凝蛋白形成不可伸展的肌動凝蛋白，整個魚體變得僵硬。通常魚死後 1 至 6 小時後僵直開始(Watanabe and Turner, 1993)，但特別的是，0°C 貯藏鱸魚肌肉可延遲最長至死後 1.5 日。僵直狀態通常持續 1 日，然後死後僵直解除，肌肉不再那般剛硬，但原有的彈性已不復見。僵直受宰殺前緊迫的影響很大：對照組鮭魚在死後約 8 小時的平均僵直度達最大值，高度緊迫的魚在死後 30 分鐘就進入僵直階段(Sigholt *et al.*, 1997; Jerret and Holland, 1998; Skjervold *et al.*, 2001)。

死亡後一段時間，稱為嫩化之逆向程序在死後數小時內開始，並一直持續至貯存期間。魚(Ando *et al.*, 1991)和哺乳動物(Koohmaraie, 1996)在死後貯藏的初期，嫩化即開始。而被降解的主要結構為連結至肌小節和至原生質膜的細胞骨架(cytoskeletal) (Taylor *et al.*, 1995; Steen *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 2002)，但也有研究提出，胞外基質結構的逐漸碎解(disintegration)也導致魚肉的嫩化(Ando *et al.*, 1993)。嫩化的速度和程度依據種類和其它因素而變化，特別是比起深海魚類，在表層魚類肌肉的降解更快速(Watabe *et al.*, 1989)。

##### 2. 肌肉收縮(Eskin *et al.*, 2013)

雖大多數研究都以哺乳類動物肌肉為對象，很明顯的，在魚類肌肉也發生同樣的變化。魚類肌肉由紅色肌和白色肌兩

類型組成，兩者的僵直收縮 (rigor contraction) 不同。雖兩類型的比例因種類而不同，紅色肌都未超過全部肌肉的 10%，例如鮪魚(tuna)。Obatake and Heya (1985) 採用快速直接重量法測量 16 種煮熟魚的血合肉和白色肌含量，紅肉魚如沙丁魚、秋刀魚(saury pike)、圓花鰹(frigate mackerel)、鯵魚(frigate herring)、圓腹鯵(round herring)、花腹鯵(common mackerel) 等的血合肉占全部肌肉的 12% 以上，在真鱈(竹筴魚)、斑鰈(gizzard shad)、花身雞魚(tigerfish)、三線雞魚(grunt) 等中間型魚種介於 4~9%，而多帶海緋鯉(goatfish)、金線紅姑魚(golden thread)、黃鱔(yellow sea bream) 和沙鰈(silago) 等白肉魚的比例低於 3%。暗色或紅色肌的特徵為含有高量的肌紅素、以及特別的蛋白質(Hamoir and Konosu, 1965)，與白色肌比較，魚類的血合肉萃取物含有較多量的含氮組成分(nitrogen constituents) 及肌酸(Obatake et al., 1985)。

魚類紅色肌的僵直收縮遠大於白色肌，更接近哺乳動物紅色肌的收縮程度(Buttkus, 1963)。死後魚類肌肉中，與死後僵直的進展有關的收縮、拉張力(tension) 和彈性(elasticity) 等的作用仍知之甚少。Bate-Smith and Bendall (1956) 發現兔肌肉在僵直期間明顯縮短，但未連帶產生僵硬(stiffening)，且室溫下也很少發生。反之，長蛇齒單線魚(lingcod) 和鱒魚(trout) 的紅色肌都在 20°C 發生死後收縮(postmortem contraction)，收縮速率可作為死前魚狀況

的指標(Buttkus, 1963)。

當魚體處於由 Cutting (1939) 最早提議的僵直前(prerigor)、完全僵直(full rigor) 和僵直後(postrigor) 等不同的階段，Trucco et al. (1982) 指出：採用視覺和觸覺方式判定魚肉的剛性(rigidity) 仍是再現性最佳的方法，其結果顯示：嘉鱈(*Sparus pagnes*) 費時 10 小時進入死後僵直，約 30 小時後開始解除，而鰵魚(anchovy) 需約 55 小時，但一直至 80 小時後死後僵直的解除才明顯。Bito et al. (1983) 開發利用剛性/僵直指數(rigor index) 的方法來確定魚類的死後僵直階段，將整條魚的上半段放置平台上，下半段尾部懸吊離開邊緣，每隔一定的時間測量尾鰭基部與檯面之間的垂直距離(L)，計算僵直指數(%) =  $[(L_0 - L)/L_0] \times 100\%$ ，其中  $L_0$  是死後立即測量的值，L 值為不同時間後的值。

Wang et al. (1998) 採用僵直指數來檢討養殖大西洋鮭(*Salmo salar*) 的死後僵直和 ATP 降解，所取得的數據與以黏度作為嘉鱈的僵直指標所觀察得到的樣式(Crupkin et al., 1979) 相同，即大西洋鮭魚死後 8 小時開始僵直，24~30 小時後達最高值，60~70 小時後僵直完全解除。依據僵直指數將魚類分類為不同的階段：僵直之前的無僵硬(僵直指數 < 10%)、死後僵直中的完全僵硬(僵直指數 < 100%) 和僵直後(僵直指數 < 10%)，大西洋鮭魚肌肉的 ATP 含量從 7.25  $\mu\text{mole/g}$  降至死後僵直中的 0.14  $\mu\text{mole/g}$ ，此與鱈魚(plaice) 達 100% 僵直指數時的 ATP 降為 < 1  $\mu\text{mole/g}$



(Iwamoto *et al.*, 1987)的結果一致。大西洋鮭魚在僵直前、僵直中和僵直後階段的 K 值分別從 0.7% 升至 10.6%、再升至 41.1%，這些數值都落入未緊迫養殖大西洋鮭魚所測得的範圍內(Erikson *et al.*, 1997)。

## 五、魚類死後肌肉構造的變化 (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2015)

除了在冷藏後期發生由微生物活性引起的肌肉腐敗，僵直解除之後魚類鮮度的逐漸下降，可歸因於綜合了生化、物理和結構變化等的影響。肌原纖維和胞外基質的重要結構蛋白質的蛋白質水解斷裂 (proteolytic cleavage)，以及死後肌肉中肋狀體(將肌原纖維連接肌膜的 Z 盤之關連構造)和中間肌絲蛋白 (intermediate filament proteins) (參與肌原纖維之間的聯繫之蛋白質)都和組織的軟化有關 (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)，肌肉中的這些死後變化從僵直之前即開始，並持續至整個貯藏期間。Hernández-Herrero *et al.* (2003)指出，比起肌原纖維蛋白質，魚類軟化的原因更多是由於結締組織蛋白質的降解，但這樣方式的降解發生在漁獲後冷藏的後期。同樣，在死後的熟成(4°C 貯藏)期間，牛肌內結締組織蛋白質的機械強度變化緩慢，死後 10 日幾乎仍無變化，其後才漸次地下降，因此，肌內結締組織似會影響牛肉長時間熟成時的嫩化 (Nishimura *et al.*, 1998)。相較之下，主要

肌原纖維蛋白質的蛋白質水解，使魚類死後貯藏早期階段的肌肉軟化進展更快 (Taylor *et al.*, 2002)，在死後魚類肌肉，也常見到醣解酵素含量多的肌漿蛋白質發生降解(Hernández-Herrero *et al.*, 2003)。

與死後魚類軟化有關的內源性肌肉蛋白酶，包括細胞溶質的鈣蛋白酶、溶酶體的組織蛋白酶和包含彈性蛋白酶和膠原蛋白酶組成的結締組織蛋白酶。關於在死後貯藏初期魚類組織的質地變質，特別重要的酵素包括鈣蛋白酶( $\mu$ -和 m-鈣蛋白酶)及組織蛋白酶 B/H/L，以及天門冬胺酸組織蛋白酶 D 等。相配合時，死後的理化條件(包括低溫、pH 降低及相對升高的肌肉離子強度等)可能與內源性肌肉蛋白質水解酵素之間以協同方式(synergy)作用，從而改變蛋白質的交互作用及構形 (conformation) (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)。

### 1. 早期細胞內事件引起肌原纖維的斷片化

捕撈後貯藏早期所發生肌原纖維的斷片化(fragmentation)，加上隨後細菌的增殖與作用而導致最終漁獲物的腐敗。死後數分鐘內，肌肉中即發生一些的生化學變化，氧氣濃度急速下降，肌肉很快轉變成厭氧狀態。捕撈後魚類肌肉中的生化學變化，包括磷酸肌酸(phosphocreatine)和肝醣含量迅速減少，乳酸增加，ATP 量降低及三甲胺(trimethylamine)含量緩增 (Nazir and Magar, 1963; Pawar and Magar, 1965)，此外，脂質氧化、肌苷(inosine)和次黃嘌呤(hypoxanthine)濃度上升

(Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)。

捕撈後數小時內，魚類肌肉的最明顯變化為死後僵直的發生。僵直之前，肌肉可伸展的狀態仍持續數小時，利用肌酸磷酸和肝醣儲備來維持 ATP 的恆定供應，但當 ATP 量下降，尤其在細胞內的濃度低於 2  $\mu\text{M}$ ，即啟動肌肉的死後僵直程序。肌動蛋白和肌凝蛋白形成永久性的結合體，導致肌肉喪失收縮或伸展的能力，最後肌肉變僵硬(Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)。在僵直後階段，僵直的解除提高了肌肉的嫩化，主要是由於肌肉蛋白質受到內源性鈣蛋白酶和組織蛋白酶的水解所致(Ayala *et al.*, 2010)，但也有研究指出，死後魚類軟化的進展與死後僵直的解除無關(Ando *et al.*, 1991)。

## 2. 內源性肌肉蛋白酶的活化

在捕撈後的貯藏中，隨著肌肉滲透壓的升高和肌肉 pH 的快速降低，一些生化變化也隨同發生(Wang *et al.*, 1998)。死後肌肉 pH 和肌內離子強度的變化，可能是活化或抑制蛋白酶的活性，以及透過調節肌原纖維蛋白質的構形之方式，使之更易受到蛋白質水解的斷裂(Yates *et al.*, 1983)。肌肉 pH 從漁獲後中性 pH 緩慢降至最終 pH 6 或以下(Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)，哺乳動物肌肉中的肌內離子強度從死前約 165 mM 氯化鈉，上升至死後 275~295 mM 氯化鈉(Winger and Pope, 1981)，這些情況造成肌漿網、線粒體和溶酶體等膜的失序。肌漿鈣離子(sarcoplasmic calcium ions)的升高會活化

$\mu$ -和 m-鈣蛋白酶，依鈣離子的濃度而定。由於肌肉酸化(acidification) (pH 6.0~5.0)而引起溶酶體膜的破壞，提高組織蛋白酶的滲出與流入細胞溶質(Dutson, 1983)，這些蛋白酶的活化或協同作用導致魚類肌原纖維的自家消化，以及伴隨而來死後魚肉的軟化(Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)。

## 3. 肌肉中主要的構造變化

魚類肌肉為連接肌隔之生肌節組織塊(tissue blocks)，這樣結構讓肉原本就柔軟的，特別當烹煮時，因為魚結締組織在較低的烹煮溫度下是可溶解的。可是，魚類的肌原纖維的死後結構變化非常少，且實際上比哺乳動物更穩定；牛肉和綿羊的結構變化已相當瞭解(Ho *et al.*, 1994; Taylor and Koochmarai, 1998; Taylor *et al.*, 1995)，即貯藏 7 天後 I-帶和肋狀體都明顯斷裂。但截然不同，魚類的 I-帶幾乎未斷裂(Busconi *et al.*, 1989; Papa *et al.*, 1997a; Taylor *et al.*, 2002)。如先前所述，魚類和哺乳動物的細胞骨架蛋白質(cytoskeletal proteins)在死後數天內就已降解，因此，魚類的肌原纖維的結構穩定性著實令人意外，可能的解釋是這些結果是根據 4 種精心處理樣品的電子顯微鏡觀察。事實上，當純化取得魚(Tsuchiya *et al.*, 1992; Geesink *et al.*, 2000)和哺乳動物(Olson *et al.*, 1976; Taylor *et al.*, 1995)的肌原纖維，並量化肌纖維的斷裂程度，兩結果都顯示死後大量的斷裂。因此，有必要採用機械性破壞方式來證明魚類肌纖維的易脆性(fragility)，瞭解肌纖維的斷片化指數

(fragmentation index)與魚類質地的相關。

魚類(Taylor *et al.*, 2002; Papa *et al.*, 1997b)和哺乳動物(Taylor *et al.*, 1995; Taylor and Koochmaraie, 1998)同樣在死後 24 小時內，顯示肌纖維與結締組織(內肌膜)的脫離(detachment)，這些斷裂的定量結果表明與魚片質地有關，且很可能也可以解釋許多早期的質地變化(Taylor *et al.*, 2002)。如上述，肋狀體的降解和內肌膜的脫離是由於鈣蛋白酶作用於細胞骨架蛋白質所致。哺乳動物(Taylor and Koochmaraie, 1998)和魚(Taylor *et al.*, 2002)的結締組織特別是內肌膜在死後是非常穩定，但會與肌纖維脫離。內肌膜的脫離是由於細胞骨架的斷裂如前所述，而不是結締組織的降解。內肌膜至少在哺乳動物也是熱穩定的，以掃描式電子顯微鏡觀察肌肉萃取物，肌束膜顯現出一些脆弱化(weakening)，但卻少見大量的斷裂(Ando *et al.*, 1993)。魚肉貯藏約 5 天後，肌隔發生斷裂，這斷裂與龜裂(gapping)有關(Bremner, 1992)。貯藏期間，肌隔的力學性質也下降(Love *et al.*, 1972a)，熱穩定性很差(Yamaguchi *et al.*, 1976)，結締組織的易脆性造成了魚片龜裂和長期貯藏的質地變化(Taylor *et al.*, 2002)。

死後貯藏提供了讓維持肌肉微細結構之主要肌原纖維與關連的蛋白質發生蛋白質水解的降解(proteolytic degradation)，這些變化可能包括 Z-盤的脆弱化、肋狀體的釋出、結蛋白和肌肉萎縮蛋白的崩解、 $\alpha$ -輔肌動蛋白的消失、伴肌

動蛋白與肌聯蛋白與肌鈣蛋白-T 的蛋白質水解，還有肌凝蛋白和肌動蛋白的降解、原肌凝蛋白的非定域化(delocalization)等。整體上，這些的死後變化造成了肌原纖維的斷片化及脆弱化、失去肌肉細胞完整性、以及最後在貯藏時魚類肌肉的嫩化(Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)。死後貯藏期間許多的結構性肌肉蛋白質都被修飾，進一步的瞭解請參考 Ahmed *et al.* (2015)的綜述。

## 六、蛋白質水解與其引起的肌肉變化

### 1. 蛋白質水解(Toldrá and Reig, 2016)

蛋白質水解是包括蛋白質的降解和小分子胜肽及游離胺基酸的生成之生化現象。肌肉蛋白酶(組織蛋白酶 B 及 L 為主)在微酸性條件和鈣蛋白酶在中性 pH 下是有活性的，在死後魚類的 pH 範圍能夠發揮作用，分解結構性肌原纖維蛋白質，產生大分子胜肽和蛋白質片段。這樣的分解影響及質地，使之軟化，而且大分子胜肽可被肌肉肽酶水解，產生小分子胜肽和游離胺基酸，這些都成為微生物可利用於繁殖的基質(substrates)及/或將胺基酸再轉化成其它化合物，例如生物胺(biogenic amines)或氨等的不良風味。

蛋白質水解也是魚類加工過程中重要的一群反應。實際上，蛋白質水解對質地的影響很大，從而牽連至魚的軟化傾向，因造成了負責肌肉構造的肌原纖維蛋白質的分解，另產生的胜肽和游離胺基酸，除直接影響滋味，也可作為進一步反

