

南极磷虾肉冻融循环过程水分的迁移及微观结构变化

刁华玉¹, 林松毅^{1,2,3}, 梁瑞¹, 刘瑶¹, 何雪晴¹, 孙娜^{1,2,3*}

(¹ 大连工业大学食品学院 辽宁大连 116034

² 国家海洋食品工程技术研究中心 辽宁大连 116034

³ 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034)

摘要 以冷冻南极磷虾肉为研究对象,基于低场核磁共振(LF-NMR)及磁共振成像(MRI)技术,结合解冻汁液损失率、离心损失率,分析南极磷虾肉在反复冷冻-解冻循环过程中水分的迁移规律。借助电子、光学显微成像和 SDS-PAGE 观察反复冻融后南极磷虾肉肌原纤维结构及蛋白质的变化,并通过硫代巴比妥酸值(TBA)判断其脂质氧化情况。结果表明:随着反复冻融次数的增加,南极磷虾肉的解冻汁液损失率和离心损失率均显著增加($P<0.05$),同时 MRI 氢质子加权伪彩图亮度逐渐下降,表明南极磷虾肉内水分含量逐渐降低。LF-NMR 结果显示:强结合水和结合水含量无显著性变化($P>0.05$),不易流动水含量显著减少($P<0.05$),自由水含量显著增加($P<0.05$),表明冻融循环中南极磷虾肉的不易流动水向自由水迁移。由相关性分析结果可知,不易流动水和自由水的 NMR 参数与解冻汁液损失率极显著相关性($P<0.01$)。反复冻融后冰晶生长使南极磷虾肉的肌原纤维排列由整齐紧密变为杂乱,甚至发生断裂,SDS-PAGE 分析表明南极磷虾肉经反复冻融后其肌球蛋白重链完全降解,肌动蛋白、肌钙蛋白 T 和肌球蛋白轻链均有不同程度的降解,而 TBA 值无显著变化($P>0.05$)。结论:反复冻融使南极磷虾肉水分迁移、蛋白降解,而对脂质氧化影响不显著。

关键词 南极磷虾肉; 反复冻融; 水分迁移; 微观结构; 蛋白降解

文章编号 1009-7848(2022)06-0242-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.06.025

南极磷虾(*Euphausia superba*)又称大磷虾或南极大磷虾,是一种生活在南极海域的海洋甲壳生物,也是地球上发现的生物量最大的单一物种,其总生物量约 1.25~7.25 亿 t,年可捕捞量约 0.15~1.00 亿 t^[1]。因其富含优质蛋白,而被认为地球上最大,也是最后一个潜在动物性蛋白资源库^[2],由此世界各国将其列为重要的经济战略资源并进行开发。南极磷虾由于营养丰富,含水量高,体内含有大量的自溶酶,极易腐败变质,因此,新鲜南极磷虾在捕捞后必须 1~3 h 内在船上加工以防止其自溶^[3]。加工后的虾肉经快速冻结后冷链运输至陆地,进行冷冻贮藏或加工^[4]。

通常情况下,水产品长途运输、贮藏和消费中因温度波动,不可避免发生局部融化,再冷冻,从而出现反复冻融现象,使产品品质劣变。这是由于反复冻融使食物内部产生大量冰晶,这些冰晶对细胞造成不可逆伤害,包括组织结构破坏、

脂质氧化和蛋白质变性等^[5],最终造成肌肉品质下降。另外,肌肉的品质变化与其水分分布及持水能力下降也有很大关系^[6]。Wachirasiri 等^[7]发现随着冻融次数的增加,解冻汁液损失率增加,脂质氧化程度加重。Cao 等^[8]发现红鲷鱼在冻融循环过程中水分分布发生变化,即固定水含量下降,自由水含量增加,微观结构遭到破坏。不仅如此,Lan 等^[9]通过 SDS-PAGE 发现南美白对虾经多次冻融循环后,蛋白质降解速度加快,结构特性急剧下降。由此可见,反复冻融会使水产品发生水分迁移、蛋白降解、脂肪氧化等品质劣变现象。

本研究以南极磷虾肉为原料,基于 LF-NMR 和 MRI 技术,结合解冻损失率和离心损失率,探究南极磷虾肉在反复冻融过程中水分的迁移规律,肌原纤维结构和蛋白结构的变化规律。通过测定 TBA 值,判断南极磷虾肉在反复冻融过程中的脂质氧化情况,虾肉品质下降的机理。

1 材料与方法

1.1 试验原料

冷冻南极磷虾肉由辽渔集团有限公司提供,

收稿日期: 2021-06-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(32022067);辽宁省海洋经济发展项目(辽自然资发[2022]47号)

作者简介: 刁华玉(1997—),女,硕士生

通信作者: 孙娜 E-mail: sunna1215@126.com

冷冻条件下运送至实验室,贮藏在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 主要试剂

37%甲醛溶液、2.5%戊二醛(电镜专用)、无水乙醇、盐酸、氯化钾、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、 β -巯基乙醇、溴酚蓝、冰乙酸、2-硫代巴比妥酸、三氯乙酸、标准硫酸铜溶液。

1.3 主要仪器与设备

MesoQMR23-060H 核磁共振成像分析仪,上海纽迈电子科技有限公司;CF16RXII 高速冷冻离心机,日本 HITACHI 公司;Leica 光学显微镜,德国 Leica 公司;JSM-7800F 场发射扫描电镜,日本东京杰尔有限公司;T25 数显匀浆机,德国 IKA 公司;垂直电泳系统,北京百晶生物技术有限公司;MF-CheniBIS 2.0 凝胶成像仪,以色列 DNR 成像系统有限公司;Infinite M200 多功能酶标仪,瑞士 TECAN 公司。

1.4 试验方法

1.4.1 反复冻融处理 将冷冻南极磷虾肉置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下进行解冻,待完全解冻后,将南极磷虾肉分装于高为 1.5 cm 、直径为 2.8 cm 的小盒中,作为初始样品。分装后的初始样品于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中进行冷冻 22 h ,随后取出置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下解冻 2 h ,即为1次冻融循环。分别于冻融 $0,1,3,5,7$ 次后取样用于