應的基質而貢獻香氣(Toldrá, 2006; Toldrá *et al.*, 2009)。通常，蛋白質水解為連續式的階段，首先，鈣蛋白酶和組織蛋白酶作用於主要的肌原纖維蛋白質，產生蛋白質斷片和中度分子大小的多肽(polypeptides)，然後再被二肽基(dipeptidyl)及三肽基(tripeptidyl)肽酶進一步水解為小肽，最後二肽酶(dipeptidase)、胺基肽酶和羧肽酶(carboxypeptidases)水解這些小分子肽而產生游離胺基酸。蛋白質水解的進展取決於加工條件、肌肉類型和內源性蛋白質水解酶的數量，例如溫度增高有利於酵素的作用，弱酸性 pH 會增強溶酶體的酵素(lysosomal enzymes)之組織蛋白酶活性。死後 pH 值的關係重大，因為不同的肽酶的表現活性取決於 pH 值，並且對蛋白質分解之影響可能也有所不同(Wang *et al.*, 2011)。魚肉採用含醋酸的石榴汁醃製，由於低 pH 條件下蛋白質分解的程度高，釋出多量的游離胺基酸(Demirok *et al.*, 2014)。蛋白酶也能水解肌原纖維和結締組

織之間的連結(Taylor *et al.*, 2002)，膠原蛋白纖維也可被蛋白酶降解且影響及質地(Sato *et al.*, 2002)。蛋白酶在海產動物肌肉的蛋白質水解中的作用，如圖 11 所示。

## 2. 在魚肉中觀察到的蛋白質水解 (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)

細胞骨架組成分的蛋白質水解，導致肌絲(myofilament)的降解(Busconi *et al.*, 1989; Ofstad *et al.*, 1996)。依種類而定，在魚類這可能包括：肌聯蛋白(Seki and Watanabe, 1984)、伴肌動蛋白(Astier *et al.*, 1991)、肌肉萎縮蛋白(Papa *et al.*, 1997b)等的降解， $\alpha$ -輔肌動蛋白的釋出(Tsuchiya and Seki, 1991; Papa *et al.*, 1996)，肌凝蛋白的蛋白質水解和原肌凝蛋白的非定域化(Astier *et al.*, 1991)。大菱魷(turbot)和沙丁魚中的結蛋白雖被降解，但在鱸魚(sea bass) (Verrez-Bagnis *et al.*, 1999)及石首魚(croaker) (Busconi *et al.*, 1989)並未發生。相反地，死後的牛肌肉中，結蛋白是鈣蛋白酶的最佳基質，在 4°C 熟成過程已大部

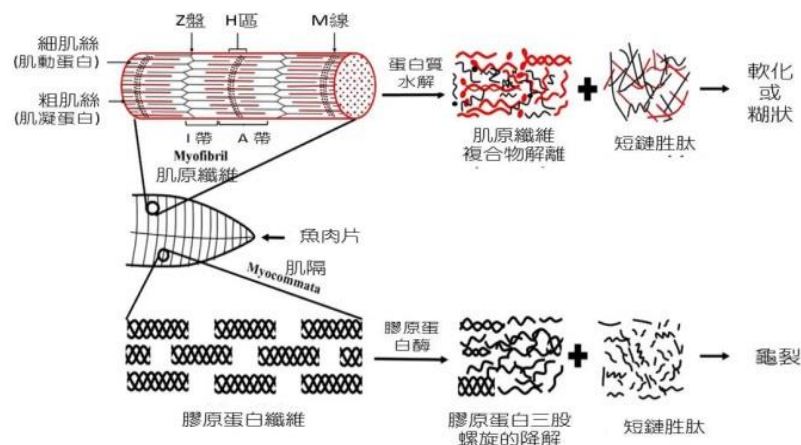


圖 11. 死後處置及貯藏期間海產動物肌肉蛋白質水解中的蛋白酶作用。改自 Singh and Benjakul (2018)。



分降解(Hwan and Bandman, 1989; Taylor *et al.*, 1995)，將肌小節與肌膜連結之肋狀體在死後 24 小時內也降解(Papa *et al.*, 1997b; Taylor *et al.*, 2002)，大多數的變化在不同魚種都是共同的，惟速率有所不同(Ingolfssdottir, 1997)。尤其是鱸魚肌肉的變化，包括肌膜的脫離、肌聯蛋白和伴肌動蛋白的降解、以及來自 Z-線的  $\alpha$ -輔肌動蛋白的釋出及蛋白質水解、肌肉萎縮蛋白的降解等(Astier *et al.*, 1991; Papa *et al.*, 1996; Papa *et al.*, 1997b)。鱸魚肌肉冷藏 4 天後的結蛋白仍未變化，但在沙丁魚已大部分降解(Verrez-Bagnis *et al.*, 1999)，一種 16 kDa 的肌漿蛋白質(鑑定為核苷二磷酸激酶 nucleoside diphosphate kinase)在貯藏後也發生蛋白質水解(Verrez-Bagnis *et al.*, 2001)。從肌原纖維中釋放出原肌凝蛋白；在死後 0~48 小時，原肌凝蛋白萃取量在 5 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid; 乙二醇雙氨乙基醚四乙酸)的存在下隨著時間而增加，採用 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  的萃取物中，原肌凝蛋白萃取量在 48 小時以後降低(Astier *et al.*, 1991)。

結締組織膠原蛋白在魚死後即被降解，從掃描式電子顯微鏡分析冰藏期間的肌肉，顯示肌隔之間和肌纖維之間的膠原蛋白接合(collagen junctions)逐漸地降解，可知膠原蛋白纖維網絡的結構變化與死後嫩化有關(Ando *et al.*, 1995)。肌細胞周圍的結締組織中膠原蛋白纖維受到組織破壞和降解，纖維之間的空隙也加大，Bremner (1992)綜述魚肉結構中的膠原蛋

白的作用，指出這主要的胞外基質組成成分主導決定生鮮肉的質地屬性。冷藏期間的膠原蛋白 V 型含量降低與魚肉的死後軟化有關(Sato *et al.*, 1997; Ando *et al.*, 1999; Shigemura *et al.*, 2003)，養殖大西洋鮭魚冰藏時，膠原蛋白分子間之交聯可能斷裂(Eckhoff *et al.*, 1998)，但大西洋鮭(Aidos *et al.*, 1999)和大比目魚(halibut) (Olsson *et al.*, 2003)貯藏期間膠原蛋白溶解度的變化並無顯著差異，一些研究也指出在死後魚肉中膠原蛋白是可溶解的，溶解度與質地、季節和水溫有關(Montero and Borderias, 1990; Sato *et al.*, 1991; Aidos *et al.*, 1999)。

### 3. 魚類和貝類的軟化(Singh and Benjakul, 2018)

魚死後，在死後處置和儲存期間發生變質，其 pH 值和高水分及蛋白質含量的狀態下，魚貝類容易受到酵素和微生物的作用而腐敗。魚類的變質通常分為：死後僵直(postmortem rigor)、解僵(resolution of rigor)、自家消化、細菌性腐敗(bacterial spoilage)等四個階段，這些階段發生的快慢與時程的不同，依種類、生理條件、微生物污染和溫度而定(Lougois and Kyranas, 2005)。在貯藏或運輸過程中，消化酵素可能被釋出，然後誘發大量的自家消化。腸胃道內的蛋白酶會造成胃壁的破裂和血液、水分的流出，這同時也伴隨蛋白質和脂肪(Pushparajan *et al.*, 2013)。另外，肌肉組織中的蛋白酶譬如組織蛋白酶和鈣蛋白酶能水解肌原纖維蛋白質，尤其

針對肌凝蛋白重鏈(MyHC)。太平洋牙鱈(Pacific whiting)冰藏 8 天期間，MyHC 明顯被降解，但肌動蛋白的水解少(Benjukul *et al.*, 1997)。組織蛋白酶可降解鱸魚白色肌的 MyHC 和  $\alpha$ -輔肌動蛋白，原肌凝蛋白和肌動蛋白易受組織蛋白酶 L 的作用，但肌鈣蛋白-T 不易被組織蛋白酶 D 水解，結蛋白能被組織蛋白酶 B 和 L 降解(Ladrat *et al.*, 2003)。由於肌肉組織中存在組織蛋白酶 B + L + L-類似(L-like)活性，當反應溫度為 55°C 時，鯖魚肌肉 MyHC 的最大降解速率在 pH 5.5 及 6.5 (Ho *et al.*, 2000)。鮭魚肌肉的 MyHC 明顯易被組織蛋白酶 D 所降解，同時出現水解產物 150 及 128 kDa 兩新片段、以及 4 個低分子量蛋白帶 (protein bands)，顯示肌動蛋白和原肌凝蛋白也都降解，另外出現的 100 kDa 蛋白帶，如假定是輔肌動蛋白，很可能它並未降解(Nielsen and Nielsen, 2001)。

與組織蛋白酶比較，鈣蛋白酶與肌原纖維蛋白質的斷裂的關連性較低，但已知它們會提高其它蛋白酶降解肌原纖維蛋白質的敏感性。從 26.5 kDa 蛋白質含量僅稍微減少之結果，推知  $\mu$ -鈣蛋白酶對鱸魚骨骼肌的肌漿蛋白質的作用有限(Verrez-Bagnis *et al.*, 2002)。Taylor *et al.* (1997)指出，肋狀體和中間肌絲的完全消失，這造成鈣蛋白酶處理的鱸魚白色肌中 Z-盤的脆弱化。通常，鈣蛋白酶經由切斷肌聯蛋白多肽肌絲而造成 Z-線的解體，其活性也減弱肌聯蛋白/ $\alpha$ -輔肌動蛋白間的交互作用，導致從 Z-線釋出原本的  $\alpha$ -輔肌

動蛋白，然後再被各種組織蛋白酶水解(Ladrat *et al.*, 2003)。

軟化或糊狀都和冰冷藏魚貝類肌肉蛋白質漸進地降解有關。膠原組織(collagenous tissue)的降解包含肌束膜和內肌膜結締組織、以及位於 Z-線和 H-區的蛋白質等，主要是蛋白酶的作用所引起(圖 11)。魚貝類肌肉的緊實結構大多是膠原蛋白所貢獻，因而膠原蛋白(I 型和 V 型)的碎解，導致於肌纖維的瓦解(disruption)和肉質的軟化(Kubota *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2009)。黃鰭鮪(yellowfin tuna)於 4°C 貯存 1 天內，通常都會發生膠原蛋白纖維(collagen fibrils)的崩解(Shigemura *et al.*, 2004)。Saito *et al.* (2000)指出，膠原蛋白 V 型的專一性酵素的存在，造成冷藏虹鱒(rainbow)和沙丁魚肌肉的軟化。在冷藏鱒魚肌肉，當膠原蛋白 V 型的溶解增加，肌肉緊實度(firmness)即降低，認為是膠原蛋白酶的作用(Sato *et al.*, 1991)。從太平洋藍鰹鮪(*Thunnus orientalis*)貯藏期間肌肉的組織學研究，也顯示細胞周圍的結締組織發生碎解(Nakamura *et al.*, 2005)。

貝類冰藏期間也發生軟化與糊狀的質地。大蝦於 5°C 貯藏 3 天後，肌肉的肌原纖維蛋白質中 Z-線的排列密度和次序都降低，4 至 6 天後 Z-線、I-帶和 M-線已逐漸破壞，至第 14 天肌肉的剪切力(shear force)從最初的 18.21 連續降為 10.79 N/cm(Pornrat *et al.*, 2007)。蝦類的頭胸部含有肝胰臟等各種器官，已知存在胺基肽酶、羧肽酶 A 和 B、組織蛋白酶 C、胰凝乳蛋白

酶和膠原蛋白酶等，具有肽酶和蛋白酶活性，可降解膠原蛋白的三重螺旋結構 (Garcia-Carreno *et al.*, 1994; Sriket *et al.*, 2011b)。淡水蝦類肝胰臟中的胰蛋白酶可迅速降解蝦肉的 I 型膠原蛋白 (Sriket *et al.*, 2011b)。

#### 4. 肌肉龜裂(gapping) (Singh and Benjakul, 2018)

肌肉組織的龜裂是與質地變化有關的另一現象。魚類及貝類的肉分割為肌細胞塊(blocks of muscle cells)，再被肌隔之結締組織分隔成生肌節(圖 11)，每個肌細胞或纖維都圍繞著結締組織，這些結締組織透過細膠原纖維而附著在肌細胞尾端的肌隔。在冷藏期間，這些的纖維受到內源性膠原蛋白酶的作用而變質 (Bremner and Hallett, 1985)，導致肌隔與肌肉層分離，因而引起魚片的龜裂(圖 11)。絲胺酸蛋白酶(serine protease)、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶能切斷結締組織，而引起魚片的龜裂。達 17° C 時，大西洋鱈魚(Pacific cod)都會發生龜裂，可能由於結締組織的降解和高溫僵直，使得肌肉迅速收縮所致 (Lødemel and Olsen, 2003)。大西洋鱈魚、斑點狼魚(wolffish)和大西洋鮭魚在冰藏期間也出現龜裂，已知基質絲胺酸蛋白酶(matrix serine proteases; MSPs)和基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteases; MMPs)可切斷數種的胞外基質蛋白質，例如膠原纖維。斑點狼魚和鱈魚肌肉中測出 MSPs 活性，但鮭魚肌肉僅有 MMP 活性 (Lødemel and Olsen, 2003)。Kubota *et al.* (2003) 證實

MMP-9 會影響魚肉的龜裂，當鈣離子存在及 pH 7-9 時，這些酵素的活性最大 (Saito *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2008; Sriket, 2014)；大眼鯛(bigeye snapper)的魚皮也含有能降解膠原蛋白的  $\beta$ -、 $\alpha_1$ -和  $\alpha_2$ -鏈之蛋白酶 (Nalinanon *et al.*, 2008)。

#### 5. 熱加工過程中魚肉膠體的脆弱化/軟化 (Singh and Benjakul, 2018)

加熱或烹煮時，有些魚類會發生液化(liquefaction)或軟化，被消費者拒受。煮熟太平洋鱈魚肉的糊狀是原生動物寄生蟲的黏孢子蟲(Myxosporea)感染而引起，因在魚肉內分泌蛋白酶 (Tsuyuki *et al.*, 1982)。除了魚肉，魚肉產品尤其煉製品膠體(fish gels)的質地軟化也是項問題，因為市場價值和消費者接受度降低。魚漿(surimi/fish mince)會受到內源性蛋白酶的降解 (Benjakul *et al.*, 2003d; Zhou and Li-Chan, 2009)，魚漿膠體加熱時，內源性熱活化(heat-activated)蛋白酶介入肌肉蛋白質的降解，導致於膠體軟弱，膠體軟化或膠體脆弱化在日文稱為 modori (Benjakul *et al.*, 2004)。肌肉組織中的蛋白酶在 50°C 附近至 60°C 時的活性高，引發肌原纖維蛋白質尤其肌凝蛋白重鏈(MyHC)的降解快速且激烈，相對的肌動蛋白的水解程度低而較穩定 (Benjakul *et al.*, 2003a)，魚漿膠體的脆弱化(modori 現象)因魚種的不同而差異大。魚類肌肉組織中發現的主要蛋白酶種類也因魚種而異，可分為兩群：組織蛋白酶和熱穩定鹼性蛋白酶(heat-stable alkaline proteases)。在

太平洋牙鱈和美洲箭齒鰈 (arrowtooth flounder) (Wasson *et al.*, 1993)、以及大麻哈魚(chum salmon)、鯖魚(Lee *et al.*, 2016) 等都存在組織蛋白酶 B、H 和 L 所介導的高活性半胱胺酸蛋白酶 (cysteine protease)，在白帶魚(lizardfish)也發現與肌原纖維關連的絲胺酸蛋白酶在 55~60°C 間水解 MyHC (Cao *et al.*, 2000a)。相對於曳絲大眼鯛(*Priacanthus taayenus*)，大眼鯛(紅目鱧, *P. macracanthus*)的魚漿和漂洗魚漿中 MyHC 的降解都很明顯，很可能是肌漿的蛋白酶(sarcoplasmic protease)含量較高(Benjukul *et al.*, 2003a)。Toyohara *et al.* (1990)指出，金線魚(threadfin bream)的 MyHC 降解並非是熱活化蛋白酶主導，而是凝膠降解誘導因子 (gel-degradation inducing factor; GIF)的介入，GIFs 可能以肌漿的 GIFs 型式存在因而容易被漂洗除去，或者是與肌原纖維基質緊密結合(肌原纖維的 GIF 型式)，肌漿的 GIF 引起金線魚的膠體降解，肌原纖維的 GIF 普遍存在於馬面魷(oval-filefish) (Toyohara *et al.*, 1990)。

當白帶魚魚漿分別在 65°C 及 60°C 加熱，未漂洗組的 MyHC 降解大於在漂洗組，很可能是漂洗過程中除去了肌漿蛋白酶；白帶魚的自家消化隨加熱時間的延長而增加，因 SDS 膠體電泳中 MyHC 蛋白帶的強度下降，三氯醋酸(trichloroacetic acid)可溶性肽量增加(Benjukul *et al.*, 2003c)。Yongsawatdigul and Piyadhamviboon (2004)也指出，白帶魚

未漂洗及漂洗魚漿在 pH 6 及 7 的自家消化速率最大(65°C 加熱)。因此在 60~65°C 具有活性的原有蛋白酶貢獻於白帶魚未漂洗魚漿及漂洗魚漿中的蛋白質降解和膠體脆弱化(Benjukul *et al.*, 2003d; Yongsawatdigul and Piyadhamviboon, 2004)。

內源性蛋白酶影響未漂洗或漂洗魚漿的膠體質地特性。當鯉魚漂洗魚漿中，加入純化自鯉魚背部肌肉之組織蛋白酶 L，膠體中的 MyHC 被重度水解，破斷力 (breaking force) 下降 24.3% (Hu *et al.*, 2012)，同樣地，加入來自鱧魚(silver carp)肌肉的組織蛋白酶 L 或 B，對照於控制組，膠強度(gel strength)分別下降 38% 及 25%，而添加組織蛋白酶 L 組的破斷力和變形度(deformation)分別降低 25% 及 18%，顯示組織蛋白酶 L 會強力水解魚漿的膠體構造而造成軟化。鯖魚漂洗魚漿加入鈣蛋白酶處理後，膠強度的下降不明顯，但添加組織蛋白酶 L 及 L-類似兩者 and 其中的一種(55°C 反應 2 小時)，即顯著降低(Ho *et al.*, 2000)。Benjukul *et al.* (2003c)指出在白帶魚，肌原纖維關聯的蛋白酶既是半胱胺酸也是絲胺酸蛋白酶，肌漿蛋白酶的特徵為熱活化的鹼性蛋白酶(最適 pH 8.0 及溫度 65°C)，而在熱誘導膠化(hrat-induced gelation)期間白帶魚肌原纖維蛋白質的降解，這導致膠體脆弱化，內源性肌漿的和肌原纖維關聯的蛋白酶都扮演重要的作用。

6. 肌肉的質地變化(Eskin *et al.*, 2013;



Ahmed *et al.*, 2015)

### (1) 膠原蛋白和魚肉質地

通常魚類肌肉所含的膠原蛋白量僅及紅肉的十分之一，肌肉被肌隔分隔為生肌節，肌隔由結締組織組成，每條肌纖維均被含有細膠原蛋白纖維之細胞壁或基底膜所包圍。維持魚類肌肉的完整性，是透過肌隔的結締組織和膠原蛋白纖維兩者一起形成的內肌膜網狀結構 (endomysial reticulum)，如果生肌節未與肌隔連結，魚肉就產生裂縫和孔洞，亦即龜裂的特徵，這導致魚肉品質變差與接受度低。Love *et al.* (1972b) 歸咎這樣的問題為不當處置或折彎僵硬的魚體，因而使內肌膜和肌隔的連結處破裂。龜裂的進展並連帶促使組織軟化，此乃儲存期間變質的後果，以及僵直期間若肌肉收縮急速且強烈也會促進發生 (Love, 1988; Bremner, 1999; Taylor *et al.*, 2002)。Ofstad *et al.* (2006) 指出，鱈魚和斑點狼魚冰藏期間的龜裂增多，係來自肌內結締組織的主要成分蛋白聚醣和醣蛋白的降解，兩者的功能是将肌細胞維繫在膠原蛋白網狀構造的胞外基質上，因而在膠原蛋白纖維的立體配置上扮有重要的角色。和斑點狼魚比較，鱈魚更易出現龜裂，此乃生肌節與肌隔脫離之前，肌纖維之間已先脫離 (Ofstad *et al.*, 2006)。在二次加工過程中，約 40% 大西洋鮭因肉質軟或龜裂的原因而品質降級 (Michie, 2001)，鮭魚宰殺前的緊迫也促進軟化，龜裂以及魚片顏色和汁液的流失也增多 (Kießling *et al.*, 2004; Erikson and

Misimi, 2008; Mørkøre *et al.*, 2008)。Ashton *et al.* (2010) 開發以機械式質地分析儀測試拉張力，評定鮭魚魚片的質地和龜裂，與畜肉作對照，結締組織對煮熟魚肉質地的影響仍不清楚，可能存在量較少的緣故。例如鯊魚的結締組織含量高，因而烹煮溫度需達 45°C，但若要達到同樣的嫩度 (tenderness)，牛肉則需在 92°C 溫度烹煮 1 小時。

### (2) 魚類肌肉的死後質地變化

死後肌肉蛋白質的蛋白質水解對冷藏期間肌肉食品的質地品質攸關重大 (Goll *et al.*, 1983)，一些研究指出肌肉質地變差，無疑是死後貯藏期間肌肉組織發生的結構變化所影響。大西洋鮭魚的組織蛋白酶 B 及 L 活性與肌肉降解之間的關連性很高 (Bahuaud *et al.*, 2008)，和 Ayala *et al.* (2010) 結果一致，亦即嘉鱻魚肉的質地品質從僵直前一直到死後 5~10 日才下降，這時肌纖維已不再與肌隔連結。死後早期肌肉的變化造成線粒體和肌漿網的消失，肌原纖維之間間隙因而擴大，往後的貯藏中，肌肉的結構變化包括酵素所誘導肋狀體的組成蛋白質、以及其它主要肌原纖維蛋白質的脆弱化，鈣蛋白酶和組織蛋白酶以互補方式和以協同作用，共同貢獻於肌肉蛋白質的快速蛋白質水解與其所關連肉質的軟化 (Ayala *et al.*, 2010)。嘉鱻死後 4 日肌肉軟化程度愈高，係鈣蛋白酶誘導肌肉的萎縮蛋白的降解，使肌纖維與肌隔脫離 (Caballero *et al.*, 2009)。同樣在牛肌肉，肌肉韌度與鈣蛋白酶的初始活

性、以及與半胱胺酸及絲胺酸蛋白酶抑制劑之間為負相關(Zamora *et al.*, 1996)。死後活性較高的內源性鈣蛋白酶會增加 Z-盤、以及高分子量蛋白質例如肌鈣蛋白、原肌凝蛋白、 $\alpha$ -輔肌動蛋白(Yu and Lee, 1986)、肌聯蛋白、伴肌動蛋白及細絲蛋白(filamin) (Lomiwes *et al.*, 2014)等的降解，而提高肌肉的軟化。主要收縮蛋白質(肌動蛋白和肌凝蛋白)不會被鈣蛋白酶水解，鈣蛋白酶需在死後貯藏最初數日的高 pH 下才表現活性，相對的在肌肉 pH 低的貯藏期間，組織蛋白酶的活性增強。在肉類肌肉貯藏的初期，鈣蛋白酶活性隨死後時間的延長而下降(Li *et al.*, 2012)，在低 pH (5.5~5.8)的肌肉中不具有活性(Kanawa *et al.*, 2002)。鈣蛋白酶所誘導肌原纖維的蛋白質水解速率和程度雖會因魚種的不同而異，都取決於死後條件(Ahmed *et al.*, 2013)。關於魚類肌肉的嫩化，比起僅考慮鈣蛋白酶活性，鈣蛋白酶相對於鈣蛋白酶抑制蛋白(calpastatin)活性兩者的相對比例可能更加重要，儘管在鱸魚和牛肌肉測得相近的鈣蛋白酶活性，鱸魚的鈣蛋白酶抑制蛋白活性比在牛肌肉高出約 4 倍(Chéret *et al.*, 2007)，在虹鱒肌肉，鈣蛋白酶對鈣蛋白酶抑制蛋白的活性比約為 1:3 (Saito *et al.*, 2007)，這些結果說明，當魚類肌肉中的鈣蛋白酶抑制蛋白相對於鈣蛋白酶的比例高時，會減弱鈣蛋白酶的活性，與迅速組織軟化關連的死後肌原纖維的蛋白質水解速率和程度也都受抑制，但 Geesink and Koochmaraie (1999)報告鈣蛋

白酶抑制蛋白的活性高，可能不能完全抑制鈣蛋白酶活性。這些的發現意謂在魚類肌肉死後肌原纖維的斷片化和嫩化，鈣蛋白酶是次要的角色(Chéret *et al.*, 2007)。

在死後肉熟成(conditioning)的後期階段所發生肌肉的嫩化，組織蛋白酶的作用很重要。隨著死後時間的推移，鮭魚肌肉中組織蛋白酶的活性顯著增高(Gaarder *et al.*, 2012)，組織蛋白酶活性高不利於魚類肉片的質地(Bahuaud *et al.*, 2010)，組織蛋白酶 L 活性和魚片緊實度直接相關，組織蛋白酶 B 和 L 貢獻於鯖魚魚漿的降解及魚漿靜置(setting)期間所衍生的膠體軟化(Ho *et al.*, 2000)，組織蛋白酶 B、D 或 L 會降解鱸魚肌肉的肌凝蛋白重鏈(MyHC)、 $\alpha$ -輔肌動蛋白、結蛋白、肌動蛋白、肌鈣蛋白-T 和原肌凝蛋白(Ladrat *et al.*, 2003)。在鱸魚肌肉，肌原纖維先經 m-鈣蛋白酶水解，接著以商業組織蛋白酶混合(含組織蛋白酶 B、D 和 L)水解，同樣的這些蛋白質也被降解(Delbarre-Ladrat *et al.*, 2004)，這表明鈣蛋白酶並未參與死後肌原纖維的蛋白質水解，對死後肌肉中肌動蛋白和肌凝蛋白的蛋白質水解，組織蛋白酶具有專一性。

## 七、水生動物的蛋白質水解酵素(Singh and Benjakul, 2018)

將蛋白質的胜肽鍵(peptide bonds)水解或切斷之蛋白酶，根據切斷的位置分成內肽酶(endopeptidases)和外肽酶(exopeptidases)，前者是在鏈內部的胜肽

鍵，後者則在胺基或羧基末端旁的胜肽鍵。胜肽鍵的斷裂引起蛋白質的變樣，改變構形或結構，從而理化和功能性質也連帶被修飾。蛋白酶也根據與已知蛋白酶的相似性而歸類，例如類胰蛋白酶(trypsin-like)、類胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin-like)、類凝乳酶(chymosin-like)或類組織蛋白酶(cathepsin-like)。另也根據對pH的敏感性而分類，包括酸性、中性或鹼性蛋白酶，甚至根據基質特異性(substrate specificity)、對抑制劑(inhibitor)的反應、以及催化模式(mode of catalysis)而分類(Sriket, 2014)，就催化機制，蛋白酶可依其活性部位(active site)而再區分，國際生物化學家聯合會的酵素委員會提出天門冬胺酸(aspartic)、半胱胺酸、絲胺酸及金屬(metallo-)蛋白酶等四大類。魚類和貝類中的蛋白酶具有不同的分子特性，取決於物種、器官和環境因素(Sriket, 2014)，存在於水生動物的肌肉組織或各種器官，尤其是消化器官。這些蛋白酶有不同的分子量、最適溫度和最適pH的活性，如表3所示。有關魚類及貝類中的蛋白酶種類與性質等問題，另請參考Delbarre-Ladrat *et al.* (2006)、Eskin *et al.* (2013)、Sriket (2014)、Ahmed *et al.* (2015)等綜述，以及“Seafood Enzymes”專書(Harrd and Simpson, 2000)。

## 八、蛋白酶的貢獻角色

魚肉的變質是綜合物理、化學、生化

和微生物等的複雜過程所導致的結果。但在死後魚類肌肉中發生的最初變化，則是內源性酵素催化肌肉蛋白質和結締組織蛋白質的水解、以及脂質水解等。實際上在此階段，肌肉尚未受到細菌的嚴重污染。

### 1. 對死後自家消化變化的貢獻 (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2015)

有關死後魚類肌肉變化這複雜機制的瞭解仍未臻一致(Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)。在哺乳動物以牛的研究最多，無庸置疑在多數或甚至所有肉的嫩度都與鈣蛋白酶活性有關。在魚類，已知有不同的細胞內蛋白質水解系統(intracellular proteolytic systems)，一般分為兩主要途徑來解釋死後貯存期間肌肉蛋白質的降解：組織蛋白酶和鈣蛋白酶，在肌原纖維蛋白質降解過程的不同階段，它們很可能以互補方式和以協同作用而表現活性。鑑定每種蛋白酶的確切作用，需確知在死後的肌肉環境中(抑制劑活性、酵素-基質共位 colocation、活化程序)，酵素是具有活性的，並確定肌肉基質。來自龍蝦(lobster)(Mykles and Haire, 1995)和兔(Matsuishi and Okitani, 1997)的純化蛋白酶體(proteasome)在體外試驗(*in vitro*)水解肌原纖維蛋白質，需要加熱或添加SDS來活化，故對於死後降解就可能較不重要，當然這有待確認。

#### (1) 死後肌肉pH下降與鈣離子濃度升高

死後pH值的迅速下降，可能顯示溶

表 3. 魚類和貝類中存在的蛋白酶(Singh and Benjakul, 2018)

酵素	器官	魚/貝類	類型	pH/溫度	分子量	文獻
消化蛋白酶	肝胰臟	鯉魚( <i>Cyprinus carpio</i> )	絲胺酸	9/40°C	28 kDa	(1)
		淡水對蝦( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> )	絲胺酸	9/45°C	28.5 及 28 kDa	(2)
		明蝦( <i>Fenneropenaeus chinensis</i> )	絲胺酸	—	17 kDa	(3)
		鯉魚( <i>Cyprinus carpio</i> )	半胱胺酸(組織蛋白酶 B、組織蛋白酶 L)	6/45°C 5.5~6/50°C	30 kDa	(4)
	內臟	太平洋白蝦( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	絲胺酸	7~11/60°C	24 kD	(5)
		沙丁魚( <i>Sardinops sagax caerulea</i> )	絲胺酸	8/55°C	25 kDa	(6)
	幽門垂	大蓋具脂魚( <i>Colossoma macropomum</i> )	絲胺酸	7.5~11.5/50~70°C	23.9 kDa	(7)
	腎臟	正鰹( <i>Katsuwonus pelamis</i> )	絲胺酸	9.0/55°C	42 kDa	(8)
		黃鰹鮪( <i>Thunnus albacores</i> ) 黃腰鮪( <i>Thunnus tonggol</i> )	絲胺酸	9.0/55°C	42 kDa	(9)
	幽門垂	黃笛鯛( <i>Priacanthus macracanthus</i> )	絲胺酸	8~11/55°C	23.8 kDa	(10)
		縱帶笛鯛( <i>Lutjanus vitta</i> )	絲胺酸	8.5/60°C	23 kDa	(11)
	頭胸部	北方蝦( <i>Pandalus borealis</i> )	膠原蛋白酶； 絲胺酸	—/25°C	20 kDa	(12)
肌肉蛋白酶	骨骼肌	白帶魚( <i>Saurida wanieso</i> )	絲胺酸	7~8/50°C	29 kDa	(13)
	肌肉	真鯪( <i>Trachurus Japonicas</i> )	半胱胺酸	5.0/50°C	(HC) 28 及 (LC) 6 kDa	(14)
	肌漿內液	美洲箭齒鰈( <i>Atheresthes stomias</i> )	半胱胺酸	5.0~5.5/60°C	27 kDa	(15)
	白色肌	鉤吻鮭( <i>Oncorhynchus keta</i> )	半胱胺酸	5.7/—	28 kDa	(16)
	肌肉	黃笛鯛	絲胺酸	8.5/60°C	72 kDa	(17)
皮膚蛋白酶	皮膚	單棘魷( <i>Novoden modestrus</i> )	絲胺酸 膠原蛋白分解的	7~8/55°C	27.0 kDa	(18)
		黃笛鯛	絲胺酸	7.5/60°C	—	(19)
		單角革魷( <i>Alutherus monoceros</i> )	絲胺酸	7/50°C	—	(20)

文獻：(1) Cao *et al.*, 2000b；(2) Sriket *et al.*, 2012b；(3) Shi *et al.*, 2008；(4) Aranishi *et al.*, 1997；(5) Senphan *et al.*, 2015；(6) Castillo-Yañez *et al.*, 2009；(7) Marcuschi *et al.*, 2010；(8) Klomklao *et al.*, 2004；(9) Klomklao *et al.*, 2006；(10) Van Hau and Benjakul, 2006；(11) Khantaphant and Benjakul, 2010；(12) Aoki *et al.*, 2004；(13) Cao *et al.*, 2000a；(14) Yoshida *et al.*, 2015；(15) Visessanguan *et al.*, 2003；(16) Yamashita and Konagaya, 1990b；(17) Benjakul *et al.*, 2003b；(18) Kim *et al.*, 2002；(19) Intarasirisawat *et al.*, 2007；(20) Ahmad *et al.*, 2011。



酶體的酸性蛋白酶會表現活性，如果被釋出並與基質接觸。組織蛋白酶 D 和 L 由於其活性的 pH 範圍廣，被認為在自家消化的降解中扮演主要的作用，其它組織蛋白酶的活性都在偏低的 pH 值而無生理上的意義。產卵中大麻哈魚(Yamashita and Konagaya, 1990a)的組織蛋白酶含量高，死後肌肉的降解也快，這表明在正常魚可能也有如此的作用，而也支持組織蛋白酶作用的是魚類結締組織蛋白質於死後數日內就已降解(Eggen and Ekholt, 1995; Sato *et al.*, 1997)；結締組織蛋白質不易被大多數蛋白酶水解，但卻是組織蛋白酶的基質。

能夠降解結締組織的第二種蛋白酶系統為金屬蛋白酶，在哺乳動物中這些蛋白酶原是無活性的，需要信號傳導途徑(signal transduction pathway)來活化。岩魚(rockfish)具有此酵素活性(Bracho and Haard, 1995)，但對質地的影響未探討。

細胞內的死後鈣濃度上升至約 300  $\mu\text{M}$ ，這有利於鈣蛋白酶成為影響魚片質地之主要作用酵素。在體內(*in vivo*)，生理鈣濃度低至 0.3  $\mu\text{M}$  時鈣蛋白酶仍具有活性，從血小板的自家消化和基質降解可資證實(Fox *et al.*, 1993)。但在體外試驗，鈣蛋白酶所需的游離鈣濃度比通常的生理鈣濃度高出 100 倍(Goll *et al.*, 1989)，這來自一項從未解釋的悖論(Johnson and Guttmann, 1997)。Shimada *et al.* (1998)指出，雞死後肌肉中最終的肌漿鈣離子濃度增至約 200  $\mu\text{M}$ ，較之靜止態肌肉(resting

muscle)高約 2000 倍，這濃度已足以活化鈣蛋白酶系統。膜磷脂質(membrane phospholipids)、蛋白質活化劑(protein activators)和磷酸化(phosphorylation)也被提出，當低於體外試驗所需的鈣濃度，允許在體內活化鈣蛋白酶(Johnson, 1990; Baki *et al.*, 1996; Shigemura *et al.*, 2003)。此外，鈣濃度的暫時和局部的增加，也可促使這些局部存在的基質受水解，尤其座落在原生質膜或肌質網(Mellgren, 1987)。其它如銻( $\text{Sr}^{2+}$ )及鋇( $\text{Ba}^{2+}$ )陽離子在體外也能活化鈣蛋白酶(Croall and Demartino, 1991; Ladrat *et al.*, 2002)。

死後肌肉中游離鈣的增加，曾被推測具有一作用即經由非酵素性過程而影響了嫩化(Takahashi, 1992)。這爭議性說法推定鈣本身直接作用於多種的肌肉組成分，例如 Z-盤的脆弱化、僵直的肌動凝蛋白複合物的脆弱化、肌聯蛋白的分裂(splitting)、伴肌動蛋白絲(nebulin filaments)的斷片化和結蛋白中間肌絲的崩解(Tatsumi and Takahashi, 1992; Takahashi, 1996)。從這些結果，Nakashima *et al.* (1998)結論：鈣透過與磷脂質的直接結合而涉入 Z-盤的脆弱化，Takahashi *et al.* (1987)也結論鈣本身就影響 Z-盤的脆弱化，但仍不能完全排除被一種未知的蛋白酶的限度蛋白質水解之可能性。Geesink *et al.* (2001)則反駁以上的理論，從觀察到肌漿鈣濃度的升高與其和肌原纖維斷片化指數及剪切力的相關，並提出另一種解釋：(1)游離鈣的升高為結果而非肌肉發生

降解的起因，(2)游離鈣活化鈣蛋白酶系統，隨後並影響對於肌原纖維結構的降解效率。此一證據加上已知的鈣蛋白酶作用(Koohmaraie, 1996; Goll *et al.*, 2003)、鈣蛋白酶的抑制和嫩度(Koohmaraie, 1992)、以及例如考力代羊 (Callipyge sheep) (Koohmaraie *et al.*, 1995)動物模式等，都顯示哺乳動物中嫩化的主要蛋白酶是鈣蛋白酶。

## (2)肌肉蛋白質對蛋白質水解的敏感性

當受到鈣蛋白酶及溶酶體的蛋白酶的蛋白質水解，不少體外的研究都知悉肌原纖維蛋白質的敏感性(Jiang *et al.*, 1996; Aoki and Ueno, 1997; Ogata *et al.*, 1998)。在鱸魚肌肉的體外試驗，鈣蛋白酶可水解肌原纖維而釋出  $\alpha$ -輔肌動蛋白和原肌凝蛋白，鈣蛋白酶和組織蛋白酶兩者都可降解肌凝蛋白重鏈、 $\alpha$ -輔肌動蛋白和結蛋白，但肌動蛋白和原肌凝蛋白似可被組織

蛋白酶 B、D 及 L 作用，而組織蛋白酶 B 及 L 能降解肌鈣蛋白-T，出現 30 kDa 蛋白帶(Ladtrat *et al.*, 2003)，以及其它肌原纖維或細胞溶質蛋白質(cytosolic proteins)的一些小變化(肌酸激酶和未鑑定的蛋白質)。在冷藏鱸魚肌肉所看到的蛋白質變化，和鈣蛋白酶或組織蛋白酶在體外試驗中的降解，兩者並不一致，特別是肌凝蛋白、肌鈣蛋白-T 及結蛋白在肌肉貯藏期間並未分解，但在試管試驗，卻對鈣蛋白酶或組織蛋白酶的作用是敏感的。

Ahmed *et al.* (2015)指出，死後肌肉中，鈣蛋白酶活性透過產生一些構造變化(表 4)，而導致肌原纖維結構的脆弱化及不穩定；另外，組織蛋白酶的水解活性也導致一些結構性肌肉蛋白質的脆弱化及降解(表 5)，而造成組織的軟化。

除了在肌原纖維蛋白質的死後變化中扮演關鍵的作用，鈣蛋白酶還涉及魚類

表 4. 鈣蛋白酶對主要肌原纖維蛋白質的死後體外蛋白質水解(Ahmed *et al.*, 2015)

蛋白酶	基質	水解條件	蛋白質變化	文獻
豬 $\mu$ -鈣蛋白酶(1 U)	肌原纖維 (豬肌肉)	pH 5.8 ; 4°C ; 2 或 4 日	結蛋白、肌動蛋白、肌凝蛋白重鏈、肌凝蛋白輕鏈、肌鈣蛋白 T、原肌凝蛋白和 CapZ 等的降解	(1)
內源性 m-鈣蛋白酶	肌原纖維 (鱸魚肌肉)	pH 7.0 ; 25°C ; 0~120 分鐘	肌凝蛋白重鏈部分降解、原肌凝蛋白消失	(2)
純化 $\mu$ -鈣蛋白酶	肌原纖維 (牛肌肉)	pH 5.6 ; 4°C ; 100 $\mu$ M CaCl <sub>2</sub> ; 0~120 分鐘	伴肌動蛋白、肌聯蛋白、細絲蛋白、結蛋白及肌鈣蛋白 T 等的水解	(3)
純化 m-鈣蛋白酶與商業組織蛋白酶	肌原纖維 (鱸魚肌肉)	m-鈣蛋白酶(pH 7 ; 25°C ; 2 小時)與組織蛋白酶(pH 5.5 ; 25°C ; 20 小時)	肌凝蛋白重鏈、 $\alpha$ -輔肌動蛋白、結蛋白、肌動蛋白、肌鈣蛋白和原肌凝蛋白等的崩解	(4)
鈣蛋白酶	肌原纖維 (鱸魚白色肌)	pH 7.0 ; 6 mM Ca <sup>2+</sup>	肋狀體及中間肌絲完全消失、Z-盤的脆弱化	(5)
$\mu$ -鈣蛋白酶	豬骨骼肌 肌原纖維	pH 5.5~5.8 ; 5°C ; 90 分鐘	結蛋白及肌鈣蛋白 T 消失、 $\alpha$ -輔肌動蛋白釋出	(6)

文獻：(1) Lametsch *et al.* (2004) , (2) Verrez-Bagnis *et al.* (2002) , (3) Huff-Lonergan *et al.* (1996) , (4) Delbarre-Ladtrat *et al.* (2004) , (5) Taylor *et al.* (1997) , (6) Koohmaraie *et al.* (1986)。

表 5. 於死後肌肉中組織蛋白酶所引起肌原纖維蛋白質的降解(Ahmed *et al.*, 2015)

蛋白酶	水解條件	蛋白質變化	文獻
鯉魚組織蛋白酶 L	鯉魚肌原纖維(pH 5.0~7.0 ; 37°C ; 20 小時)	肌凝蛋白、 $\alpha$ -輔肌動蛋白與肌鈣蛋白 T 及 I 等的降解	(1)
商業組織蛋白酶 B 及 L	鱸魚肌原纖維(pH 5.5 ; 25 °C ; 22 小時)	肌凝蛋白重鏈的崩解；肌鈣蛋白 T、原肌凝蛋白、結蛋白及肌動蛋白等的水解	(2)
鮭魚組織蛋白酶 D	鮭魚肌原纖維(pH 4.5 ; 5 °C ; 2 日)	肌凝蛋白、肌動蛋白、原肌凝蛋白等的水解	(3)
鯖魚組織蛋白酶 L、L-類似及 B	類似死後的各種條件	肌動蛋白及肌凝蛋白的切斷	(4)
豬組織蛋白酶 D	豬肌原纖維(pH 5.5 ; 37°C ; 120 分鐘)	肌凝蛋白重鏈及聯結蛋白的降解；肌動蛋白、原肌凝蛋白、肌鈣蛋白 T 及 I、肌凝蛋白輕鏈等的限制水解	(5)
鮭魚組織蛋白酶 L	鯉魚肌原纖維斷片(pH 6.5 ; 20°C ; 60 分鐘)	肌聯蛋白、伴肌動蛋白、肌凝蛋白、膠原蛋白、 $\alpha$ -輔肌動蛋白與肌鈣蛋白 T 及 I 等的水解	(6)
鮭魚組織蛋白酶 B	鯉魚肌原纖維斷片(pH 6.5 ; 20°C)	聯結蛋白、伴肌動蛋白及肌凝蛋白等的切斷	(6)
兔肌肉組織蛋白酶 L	兔肌肉肌原纖維	肌凝蛋白重鏈、 $\alpha$ -輔肌動蛋白與肌鈣蛋白 T 及 I 等的降解	(7)

文獻：(1) Ogata *et al.* (1998) , (2) Ladrat *et al.* (2003) , (3) Nielsen and Nielsen (2001) , (4) Jiang *et al.* (1996) , (5) Zeece *et al.* (1986) , (6) Yamashita and Konagaya (1991) , (7) Matsukura *et al.* (1981) 。

肌肉的死後退化(degeneration) , 稱為異常肉鮭魚(burnt tuna) (Hochachka and Brill, 1987) 。

將一些蛋白酶抑制劑注入魚肌肉之實驗模式, 也常用來釐清那些酵素在死後嫩化中的作用。Kubota *et al.* (2001) 指出二價金屬離子螯合劑 EDTA 和金屬蛋白酶專一性抑制劑的鄰二氮菲(1,10-phenanthroline) 可抑制比目魚肌肉的嫩化, 由於半胱胺酸蛋白酶的抑制劑 E64 對嫩化並無影響(測定剪切力), 故鈣蛋白酶並未涉入胞外基質蛋白質的分解, 這是被懷疑在冷藏過程中造成魚類肌肉死後嫩化的原因, 最後作者結論: 基質金屬蛋白酶會降解魚肉的胞外基質組成分, 因而引起比目魚的死後嫩化, 另也提出一些絲

胺酸蛋白酶與嫩化有關, 在實驗中一種天冬胺酸蛋白酶也表現活性, 可能和嫩化有關。

膠原蛋白的變化是來自膠原蛋白酶的作用, 也和龜裂現象的過程有關連, 即冷藏期間由於膠原蛋白纖維的斷裂, 使肌纖維逐漸脫離了肌隔(Hallett and Bremner, 1988; Bremner, 1992) 。就引起魚類肌肉死後嫩化之肌肉結締組織的碎解, Kubota *et al.* (2003) 指出是來自基質金屬蛋白酶(在本例為 MMP-9) 的作用。Lødemel and Olsen (2003) 探討不同魚種肌肉中的膠原活性(collagenous activities), 在定量及定性上各都有所不同, 大西洋鱈魚和斑點狼魚肌肉中 MMP-類似(MMP-like) 和絲胺酸蛋白酶活性都存在, 但大西洋鮭魚中只有前者的

活性。同樣方式，Sentandreu *et al.* (2002) 綜述肌肉內肽酶對肉質嫩度的影響，討論 MMPs 在不同類型膠原蛋白、以及將肌膜連結胞外基質之細胞骨架蛋白質的降解中所扮演的作用，但瞭解基質(substrate)的降解與質地的關連性，這樣明確的研究並未出現。

前述的這些系統都不能單獨解釋死後所觀察到的所有變化(Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)。蛋白酶彼此間的協同作用(Delbarre-Ladrat *et al.*, 2004)及其它的環境因素也可能存在。死後僵直時，由於滲透壓改變、離子強度提高且可能變得夠高而足以弱化肌原纖維的結構，使之更易受到蛋白質水解(Mestre Prates, 2002)。誘導自由基和一氧化氮形成的氧化過程，可能使肌肉蛋白質組成分更易受蛋白酶的影響，而弱化整個肌原纖維的結構。因此，自由基物種與蛋白酶之間、或者滲透壓與蛋白酶之間的協同作用也被提出(Mestre Prates, 2002)。

## 2. 在魚貝類肌肉軟化上的角色(Sriket, 2014)

包括蛋白酶的內源性酵素所引起的生化變化，是冰藏期間魚類和貝類品質下降的主要原因(Brauer *et al.*, 2003; Hultmann *et al.*, 2007)，此外，蛋白酶也會直接造成海產食品質地的異常缺失，例如硬骨魚的龜裂及糊狀、甲殼類尾肉的軟化(Pornrat *et al.*, 2007; Gornik *et al.*, 2009; Sriket *et al.*, 2010)。死後的魚貝類通常容易受到內源性蛋白酶的蛋白質水解，變成

軟化或糊狀的質地(Jiang, 2000; Gornik *et al.*, 2009; Sriket *et al.*, 2011c)。在魚類和貝類肌肉及消化道中，與肌肉軟化有關的蛋白酶，如表 6 所示。

魚類：魚類死後 1 日內，由於 Z-線的崩解和肌原纖維的斷片化，可能就出現軟化現象(Shigemura *et al.*, 2003; Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006)。冰藏期間的魚類肌肉的軟化，也和內肌膜的脆弱化及膠原蛋白纖維的碎解有關(Shigemura *et al.*, 2003; 2004)。太平洋藍鰹鮪(*Thunnus Orientalis*)貯藏期間，以組織學方法可觀察到肌細胞周圍的結締組織崩解(Nakamura *et al.*, 2005)。膠原蛋白含量高會使魚肉緊實，顯示膠原蛋白含量與質地性質之間有關連(Jonsson *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2008)。

冰藏魚的膠原蛋白會逐漸碎解，導致肌纖維的分離，引起肉質的軟化(Kubota *et al.*, 2003)。膠原蛋白 I 型和 V 型的碎解是魚肉軟化的主因，大概係自家消化的膠原蛋白水解酶的作用所致(Kubota *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2009)。這些結締組織受到內源性胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的作用而斷裂，可能導致魚肉的質地變差，冰藏魚出現的糊狀，很可能是消化酵素(包括胰蛋白酶和其它蛋白質水解酵素)從已自家消化的(autolyzed)消化道中滲出且作用的緣故(Felberg *et al.*, 2010)。

在長期冰藏或在較高溫的短期間貯藏，這些酵素大概是引起龜裂或生肌節破裂的主要原因。大西洋鱈魚在 17°C 以上貯



表 6 與魚類及貝類的軟化有關的內源性蛋白酶(Sriket, 2014)

種類	品質變質	參與酵素	文獻
	肌肉蛋白酶		(1)
吳郭魚( <i>Oreochromis niloticus</i> )	肌肉軟化	絲胺酸及金屬蛋白酶	
鱒魚、斑點狼魚及大西洋鮭魚	魚片軟化、肌肉龜裂	金屬蛋白酶	(2)
鱧魚( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> )	肌肉降解	肌原纖維結合型絲胺酸蛋白酶	(3)
大西洋鮭魚( <i>Salmo salar</i> )	魚片軟化	組織蛋白酶及類膠原蛋白酶酵素	(4)
鱸魚( <i>Dicentrarchus labrax</i> L.)	白色肌變質	鈣蛋白酶	(5)
條紋類絲鰻( <i>Argyrosomus argentatus</i> )	肌肉降解	類胰蛋白酶酵素	(6)
鱸魚( <i>Dicentrarchus labrax</i> L.)	肌肉的死後軟化	組織蛋白酶 B 及 L	(7)
鯉魚血合肉( <i>Cyprinus carpio</i> )	肌肉軟化	金屬蛋白酶	(8)
真鯛( <i>Pagrus major</i> )	肌肉軟化、膠原蛋白降解	絲胺酸膠原蛋白水解蛋白酶	(9)
	消化蛋白酶		
白蝦( <i>Penaeus vannamei</i> )	糊狀質地	膠原蛋白水解蛋白酶	(10)
明蝦( <i>Penaeus orientalis</i> )	糊狀質地	肝胰臟的胰蛋白酶及類膠原蛋白酶酵素	(11)
鮭魚	腹部爆裂	從幽門垂滲出的絲胺酸膠原蛋白水解蛋白酶	(12)
淡水長臂大蝦 ( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> )	肌肉軟化、糊狀質地	肝胰臟的類胰蛋白酶	(13)

文獻：(1) [Ishida et al.\(2003\)](#)，(2) [Lødemel et al.\(2003\)](#)，(3) [Cao et al. \(2000a\)](#)，(4) [Hultmann and Rustad \(2004\)](#)，(5) [Delbarre-Ladrat et al. \(2004\)](#)，(6) [Cao et al. \(2005\)](#)，(7) [Chéret et al. \(2007\)](#)，(8) [Wu et al. \(2008\)](#)，(9) [Wu et al. \(2010\)](#)，(10) [Brauer et al. \(2003\)](#)，(11) [Oh et al. \(2000\)](#)，(12) [Felberg et al. \(2010\)](#)，(13) [Sriket et al. \(2012a\)](#)。

藏時就發生龜裂，有可能因結締組織的降解，已知兩種蛋白酶可水解魚類肌肉的膠原蛋白，包括 MMP 和絲胺酸蛋白酶(Kubota et al., 2003; Lødemel and Olsen, 2003)。從太平洋岩魚肌肉中鑑定出熱穩定金屬蛋白酶(Bracho and Haard, 1995)，在性質上與膠原蛋白酶類似的明膠分解蛋白酶，被指出參與膠原蛋白的代謝，以及如紅嘉鱸(red sea bream)等魚種冷藏期間肌肉的降解(Yoshida et al., 2009; Wu et al., 2010)。包括鯖魚、白腹鯖(*Scomber japonicus*)、比目魚(*Japanese flounder*)、牙鯧(*Paralichthys alivaceus*)、虹鱒及鯉魚(common carp)等的骨骼肌中，都發現有膠原蛋白酶活性(Saito et al., 2000; Park et

al., 2002; Kubota et al., 2003; Wu et al., 2008)，白腹鯖膠原蛋白酶區分的最適活性在 pH 7.5 及 55°C (Park et al., 2002)，鯉魚血合肉中發現的金屬蛋白酶分子質量為 64、67 和 75 kDa (Wu et al., 2008)，這些酵素的活性在 pH 7~9 達最高值，可被鈣離子活化(Saito et al., 2000; Wu et al., 2008; Yoshida et al., 2009)。

甲殼類：貝類在冰藏期間的初期變質，與內源性酵素所催化的水解反應有關，產生的營養物又可被細菌繁殖利用(Hernández-Herrero et al., 2003)。如同其它的海洋種類，內源性和細菌性酵素都參與甲殼類動物的變質，影響冷藏和運輸時的貯藏壽命及健康性(Pineiro et al., 2004;

Aubourg *et al.*, 2007; Múgica *et al.*, 2008)。於貯藏期間，肝胰臟和其它內部器官所在的頭胸部(cephalothorax)可能發生自家消化，因而釋出活性的蛋白酶滲入肌肉(Sriket *et al.*, 2011c)。甲殼類動物的肝胰臟萃取物(hepatopancreas extracts)含有肽酶和蛋白酶，在生理條件下，例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和膠原蛋白酶能降解膠原蛋白的天然三重螺旋結構(Oh *et al.*, 2000; Aoki *et al.*, 2004; Sriket *et al.*, 2012b)，當受到這些酵素的作用，結締組織中的膠原蛋白分子通常在非螺旋區域部分斷裂(Yamashita *et al.*, 1991; Klomklao *et al.*, 2006; Sriket *et al.*, 2011c)，但膠原蛋白的降解仍取決於來源及蛋白酶類型。

膠原蛋白和其它的胞外基質蛋白質的水解變化，很可能在一些程度上是膠原蛋白水解酵素(collagenolytic enzymes)所催化。淡水大蝦(freshwater prawn)冰藏期間，蝦肉中肌隔的結締組織和肌細胞之間的界面發生降解，使得肌纖維內的結構明顯變化(Sriket *et al.*, 2010)。蛋白質水解酵素中，絲胺酸膠原蛋白酶 (serine collagenase) 對肌肉軟化的影響最大(Brauer *et al.*, 2003)。在死後貯藏中，白蝦(*Penaeus vannamei*) (Brauer *et al.*, 2003)和淡水長臂大蝦(*Macrobrachium rosenbergii*) (Sriket *et al.*, 2011c)肌肉都測出一種膠原蛋白水解酵素的活性。甲殼類冰藏時，膠原蛋白質(collagenous protein)逐漸發生碎解而使得肌細胞分離，導致肉質的軟化，而膠原蛋白 I 型和 V 型的碎

解，認為是造成肌肉軟化的主因(Brauer *et al.*, 2003; Sriket *et al.*, 2010; Sriket *et al.*, 2011c)。蝦類的肝胰臟是膠原蛋白水解蛋白酶的重要來源(Aoki *et al.*, 2004; Sriket *et al.*, 2011a)，冰藏蝦的貯藏壽命較短，與組織的軟化有關(Sriket *et al.*, 2012b)，淡水長臂大蝦的貯藏壽命短可能也是蛋白質結構被內源性酵素降解所致(Sriket *et al.*, 2011a)。有關膠原蛋白水解酵素的類型與來源等，可參考 Shekhter *et al.* (2019)的綜述。

## 九、結論

保有魚類的最佳品質，捕撈後的處置與保藏條件攸關至大。在微生物繁殖與腐敗作用未達明顯之前，死後的變化中尤以蛋白質水解造成的影響愈漸增大，包括破壞肌肉的構造，降解肌肉蛋白質尤其膠原蛋白組成分，這些都遭受酵素的水解作用，導致軟化、龜裂、糊化等肉質的變化。可能由於氣味、外觀等仍未現出鮮度變差的跡象，蛋白質水解的問題往往不受重視，但最佳魚肉品質與蛋白質水解的進展息息相關。

[後記]：在「海大漁推」先後提出 4 篇報告，本文為第四篇，第三篇為魚貝類肌肉死後及貯藏中的變化(50 期)，第二篇為海產食品品質與其貯藏中腐敗的起因(49 期)，第一篇為魚貝類的化學組成與其死後變化(48 期)。緣自對水產化學的初心，若引為參考，是所期盼。

## 十、參考文獻

- Abbott, M.T., A.M. Pearson, J.F. Price, G.R. Hooper (1977) Ultrastructural changes during autolysis of red and white porcine muscle. *J. Food Sci.* 42: 1185-1188.
- Ahmad, M., S. Benjakul, M. Ovissipour, T. Prodpran (2011) Indigenous proteases in the skin of unicorn leatherjacket (*Alutherus monoceros*) and their influence on characteristic and functional properties of gelatin. *Food Chem.* 127: 508-515.
- Ahmed, Z., O.N. Donkor, W.A. Street, T. Vasiljevic (2013) Activity of endogenous muscle proteases from 4 Australian underutilized fish species as affected by ionic strength, pH, and temperature. *J. Food Sci.* 78: C1858-C1864.
- Ahmed, Z., O.N. Donkor, W.A. Street, T. Vasiljevic (2015) Calpain- and cathepsins-induced myofibrillar changes in post-mortem fish: impact on structural softening and release of bioactive peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 45: 130-146.
- Aidos, I., Ø.L. Lie, M. Espe (1999) Collagen content in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Agric. Food Chem.* 47: 1440-1444.
- An, A., C. Wei, J. Zhao, M. Marshall, C. Lee (1989) Electrophoretic identification of fish species used in surimi products. *J. Food Sci.* 54: 253-257.
- Ando, M., H. Toyohara, Y. Shimizu, M. Sakaguchi (1991) Post-mortem tenderization of fish muscle proceeds independently of resolution of rigor mortis. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1165-1169.
- Ando, M., H. Toyohara, Y. Shimizu, M. Sakaguchi (1993) Post-mortem tenderization of fish muscle due to weakening of pericellular connective tissue. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 1073-1076.
- Ando, M., Y. Yoshimoto, K. Inabu, T. Nakagawa, Y. Makinodan (1995) Post-mortem change of three-dimensional structure of collagen fibrillar network in fish muscle pericellular connective tissues corresponding to post-mortem tenderization, *Fish. Sci.* 61: 327-330.
- Ando, M., A. Nishiyabu, Y. Tsukamasa, Y. Makinodan (1999) Post mortem softening of fish muscle during chilled storage as affected by bleeding. *J. Food Sci.* 64: 423-428.
- Aoki, T., R. Ueno (1997) Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Res. Intl.* 30: 585-591.
- Aoki, H., M.N. Ahsan, K. Matsuo, T. Hagiwara, S. Watabe (2003) Purification and characterization of collagenolytic proteases from the hepatopancreas of Northern shrimp (*Pandalus eous*). *J. Agric. Food Chem.* 51: 777-783.
- Aoki, H., M.N. Ahsan, K. Matsuo, T. Hagiwara, S. Watabe (2004) Partial purification of proteases that are generated by processing of the Northern shrimp *Pandalus borealis* and which can tenderize beef. *Intl. J. Food Sci. Technol.* 39: 471-480.
- Aranishi, F., K. Hara, K. Osatomi, T. Ishihara (1997) Purification and characterization of cathepsin B from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 117: 579-587.
- Asghar, A., K. Samejima, T. Yasui (1984) Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 22: 27-106.

- Ashton, T.J., I. Michie, I.A. Johnston (2010) A novel tensile test method to assess texture and gaping in salmon fillets. *J. Food Sci.* 74: S182-S190.
- Astier, C., J.-P. Labbe, C. Roustan, Y. Benyamin (1991) Sarcomeric disorganization in post-mortem fish muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B: 459-465.
- Astruc, T. (2014a) Carcass, composition, muscle structure, and contraction. In: *Encyclopedia of Meat Sciences*, edited by Dikeman, C.D.M., Elsevier, Oxford, UK, 2nd edition, 148-166.
- Astruc, T. (2014b) Connective tissue: structure, function and influence on meat quality, In: *Encyclopedia of Meat Science*, 2nd edition, edited by Dikeman, C.D.M., Elsevier, Oxford, 321-328.
- Astruc, T. (2014c) Muscle fiber types and meat quality. In: *Encyclopedia of Meat Sciences*, edited by Dikeman, C.D.M., Elsevier, Oxford, 2nd edition, 442-448.
- Aubourg, S.P., V. Quitral, M.A. Larrain, A. Rodríguez, J. Rodríguez, L. Maier, J. Vinagre (2007) Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage. *Food Chem.* 104: 369-375.
- Ayala, M.D., I. Abdel, M. Santaella, C. Martínez, M.J. Periago, F. Gil (2010) Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. *LWT Food Sci. Technol.* 43: 465-475.
- Bahuaud, D., T. Mørkøre, Ø. Langsrud, K. Sinnes, E. Veiseth, R. Ofstad (2008) Effects of  $-1.5^{\circ}\text{C}$  Super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) pre-rigor fillets: cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage. *Food Chem.* 111: 329-339.
- Bahuaud, D., M. Gaarder, E. Veiseth-Kent, M. Thomassen (2010) Fillet texture and protease activities in different families of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 310: 213-220.
- Bailey, A.J., C.M. Peach (1968) Isolation and structural identification of labile intermolecular crosslink in collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33: 812-819.
- Bailey, A.J. (1972) The basis of meat texture. *J. Sci. Food Agric.* 23: 995-1007.
- Bailey, A.J., T.J. Sims (1977) Meat tenderness, distribution of molecular species of collagen in bovine muscle. *J. Sci. Food Agric.* 28: 565-570.
- Bailey, A.J. (1989) The chemistry of collagen cross-links and their role in meat texture. 42nd Annual Reciprocal Meat Conference Proceedings 42: 127-135.
- Bailey, A.J., N.D. Light (1989) *Connective Tissue in Meat and Meat Products*. Elsevier Applied Science, London.
- Baki, A., P. Tompa, A. Alexa, O. Molnar, P. Friedrich (1996) Autolysis parallels activation of  $\mu$ -calpain. *Biochem. J.* 318: 897-901.
- Bate-Smith, E.C., J.R. Bendall (1947) Rigor mortis and adenosine triphosphate. *J. Physiol.* 106: 177-185.
- Bate-Smith, E.C., J.R. Bendall (1956) Changes in muscle after death. *Br. Med. Bull.* 12: 230-235.
- Benjakul, S., T.A. Seymour, M.T. Morrissey, H. An (1997) Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. *J. Food Sci.* 62: 729-733.
- Benjakul, S., K. Leelapongwattana, W. Visessanguan



- (2003a) Comparative study on proteolysis of two species of bigeye snapper, *Priacanthus macracanthus* and *Priacanthus tayenus*. J. Sci. Food Agric. 83: 871–879.
- Benjakul, S., W. Visessanguan, K. Leelapongwattana (2003b) Purification and characterization of heat-stable alkaline proteinase from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) muscle. Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol. 134: 579–591.
- Benjakul, S., W. Visessanguan, J. Tueksuban (2003c) Heat-activated proteolysis in lizardfish (*Saurida tumbil*) muscle. Food Res. Intl. 36: 1021–1028.
- Benjakul, S., W. Visessanguan, J. Tueksuban (2003d) Changes in physico-chemical properties and gel-forming ability of lizardfish (*Saurida tumbil*) during post-mortem storage in ice. Food Chem. 80: 535–544.
- Benjakul, S., W. Visessanguan, C. Chantarasuwan (2004) Cross-linking activity of sarcoplasmic fraction from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) muscle. LWT Food Sci. Technol. 37: 79–85.
- Bito, M., K. Yamada, Y. Mikumo, K. Amano (1983) Studies on rigor mortis of fish. 1. Difference in the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified Cutting's method. Bull. Tokai Reg. Fish Res. Lab. 109: 89-96.
- Bracho, G., N. Haard (1995) Identification of two matrix metalloproteinases in the skeletal muscle of pacific rockfish (*Sebastes* sp.). J. Food Biochem. 19: 299-319.
- Brauer, J.M.E., J.A.S. Leyva, L.B. Alvarado, O.R. Sandez (2003) Effect of dietary protein on muscle collagen, collagenase and shear force of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Euro. Food Res. Technol. 217: 277-280.
- Bremner, H.A., I.C. Hallett (1985) Muscle fiber-connective tissue junctions in the fish blue grenadier (*Macruronus novaezealandiae*). A scanning electron microscope study. J. Food Sci. 50: 975–980.
- Bremner, H.A. (1992) Fish flesh structure and the role of collagen - its post-mortem aspects and implications for fish processing. In: Quality Assurance in the Fish Industry, Edited by Huss H.H., Elsevier Science, 39-62.
- Bremner, H.A. (1999) Gaping in fish flesh. In: Extracellular Matrix of Fish and Shellfish, edited by Satp, K., M. Sakaguchi, H.A. Bremner, Research Signpost, Trivandrum, India, 81-94.
- Brown, W.D. (1986) Fish muscle as food, In: Muscle as Food. edited by Bechtel, P.J., Academic Press, London.
- Busconi, L., E.J. Folco, C.B. Martone, J.J. Sanchez (1989) Postmortem changes in cytoskeletal elements of fish muscle. J. Food Biochem. 13: 443-451.
- Buttkus, H. (1963) Red and white muscle of fish in relation to rigor mortis. J. Fish. Res. Board Can. 20: 45-58.
- Caballero, M.J., M. Betancor, J.C. Escrig, D. Montero, A. Espinosa de los Monteros, P. Castro (2009) Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. Aquaculture 291: 210-216.
- Campbell, K. (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton - extramatrix linkage. Cell 80: 675-678.
- Cao, M.-J., K. Osatomi, K. Hara, T. Ishihara (2000a) Identification of a myofibril-bound serine

- proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizard fish *Saurida wanieso* which specifically cleaves the arginine site. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 125: 255–264.
- Cao, M.-J., K. Osatomi, M. Suzuki, K. Hara, K. Tachibana, T. Ishihara (2000b) Purification and characterization of two anionic trypsin from the hepatopancreas of carp. *Fish. Sci.* 66: 1172–1179.
- Cao, M.-J., K. Hara, L.W. Zhang, W.J. Su (2005) Further characterization of a sarcoplasmic serine proteinase from the skeletal muscle of white croaker (*Argyrosomus argentatus*). *Biochem. (Moscow)* 70: 1163-1166.
- Castillo-Yañez, F.J., R. Pacheco-Aguilar, M.E. Lugo-Sanchez, G. Garcia-Sanchez, I.E. Quintero-Reyes (2009) Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin. *Food Chem.* 112: 634–639.
- Chéret, R., C. Delbarre-Ladrat, M.d. Lamballerie-Anton, V. Verrez-Bagnis (2007) Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chem.* 101: 1474-1479.
- Church, N. (1998) MAP fish and crustaceans - sensory enhancement. *Food Sci. Technol. Today* 12: 73-83.
- Connell, J.J. (1980) *Advances in fish science and technology*, Fishing News Books Ltd, Farnham.
- Coppes Petricorena, Z.L., A. Pavlisko, S. De Vecchi (2002) Texture measurements in fish and fish products. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 11: 89–105.
- Coppes Petricorena, Z.L. (2011) Texture measurements in fish and fish products. In: *Handbook of seafood quality, safety and health applications*. edited by Alasalvar, C., F. Shahidi, K. Miyashita, V. Wanasundara, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 130-138.
- Coppes Petricorena, Z.L. (2015) Chemical composition of fish and fishery products. In: *Handbook of Food Chemistry*, edited by Cheung, P.C.K., B.M. Mehta, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 403-435.
- Croall, D.E., G.N. Demartino (1991) Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 71: 813-847.
- Crupkin, M., C.A. Barassi, C.B. Martone, R.E. Trucco (1979) Effect of storing hake (*Merluccius merluccius hubbsi*) on ice on the viscosity of the extract of soluble muscle protein. *J. Sci. Food. Agric.* 30: 911-913.
- Cutting, C.L. (1939) Immediate post mortem changes in trawled fish. *G.B. Dep. Sci. Ind. Res. Rep. Food Invest. Board*, 39-40.
- Delbarre-Ladrat, C., V. Verrez-Bagnis, J. Noël, J. Fleurence (2004) Relative contribution of calpain and cathepsins to protein degradation in muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Food Chem.* 88: 389-395.
- Delbarre-Ladrat, C., R. Chéret, R. Taylor, V. Verrez-Bagnis (2006) Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure, *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 46: 409-421.
- Demirok, E., N. Kolsarıcı, S. Celik, Z. Dogan, S. Hamdan, F. Öztürk (2014) Proteolytic and

- sensory changes during marination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) flesh in pomegranate juice. *J. Aquatic Food Product Technol.* 23: 621-632.
- Dubost, A., D. Micol, B. Meunier, C. Lethias, A. Listrat (2013) Relationships between structural characteristics of bovine intramuscular connective tissue assessed by image analysis and collagen and proteoglycan content. *Meat Sci.* 93: 378–386.
- Dunajski, E. (1979) Texture of fish muscle. *J. Texture Stud.* 10: 301-318.
- Dutson, T.R. (1983) Relationship of pH and temperature to disruption of specific muscle proteins and activity of lysosomal proteases. *J. Food Biochem.* 7: 223-245.
- Eckhoff, K., I. Aidos, G. Hemre, O. Lie (1998) Collagen content in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and subsequent changes in solubility during storage on ice. *Food Chem.* 62: 197-200.
- Eggen, K., W. Ekholt (1995) Degradation of decorin in bovine *M. Semimembranosus* during postmortem storage. 41st ICoMST Proc. 662-663.
- Erikson, U., A.R. Beyer, T. Sigholt (1997) Muscle high-energy phosphates and stress affect K-values during ice-storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Food Sci.* 62: 43-47.
- Erikson, U., E. Misimi (2008) Atlantic salmon skin and fillet color changes effects by postmortem handling stress, rigor mortis, and ice storage. *J. Food Sci.* 73: C50-C59.
- Eskin, M.N.A., M. Aliani, F. Shahidi (2013) Meat and fish. In: *Biochemistry of foods*, edited by Eskin, M.N.A., Shahidi, F., Elsevier Inc., 127-185.
- Etherington, D.J., T.J. Sims (1981) Detection and estimation of collagen. *J. Sci. Food Agric.* 32: 539-546.
- Eyre, D.R., M.A. Paz, P.M. Gallop (1984) Crosslinking in collagen and elastin. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 717-748.
- Felberg, H.S., L. Hagen, G. Slupphaug, I. Batista, M.L. Nunes, R.L. Olsen, I. Martinez (2010) Partial characterisation of gelatinolytic activities in herring (*Clupea harengus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) possibly involved in post-mortem autolysis of ventral muscle. *Food Chem.* 119: 675-683.
- Fox, J., R. Taylor, M. Taffarel, J. Boyles, D. Goll (1993) Evidence that activation of platelet calpain is induced as a consequence of binding of adhesive ligand to the integrin glycoprotein IIbIIIa. *J. Cell Biol.*, 1993; 120:1501-1507.
- Gaarder, M.Ø., D. Bahuau, E. Veiseth-Kent, T. Mørkøre, M.S. Thomassen (2012) Relevance of calpain and calpastatin activity for texture in super-chilled and ice-stored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets. *Food Chem.* 132: 9-17.
- Garcia-Carreno, F. L., M.P. Hernandez-Cortes, N.F. Haard (1994) Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1456–1461.
- Geesink, G.H., M. Koohmaraie (1999) Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by m-calpain under postmortem conditions. *J. Animal Sci.* 77: 2685-2692.
- Geesink, G.H., J.D. Morton, M.P. Kent, R. Bickerstaffe (2000) Partial purification and characterization of Chinook salmon

- (*Oncorhynchus tshawytscha*) calpains and an evaluation of their role in postmortem proteolysis. *J. Food Sci.* 65: 1318-1324.
- Geesink, G.H, R.G. Taylor, A.E.D. Bekhit, R. Bickerstaffe (2001) Evidence against the non-enzymatic calcium theory of tenderization. *Meat Sci.* 59:417-422.
- Goll, D.E., Y. Otsuka, P.A. Nagainis, J.D. Shannon, S.K. Sathe, M. Muguruma (1983) Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. *J. Food Biochem.* 7: 137-177.
- Goll, D.E., W.C. Kleese, T. Kumamoto, J. Cong, A. Szpacenko (1989) In search of the regulation and function of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases (calpains). In: *Intracellular Proteolysis, Mechanisms and Regulation*, edited by Katsuma N., E. Kominami, Tokyo: Japanese Scientific Societies Press, 82-91.
- Goll, D.E., W.R. Dayton, I. Singh, R.M. Robson (1991) Studies of the  $\alpha$ -actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. *J. Biol. Chem.* 266: 8501-8510.
- Goll, D.E., V. Thompson, H. Li, W. Wei, J. Cong (2003) The calpain system. *Physiologic. Rev.* 83: 731-801.
- Gornik, S.G., A. Albalat, R.J.A. Atkinson, D.M. Neil (2009) Biochemical investigations into the absence of rigor mortis in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 373: 58-65.
- Granger, B.L., E. Lazarides (1978) The existence of an insoluble Z-disc scaffold in chicken skeletal muscle. *Cell (Cambridge Mass.)* 15: 1253-1268.
- Hallett, I.C., H.A. Bremner (1988) Fine structure of the myocommata-muscle fibre junction in hoki (*Macruronus novaezelandiae*). *J. Sci. Food Agric.* 44: 245-261.
- Hamoir, G., S. Konosu (1965) Carp myogens of white and red muscles. General composition and isolation of low molecular weight components of abnormal amino acid composition. *Biochem. J.* 96: 85-97.
- Harper, G.S. (1999) Trends in skeletal muscle biology and the understanding of toughness in beef. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 1105-1129.
- Harrd, N.F., B.K. Simpson (2000) *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvested seafood quality*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Hedges, N., R. Unilever, D. Sharnbrook (2002) Maintaining the quality of frozen fish. In: *Safety and quality issues in fish processing*, edited by Bremner, H.A., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 379-406.
- Heeley, D.H., C. Hong (1994) Isolation and characterization of tropomyosin from fish muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 108B: 95-106.
- Hernández-Herrero, M.M., G. Duflos, P. Malle, S. Bouquelet (2003) Collagenase activity and protein hydrolysis as related to spoilage of iced cod (*Gadus morhua*). *Food Res. Intl.* 36: 141-147.
- Ho, C.Y., M.H. Stromer, R.M. Robson (1994) Identification of the 30kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. *Biochimie*, 76: 369-375.
- Ho, M.-L., G.-H. Chen, S.-T. Jiang (2000) Effects of mackerel cathepsins L and L-like, and calpain on the degradation of mackerel surimi. *Fish. Sci.* 66: 558-568.
- Hochachka, P.W., R.W. Brill (1987) Autocatalytic



- pathways to cell death : a new analysis of the tuna burn problem. *Fish Physiol. Biochem.* 4: 81-87.
- Hocquette, J.F., F. Gondret, E. Baéza, F. Médale, C. Jurie, D.W. Pethick (2010) Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal* 4: 303–319.
- Howgate, P. (1979) *Food Microscopy*, edited by Vaughan, G.I., Academic Press, New York.
- Hu, Y., R. Ji, H. Jiang, J. Zhang, J. Chen, X. Ye (2012) Participation of cathepsin L in modori phenomenon in carp (*Cyprinus carpio*) surimi gel. *Food Chem.* 134: 2014–2020.
- Huff-Lonergan, E., T. Mitsuhashi, D.D. Beekman, F.C. Parrish Jr, D.G. Olson, R.M. Robson (1996) Proteolysis of specific muscle structural proteins by m-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *J. Animal Sci.* 74: 993-1008.
- Huff-Lonergan, E., S.M. Lonergan (1999) Postmortem mechanisms of meat tenderization: the roles of the structural proteins and the calpain system. In: *Quality Attributes of muscle foods*, edited by Xiong, Y., H. Chi-Tang, F. Shahidi, Springer, New York, 229-251.
- Huff-Lonergan, E., W. Zhang, S.M. Lonergan (2010) Biochemistry of postmortem muscle - lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci.* 86: 184-195.
- Hultmann, L., T. Rustad (2004) Iced storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*) - effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food Chem.* 87: 31-41.
- Hultmann, L., T. Rustad (2007) Effects of temperature abuse on textural properties and proteolytic activities during post mortem iced storage of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem.* 104: 1687-1697.
- Hwan, S.-F., E. Bandman (1989) Studies of desmin and  $\alpha$ -actinin degradation in bovine semitendinosus muscle, *J. Food Sci.* 54: 1426-1430.
- Ingolfssdottir, S. (1997) Post mortem changes in fish muscle proteins. Structural changes. In: *Methods to determine the freshness of fish in research and industry*. edited by Olafsdottir, G., J. Luten, P. Dalgaard, M. Careche, V. Verrez-Bagnis, E. Martinsdottir, K. Heia, Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness" AIRCT94 2283. Nantes. International Institute of Refrigeration, 198-203.
- Intarasirisawat, R., S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Prodpran, M. Tanaka, N.K. Howell (2007) Autolysis study of bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin and its effect on gelatin. *Food Hydrocolloids* 21: 537–544.
- Iozzo, R.V., L. Schaefer (2015) Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* 42: 11–55.
- Ishida, N., M. Yamashita, N. Koizumi, M. Terayama, T. Ineno, T. Minami (2003) Inhibition of post-mortem muscle softening following in situ perfusion of protease inhibitors in tilapia. *Fish. Sci.* 69: 632-638.
- Iwamoto, M., H. Yamanaka, S. Watabe, K. Hashimoto (1987) Effect of storage temperature on rigor mortis and ATP depletion in plaice

- (*Paralichthys olivaceus*) muscle. J. Food Sci. 52: 1514-1517.
- Iwamoto, M., H. Yamanaka, H. Abe, H. Ushio, S., Watabe, K. Hashimoto, K. (1988) ATP and creatine phosphate breakdown in spliced plaice muscle during storage, and activities of some enzymes involved. J. Food Sci. 53: 1662-1665.
- Jeacocke, R. (1984) The kinetics of rigor onset in beef muscle fibres. Meat Sci. 11: 237-251.
- Jerret, A., A. Holland (1998) Rigor tension development in excised rested, partially exercised, and exhausted Chinook salmon white muscle. J. Food Sci. 63: 48-52.
- Jiang, S.-T., J.-J. Lee, H.-C. Chen (1996) Proteolysis of actomyosin by cathepsins B, L, L-like, and X from mackerel (*Scomber australasicus*). J. Agric. Food Chem. 44: 769-773.
- Jiang, S.T. (2000) Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. Food Sci. Agric. Chem. 2: 55-74.
- Johnson, G.V.W., R.P. Guttman (1997) Calpains: intact and active. BioEssays 19: 1011-1018.
- Johnson, P. (1990) Calpains (intracellular calcium-activated cysteine proteinases) : structure-activity relationships and involvement in normal and abnormal cellular metabolism. Intl. J. Biochem. 22: 811-822.
- Jonsson, A., S. Sigurgisladottir, H. Hafsteinsson, K. Kristbergsson (2001) Textural properties of raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets measured by different methods in comparison to expressible moisture. Aquaculture Nutri. 7: 81-90.
- Joseph, C., G. Stier, R. O'Brien, A.S. Politou, R.A. Atkinson, A. Bianco, J.E. Ladbury, S.R. Martin, A. Pastore (2001) A structural characterization of the interactions between titin Z-repeats and the alpha-actinin C-terminal domain. Biochem. 40: 4957-4965.
- Kanawa, R., J.R. Ji, K. Takahashi (2002) Inactivity of m-calpain throughout postmortem aging of meat. J. Food Sci. 67: 635-638.
- Khantaphant, S., S. Benjakul (2010) Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). Food Chem. 120: 658-664.
- Kiessling, A., M. Espe, R. Roohonen, T. Morkore (2004) Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter isoeugenol or CO<sub>2</sub> anesthesia. Aquaculture 236: 645-657.
- Kim, S.K., P.L. Park, J.B. Kim, F. Shahidi (2002) Purification and characterization of a collagenolytic protease from the filefish, *Novoden modestrus*. J. Biochem. Mol. Biol. 35: 165-171.
- Klomkiao, S., S. Benjakul, W. Visessanguan (2004) Comparative studies on proteolytic activity of splenic extract from three tuna species commonly used in Thailand. J. Food Biochem. 28: 355-372.
- Klomkiao, S., S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura, B.K. Simpson (2006) Proteolytic degradation of sardine (*Sardinella gibbosa*) proteins by trypsin from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) spleen. Food Chem. 98: 14-22.
- Kong, F., J. Tang, M. Lin, B. Rasco (2008) Thermal effects on chicken and salmon muscles: Tenderness, cook loss, area shrinkage, collagen solubility and microstructure. LWT Food Sci. Technol. 41: 1210-1222.

- Koohmaraie, M., J.E. Schollmeyer, T.R. Dutson (1986) Effect of low-calcium-requiring calcium activated factor on myofibrils under varying pH and temperature conditions. *J. Food Sci.* 51: 28-32.
- Koohmaraie, M. (1992) The role of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 74: 239-245.
- Koohmaraie, M., S. Shackelford, T. Wheeler, S. Lonergan, M. Doumit (1995) A muscle hypertrophy condition in lamb (Callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *J. Animal. Sci.* 73: 3596-3606.
- Koohmaraie, M. (1996) Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat Sci.* 43: 193-201.
- Koretz, J., T. Irving, K. Wang (1993) Filamentous aggregates of native titin and binding of C-protein and AMP-deaminase. *Arch. Biochem. Biophys.* 304: 305-309.
- Kubota, M., M. Kinoshita, S. Kubota, M. Yamashita, H. Toyohara, M. Sakaguchi (2001) Possible implication of metalloproteinases in post-mortem tenderization of fish muscle. *Fish. Sci.* 67: 965-968.
- Kubota, M., M. Kinoshita, K. Takeuchi, S. Kubota, H. Toyohara, M. Sakaguchi (2003) Solubilization of type I collagen from fish muscle connective tissue by matrix metalloproteinase-9 at chilled temperature. *Fish. Sci.* 69: 1053-1059.
- Ladrat, C., V. Verrez-Bagnis, J. Noël, J. Fleurence (2002) Milli-calpain from sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) white muscle : purification, characterization of its activity and activation in vitro. *Mar. Biotechnol.* 4: 51-62.
- Ladrat, C., V. Verrez-Bagnis, J. Noël, J. Fleurence (2003) In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Effects of cathepsins B, D and L. *Food Chem.* 81: 517-525.
- Lametsch, R., P. Roepstorff, H.S. Møller, E. Bendixen (2004) Identification of myofibrillar substrates for m-calpain. *Meat Sci.* 68: 515-521.
- Lampila, L.E. (1990) Comparative microstructure of red meat, poultry and fish muscle. *J. Muscle Foods* 1: 247-267.
- Lanier, T.C., P. Carvajal, J. Yongsawatdigul (2005) Surimi gelation chemistry, In: *Surimi and Surimi Seafood*. edited by Park, J.W., 2nd edition, CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL.
- Lazarides, E., B.D. Hubbard (1976) Immunological characterization of the subunit of the 100 Å filaments from muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 4344-4348.
- Lebret, B., A. Listrat, N. Clochefert (1998) Age-related changes in collagen characteristics of porcine loin and ham muscles. *Proceedings of the 44th International Congress of Meat Science and Technology, Barcelona, Spain, August-September, 718-719.*
- Lee, H.J., H.J. Kim, S.H. Park, I.S. Yoon, G.-W. Lee, Y.J. Kim, M. S. Heu (2016) Recovery of serine protease inhibitor from fish roes by polyethylene glycol precipitation. *Fish. Aquatic Sci.* 19: 25.
- Lefaucheur, L. (2010) A second look into fibre typing—relation to meat quality. *Meat Sci.* 84: 257-270.

- Lepetit, J. (2008) Collagen contribution to meat toughness: theoretical aspects. *Meat Sci.* 80: 960-967.
- Lewis, G.J., P.P. Purslow (1990) Connective tissue differences in strength of cooked meat across the muscle fiber direction due to test specimen size. *Meat Sci.* 28: 183-194.
- Li, S., X. Xu, G. Zhou (2012) The roles of the actin-myosin interaction and proteolysis in tenderization during the aging of chicken muscle. *Poultry Sci.* 91: 150-160.
- Listrat, A., B. Leuret, I. Louveau, T. Astruc, M. Bonnet, L. Lefaucheur, B. Picard, J. Bugeon (2016) How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *Sci. World J.* 2016: 1-14.
- Liu, A., T. Nishimura, K. Takahashi (1996) Relationship between structural properties of intramuscular connective tissue and toughness of various chicken skeletal muscles. *Meat Sci.* 43: 43-49.
- Locker, R.H., N.G. Leet (1976a) Histology of highly stretched beef muscle. II. Further evidence on location and nature of gap filaments. *J. Ultrastructure. Res.* 55: 157-172.
- Locker, R.H., N.G. Leet (1976b) Histology of highly stretched beef muscle. IV. Evidence for movement of gap filaments through the Z-line, using the N-line and M-line as markers. *J. Ultrastructure. Res.* 56: 31-38.
- Locker, R.H. (1984) The role of gap filaments in muscle and meat. *Food Microstructure* 3: 17-32.
- Lødemel, J. B., R.L. Olsen (2003) Gelatinolytic activities in muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*), spotted wolffish (*Anarhichas minor*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Sci. Food Agric.* 83: 1031-1036.
- Lomiwes, D., M.M. Farouk, G. Wu, O.A. Young (2014) The development of meat tenderness is likely to be compartmentalized by ultimate pH. *Meat Sci.* 96: 646-651.
- Lougovois, V., V. Kyra (2005) Freshness quality and spoilage of chill-stored fish. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Love, R., J. Lavety, N. Garcia (1972a) The connective tissues of fish VI. Mechanical studies on isolated myocommata. *J. Food Technol.* 7: 291-301.
- Love, R.M., I. Roberson, G.L. Smith, K.J. Whittle (1972b) The texture of cod muscle. *J. Texture Stud.* 5: 201-212.
- Love, R.M. (1988) Gaping. In: *The Food Fishes: Their Intrinsic Variation and Practical Implication*, edited by Love, R.M., Farrand Press, London, 161-180.
- Marcuschi, M., T.S. Espósito, M.F.M. Machado, I.Y. Hirata, M.F.M. Machado, M.V. Silva, R.S. Bezerra (2010) Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 396: 667-673.
- Maruyama, K., S. Matsubara, R. Natori, Y. Nonomura, S. Kimura, K. Ohashi, F. Murakami, S. Handa, G. Eguchi (1976) Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and function. *J. Biochem. (Tokyo)* 82: 347-350.
- Maruyama, K. (1997) Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *FASEB J.* 11: 341-345.
- Mascarello, E., M.G. Romanello, P.A. Scapolo (1986) Histochemical and immunohistochemical profile of pink muscle



- fibres in some teleosts. *Histochemistry* 84: 251-255.
- Matsuishi, M., A. Okitani (1997) Proteasome from rabbit skeletal muscle : some properties and effects on muscle proteins. *Meat Sci.* 45: 451-462.
- Matsukura, U., A. Okitani, T. Nishimuro, H. Kato (1981) Mode of degradation of myofibrillar proteins by an endogenous protease, cathepsin L. *Biochim. Biophys. Acta* 662: 41-47.
- McCormick, R. (1994) The flexibility of the collagen compartment of muscle. *Meat Sci.* 36: 79-91.
- McCormick, R.J. (1999) Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. *Poultry Sci.* 78: 785-791.
- Mellgren, R. L. (1987) Calcium-dependent proteases : an enzyme system active at cellular membranes? *FASEB J.* 1: 110-115.
- Mestre Prates, J. (2002) Factors and mechanisms responsible for meat ageing. *Revue Med. Vet.* 153: 499-506.
- Meunier, B., B. Picard, T. Astruc, R. Labas (2010) Development of image analysis tool for the classification of muscle fibre type using immunohistochemical staining,” *Histochemistry Cell Biol.* 134: 307–317.
- Michie, I. (2001) Causes of downgrading in salmon farming industry. In: *Farmed Fishing Quality*, edited by Kestin, S.C., P.D. Warriss, Blackwell Science, Oxford, 129-136.
- Montero, P., J. Borderias (1990) Distribution and hardness of muscle connective tissue in hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb). *Z. Lebensm. Unters. F.* 189: 530-533.
- Mørkøre, T., J.L. Vallet, M. Cardinal (2001) Fat content and fillet shape of Atlantic salmon: relevance for processing yield and quality of raw and smoked products. *J. Food Sci.* 66: 1348–1354.
- Mørkøre, T., T.P.L. Mazo, V. Tahirovic, O. Einen (2008) Impact of starvation and handling stress on rigor development and quality of Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *Aquaculture* 277: 231-238.
- Múgica, B., J. Barros-Velázquez, J.M. Miranda, S.P. Aubourg (2008) Evaluation of a slurry ice system for the commercialization of ray (*Raja clavata*): Effects on spoilage mechanisms directly affecting quality loss and shelf-life. *LWT Food Sci. Technol.* 41: 974-981.
- Mykles, D.L., M.F. Haire (1995) Branched-chain-amino-acid-preferring peptidase activity of the lobster multicatalytic proteinase (proteasome) and the degradation of myofibrillar proteins. *Biochem. J.* 306: 285-291.
- Nakagawa, T., S. Watabe, K. Hashimoto (1988a) Electrophoretic analysis of sarcoplasmic proteins from fish muscle on polyacrylamide gels. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 993-998.
- Nakagawa, T., S. Watabe, K. Hashimoto (1988b) Identification of three major components in fish sarcoplasmic proteins. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 999-1004.
- Nakashima, K., A. Ohtsuka, K. Hayashi (1998) Effects of thyroid hormones on myofibrillar proteolysis and activities of calpain, proteasome, and cathepsin in primary cultured chick muscle cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 44: 799-807.
- Nakamura, Y.N., M. Ando, M. Seoka, K.I. Kawasaki, Y. Tsukamasa (2005) Comparison of the

- proximate compositions, breaking strength and histological structure by the muscle positions of the full-cycle cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fish. Sci.* 71: 605–611.
- Nalinanon, S., S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura (2008) Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food Hydrocolloids* 22: 615–622.
- Nazir, D.J., N.G. Magar (1963) Biochemical changes in fish muscle during rigor mortis. *J. Food Sci.* 28: 1-7.
- Nielsen, L. B., H.H. Nielsen (2001) Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 128: 351–363.
- Nishimura, T., A. Liu, A. Hattori, K. Takahashi (1998) Changes in mechanical strength of intramuscular connective tissue during postmortem aging of beef. *J. Animal Sci.* 76: 528-532.
- Nishimura, T. (2015) Role of extracellular matrix in development of skeletal muscle and postmortem aging of meat. *Meat Sci.* 109: 48–55.
- Obatake, A., H. Heya (1985) A rapid method to measure dark content in fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 51: 1001-1004.
- Obatake, A., S. Tsumiyama, Y. Yamamoto (1985) Extractive nitrogenous constituents from the dark muscle of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 5: 1461-1468.
- Ofstad, R., B. Egelandsdal, S. Kidman, R. Myklebust, R.L. Olsen, A.-M. Hermansson (1996) Liquid loss as effected by post mortem ultrastructural changes in 16 fish muscle: cod (*Gadus morhua* L) and salmon (*Salmo salar*). *J. Sci. Food Agric.* 71: 301-312.
- Ofstad, R., R.L. Olsen, R. Taylor, K.O. Hannesson (2006) Breakdown of intramuscular tissue of cod (*Gadus morhua* L.) and spotted wolffish (*Anarhichas minor* O.) related to gaping. *LWT Food Sci. Technol.* 39: 1143-1154.
- Ogata, H., F. Aranishi, K. Hara, K. Osatomi, T. Ishihara (1998) Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L. *J. Sci. Food Agric.* 76: 499-504.
- Oh, E.S., D.S. Kim, J.H. Kim, H.R. Kim (2000) Enzymatic properties of a protease from the hepatopancreas of shrimp, *Penaeus orientalis*. *J. Food Biochem.* 24: 251-264.
- Olson, D.G., F.C. Parrish, M.H. Stromer (1976) Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. *J. Food Sci.* 41: 1036-1041.
- Olsson, G., R. Ofstad, J. Lodemel, R. Olsen (2003) Changes in water-holding capacity of halibut muscle during cold storage. *Lebensm-Wiss. Technol.* 36: 771-778.
- Oury, M.-P., R. Dumont, C. Jurie, J.-F. Hocquette, B. Picard (2010) Specific fibre composition and metabolism of the rectus abdominis muscle of bovine Charolais cattle. *BMC Biochem.* 11: article 12.
- Papa, I., C. Alvarez, V. Verrez-Bagnis, J. Fleurence, Y. Benyamin (1996) Post mortem release of fish white muscle  $\alpha$ -actinin as a marker of disorganisation. *J. Sci. Food Agric.* 72: 63-70.
- Papa, I., C. Alvarez, V. Verrez-Bagnis, J. Fleurence, Y. Benyamin (1997a) Evidence for time dependent alpha-actinin delocalisation and

- proteolysis from post mortem fish white muscle (*Dicentrarchus labrax* and *Salmo trutta*). In: Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality, edited by Luten J.B., T. Borresen, J. Oehlenschläger, Elsevier Science, 247-252.
- Papa, I., R.G. Taylor, C. Astier, F. Ventre, M.C. Lebart, C. Roustan, A. Ouali, Y. Benyamin (1997b) Dystrophin cleavage and sarcolemma detachment are early post mortem changes on bass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle. *J. Food Sci.* 62: 917-921.
- Papadopoulos, L.S., S.B. Smith, T.L. Wheeler, G. Finne (1989) Muscle ultrastructural changes in freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* during iced storage. *J. Food Sci.* 54: 1125-1128.
- Park, P.J., S.H. Lee, H.G. Byun, S.H. Kim, S.K. Kim (2002) Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35: 576-582.
- Pawar, S. S., N.G. Magar (1965) Biochemical changes in catfish, tilapia, and mrigal fish during rigor mortis. *J. Food Sci.* 30: 121-125.
- Picard, B., M.P. Duris, C. Jurie (1998) Classification of bovine muscle fibres by different histochemical techniques. *Histochemical J.*, 30: 473-477.
- Pineiro, C., J. Barros-Velazquez, S.P. Aubourg (2004) Effects of newer slurry ice systems on the quality of aquatic food products: A comparative review versus flake-ice chilling methods. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 575-582.
- Pornrat, S., T. Sumate, S. Rommanee, K. Sumolaya, W. Kerr (2007) Changes in the ultrastructure and texture of prawn muscle (*Macrobrachium rosenbergii*) during cold storage. *LWT Food Sci. Technol.* 40: 1747-1754.
- Purslow, P.P. (1999) The intramuscular connective tissue matrix and cell/matrix interactions in relation to meat toughness. 45th ICoMST Proc. 210-219.
- Purslow, P.P. (2005) Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Sci.* 70: 435-447.
- Pushparajan, N., D. Varadharajan, P. Soundarapandian (2013) Microbial studies of prepared curries stored in tin free steel cans. *J. Food Process. Technol.* 4: 6-13.
- Realini, C.E., A. Vénien, P. Gou, P. Gatellier, M. Pérez-Juan, J. Danon, T. Astruc (2013) Characterization of Longissimus thoracis, Semitendinosus and Masseter muscles and relationships with technological quality in pigs, 1. Microscopic analysis of muscles. *Meat Sci.* 94: 408-416.
- Reedy, M., K. Holmes (1965) Induced changes in orientation of the cross-bridges of glycerinated insect flight muscle. *Nature* 207: 1276-1280.
- Reiser, K., R.J. McCormick, R.B. Rucker (1992) Enzymatic and nonenzymatic crosslinking of collagen and elastin. *FASEB J.* 6: 2439-2449.
- Rescan, P.-Y., B. Collet, C. Ralliere (2001) Red and white muscle development in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) as shown by in situ hybridisation of fast and slow myosin heavy chain transcripts. *J. Experimental Biol.* 204: 2097-2101.
- Saito, M., K. Sato, N. Kunisaki, S. Kimura (2000) Characterization of a rainbow trout matrix metalloproteinase capable of degrading type I collagen. *FEBS J.* 267: 6943-6950.
- Saito, M., H. Li, V.F. Thompson, N. Kunisaki, D.E.

- Goll (2007) Purification and characterization of calpain and calpastatin from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol. 146: 445-455.
- Sato, K., R. Yoshinaka, M. Sato, Y. Shimizu (1986) Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 52: 1595-1600.
- Sato, K., R. Yoshinaka, Y. Itoh, M. Sato (1989) Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissue of fish. Comp. Biochem. Physiol. 92B: 87-91.
- Sato, K., C. Ohashi, K. Ohtsuki, M. Kawabata (1991) Type v collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. J. Agric. Food Chem. 39: 1222-1225.
- Sato, K., M. Ando, S. Kubota, K. Origasa, H. Kawase, H. Toyohara, M. Sakaguchi, T. Nakagawa, Y. Makinodan, K. Ohtsuki, M. Kawabata (1997) Involvement of type V collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage. J. Agric. Food Chem. 45: 343-348.
- Sato, K., S. Uratsuji, M. Sato, S. Mochizuki, Y. Shigemura, M. Ando (2002) Effect of slaughter method on degradation of intramuscular type V collagen during short-term chilled storage of chub mackerel *Scomber japonicus*. J. Food Biochem. 26: 415-429.
- Seki, N., T. Watanabe (1984) Connectin content and its post-mortem changes in fish muscle. J. Biochem. 95: 1161-1167.
- Selvakumar, S., V. Bindhumol, P. Geraldine (2002) Quality changes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during storage. Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci. 4: 37-41.
- Senphan, T., S. Benjakul, H. Kishimura (2015) Purification and characterization of trypsin from hepatopancreas of Pacific white shrimp. J. Food Biochem. 39: 388-397.
- Sentandreu, M.A., G. Coulis, A. Ouali (2002) Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. Trends Food Sci. Technol. 13: 398-419.
- Shekhter, A.B., A.V. Balakireva, N.V. Kuznetsova, M.N. Vukolova, P.F. Litvitsky, A.A. Zamyatnin Jr. (2019) Collagenolytic Enzymes and their Applications in Biomedicine. Current Medicinal Chem. 26: 487-505.
- Shi, X.-Z., X.-F. Zhao, J.-X. Wang (2008) Molecular cloning and expression analysis of chymotrypsin-like serine protease from the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Fish & Shellfish Immunology 25: 589-597.
- Shigemura, Y., M. Ando, Y. Tsukamasa, Y. Makinodan, T. and Kawai (2003) Correlation of type V collagen content with post-mortem softening of fish meat during chilled storage. Fish. Sci. 69: 842-848.
- Shigemura, Y., M. Ando, K. Harada, Y. Tsukamasa (2004) Possible degradation of type I collagen in relation to yellowtail muscle softening during chilled storage. Fish. Sci. 70: 703-709.
- Shimada, K., D.H. Ahn, K. Takahashi (1998) Liberation of phospholipids from Z-disks of chicken skeletal muscle myofibrils by 0.1 mM calcium ions: weakening mechanism for Z-disks during post-mortem aging of meat. Biosci.,



- Biotechnol., Biochem. 62: 919-926.
- Sigholt, T., U. Erikson, T. Rustad, S. Johansen, T. Nordtvedt, A. Seland (1997) Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*). J. Food Sci. 62: 898-905.
- Sikorski, Z.E., D.N. Scott, D.H. Buisson (1984) The role of collagen in the quality and processing of fish. Crit. Rev. Food Sci. Nutri. 20: 301-343.
- Sikorski, Z.E., B. Sun Pan, F. Shahidi (1994) Seafood Proteins, Chapman and Hall, New York.
- Singh, A., S. Benjakul (2018) Proteolysis and its control using protease inhibitors in fish and fish products: a review. Comp. Rev. Food Sci Safety 17: 496-509.
- Skaara, T., J.M. Regenstein (1990) The structure and properties of myofibrillar proteins in beef, poultry and fish. J. Muscle Foods 1: 269-291.
- Skjervold, P., S. Fjaera, P. Ostby, O. Einen (2001) Live chilling and crowding in Atlantic salmon before slaughter. Aquaculture 192: 265-280.
- Sriket, C., S. Benjakul, W. Visessanguan (2010) Post-mortem changes of muscle from fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) as influenced by spawning stages. LWT Food Sci. Technol. 43: 608-616.
- Sriket, C., S. Benjakul, W. Visessanguan (2011a) Characterisation of proteolytic enzymes from muscle and hepatopancreas of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). J. Sci. Food Agric. 91: 52-59.
- Sriket, C., S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura (2011b) Collagenolytic serine protease in fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Characteristics and its impact on muscle during iced storage. Food Chem. 124: 29-35.
- Sriket, C., S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura (2011c) Collagenolytic serine protease in fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Characteristics and its impact on muscle during iced storage. Food Chem. 124: 29-35.
- Sriket, C., S. Benjakul, W. Visessanguan, K. Hara, A. Yoshida (2012a) Retardation of post-mortem changes of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) stored in ice by legume seed extracts. Food Chem. 135: 571-579.
- Sriket, C., S. Benjakul, W. Visessanguan, K. Hara, A. Yoshida, X. Liang (2012b) Low molecular weight trypsin from hepatopancreas of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Characteristics and biochemical properties. Food Chem. 134: 351-358.
- Sriket, C. (2014) Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention. Intl. Food Res. J. 21: 433-445.
- Steen, D., E. Claeys, L. Uytterhaegen, S. De Smet, D. Demeyer (1997) Early post-mortem conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscled beef. Meat Sci. 45: 307-319.
- Suzuki, T. (1981) Fish and Krill Protein: Processing Technology. Applied Science Publishers, London.
- Tahergorabi, R., S.V. Hosseini, J. Jaczynski (2011) Seafood proteins. In: Handbook of Food Proteins, edited by Phillips, G.O., Williams, P.A., Woodhead Publishing, 116-149.
- Takahashi, K., H. Saito (1979) Post-mortem changes in skeletal muscle connectin. J. Biochem. 85: 1539-1542.

- Takahashi, K., O.H. Kim, K. Yano (1987) Calcium-induced weakening of Z-disks in postmortem skeletal muscle. *J. Biochem.* 101: 767-773.
- Takahashi, K. (1992) Non-enzymatic weakening of myofibrillar structures during conditioning of meat: calcium ions at 0.1 mM and their effect on meat tenderization. *Biochimie*, 74: 247-250.
- Takahashi, K. (1996) Structural weakening of skeletal muscle tissue during post-mortem ageing of meat: the non-enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat Sci.* 43: S67-S80.
- Tatsumi, R., K. Takahashi (1992) Calcium-induced fragmentation of skeletal muscle nebulin filaments. *J. Biochem.* 112: 775-779.
- Taylor, R.G., G.H. Geesink, V.F. Thompson, M. Koohmaraie, D.E. Goll (1995) Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *J. Anim. Sci.* 73: 1351-1367.
- Taylor, R.G., I. Papa, C. Astier, F. Ventre, Y. Benyamin, A. (1997) Fish muscle cytoskeleton integrity is not dependent on intact thin filaments. *J. Muscle Res. Cell Motility* 18: 285-294.
- Taylor, R.G., M. Koohmaraie (1998) Effects of postmortem storage on the ultrastructure of the endomysium and myofibrils in normal and callipyge longissimus. *J. Anim. Sci.* 76: 2811-2817.
- Taylor, R.G., S.O. Fjaera, P.O. Skjervold (2002) Salmon fillet texture is determined by myofiber-myofiber and myofiber-myocommata attachment. *J. Food Sci.* 67: 2067-2071.
- Toldrá, F. (2006) Meat: chemistry and biochemistry. In: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*, Edited by Hui, Y.H., J.D. Culbertson, S. Duncan, I. Guerrero-Legarreta, E.C.Y. Li-Chan, C.Y. Ma, C.H. Manley, T.A. McMeekin, W.K. Nip, L.M.L. Nollet, M.S. Rahman, F., Toldrá, Y.L. Xiong, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 28.1-28.18.
- Toldrá, F., M. Flores, M.A. Sentandreu (2009) Muscle enzymes: exopeptidases and lipases. In: *Handbook of Muscle Foods Analysis*, edited by Nollet, L.M.L., F. Toldrá, CRC Press, Boca Raton, Florida, 112-128.
- Toldrá, F., M. Reig (2016) Seafood. In: *The stability and shelf life of food*, edited by Subramaniam, P., Elsevier Ltd, 505-519.
- Torres, J.A., Y.C. Chen, J. Rodrigo-Garcia j, J. Jaczynski (2007) Recovery of byproducts from seafood processing streams, In: *Maximising the Value of Marine By-products*. Edited by Shahidi, F., Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Toyohara, H., M. Kinoshita, Y. Shimizu (1990) Proteolytic degradation of threadfin-bream meat gel. *J. Food Sci.* 55: 259-260.
- Trinick, J. (1994) Titin and nebulin : protein rulers in muscle ? *TIBS* 19: 405-409.
- Trucco, R.E., H.M. Lupin, D.H., Giannini, M. Crupkin, R.L. Boeri, C.A. Barassi (1982) Study on the evolution of rigor mortis in batches of fish. *Lebensm. Wiss. Technol.* 15: 77-79.
- Tsuchiya, H., N. Seki (1991) Action of calpain on  $\alpha$ -actinin within and isolated from carp myofibrils. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1133-1139.
- Tsuchiya, H., S. Kita, N. Seki (1992) Post-mortem changes in  $\alpha$ -actinin and connectin in carp and rainbow trout muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 793-798.

- Tsuyuki, H., S. Williscroft, Z. Kabata, D. Whitaker (1982) The relationship between acid and neutral protease activities and the incidence of soft cooked texture in the muscle tissue of Pacific hake *Merluccius productus* infected with *Kudoa paniformis* and/or *K. thyrsites*, and held for varying times under different pre-freeze chilled storage conditions, Ottawa (No. 1130).
- Van Hau, P., S. Benjakul (2006) Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper (*Priganthus macracanthus*). *J. Food Biochem.* 30: 478–495.
- Vareltzis, K. (2000) Fish proteins from unexploited and underdeveloped sources. In: Novel macromolecules in food systems, edited by Doxastakis, G., V. Kiosseoglou, Elsevier, Amsterdam, 133–159.
- Venugopal, V., F. Shahidi (1996) Structure and composition of fish muscle. *Food Rev. Intl.* 12: 175-197.
- Venugopal, V. (2009) Marine products for healthcare: Functional and bioactive nutraceutical compounds from the ocean. CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL.
- Vercruyse, L., J.V. Camp, G. Smaggle (2005) ACE inhibitor peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8106–8115.
- Verrez-Bagnis, V., J. Noël, C. Sauterau, J. Fleurence (1999) Desmin degradation in postmortem fish muscle. *J. Food Sci.* 64: 240-242.
- Verrez-Bagnis, V., C. Ladrat, M. Morzel, J. Noël, J. Fleurence (2001) Protein changes in postmortem sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle monitored by one- and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 22: 1539-1544.
- Verrez-Bagnis, V., C. Ladrat, J. Noëlle, J. Fleurence (2002) In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L) by an endogenous  $\mu$ -calpain. *J. Sci. Food Agric.* 82: 1256–1262.
- Vigoreaux, J.O. (1994) The muscle Z band: lessons in stress management. *J. Muscle Res. Cell Motility* 15: 237-255.
- Visessanguan, W., S. Benjakul, H. An (2003) Purification and characterization of cathepsin L in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) muscle. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 134: 477–487.
- Wang, D., J. Tang, L.R. Correia, T.A. Gill (1998) Postmortem changes of cultivated Atlantic salmon and their effects on salt intake. *J. Food Sci.* 63: 634-637.
- Wang, K., J. McClure, A. Tu (1979) Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3698-3702.
- Wang, K., C.L. Williamson (1980) Identification of an N-line protein of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3254-3258.
- Wang, P.A., B. Vang, A.M. Pedersen, I. Martínez, R.L. Olsen (2011) Post-mortem degradation of myosin heavy chain in intact fish muscle: effects of pH and enzyme inhibitors. *Food Chem.* 124: 1090-1095.
- Wang, S., C. Jeng (1992) Interaction between titin and  $\alpha$ -actinin. *Biomed. Res.* 13: 197-202.
- Wasson, D.H., J.K. Babbitt, J.S. French (1993) Characterization of a heat stable protease from arrowtooth flounder. *J. Aquatic Food Product Technol.* 1: 167–182.
- Watabe, S., H. Ushio, M. Iwamoto, M. Kamal, H.

- Ioka, K. Hashimoto (1989) Rigor-mortis progress of sardine and mackerel in association with ATP degradation and lactate accumulation. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1833-1839.
- Watanabe, E., A.P.F. Turner (1993) Biosensors for the quality control of fish meat. *Agro-Food-Ind. Hi-Tech*, March/April: 1-16.
- Wikipedia (2020) Sarcomere.  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Sarcomere>.
- Winger, R.J., C.G. Pope (1981) Osmotic properties of post-rigor beef muscle. *Meat Sci.* 5: 355-369.
- Wu, G.-P., S.-H. Chen, G.-M., Liu, A. Yoshida, L.-J. Zhang, W.-J. Su, M.-J. Cao (2010) Purification and characterization of a collagenolytic serine proteinase from the skeletal muscle of red sea bream (*Pagrus major*). *Comp. Biochem. Physiol.* 155B: 281-287.
- Wu, J.-L., B.-J. Lu, M.-H. Du, G.-M. Liu, K.-J. Hara, W.-J. Su, M.-J. Cao (2008) Purification and characterization of gelatinase-like proteinases from the dark muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Agric. Food Chem.* 56: 2216-2222.
- Yamaguchi, K., J. Lavety, R. Love (1976) The connective tissues of fish VIII. Comparative studies on hake, cod and catfish collagens, J. *Food Technol.* 11: 389-399.
- Yamashita, M., S. Konagaya (1990a) High activities of cathepsins B, D, H and L in the white muscle of chum salmon in spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B: 149-152.
- Yamashita, M., S. Konagaya (1990b) Purification and characterization of cathepsin B from the white muscle of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 96: 733-737.
- Yamashita, M., S. Konagaya (1991) Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1917-1922.
- Yates, L.D., T.R. Dutson, J. Caldwell, Z.L. Carpenter (1983) Effect of temperature and pH on the post-mortem degradation of myofibrillar proteins. *Meat Sci.* 9: 157-179.
- Yongsawatdigul, J., P. Piyadhamviboon (2004) Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. *Food Chem.* 87: 447-455.
- Yoshida, A., I. Bae, H. Sonoda, R. Masuo, S. Oda, M.-J. Cao, K. Hara (2009) Characterization of gelatinolytic enzymes in the skeletal muscle of red sea bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.* 75: 1317-1322.
- Yoshida, A., M. Ohta, K. Kuwahara, M.-J. Cao, K. Hara, K. Osatomi (2015) Purification and characterization of cathepsin B from the muscle of horse mackerel *Trachurus japonicus*. *Marine Drugs* 13: 6550-6565.
- Young, O.A., A.E. Graafhuis, C.L., Davey (1980) Post-mortem changes in cytoskeletal proteins of muscle. *Meat Sci.* 5: 41-55.
- Yu, L.P., Y.B. Lee (1986) Effects of postmortem pH and temperature muscle structure and meat tenderness. *J. Food Sci.* 51: 774-780.
- Zamora, F., E. Debiton, L. Lepetit, A. Lebert, E. Dransfield, A. Ouali (1996) Predicting variability of ageing and toughness in beef M. Longissimus lumborum et thoracis. *Meat Sci.* 43: 321-333.
- Zeece, M.G., K. Katoh, R.M. Robson, F.C. Parrish (1986) Effect of cathepsin D on bovine



myofibrils under different conditions of pH and temperature. *J. Food Sci.* 51: 769-773.

Zhou, L.S., E.C.Y. Li-Chan (2009) Effects of Kudoa spores, endogenous protease activity and frozen storage on cooked texture of minced Pacific hake (*Merluccius productus*). *Food Chem.* 113: 1076–1082.

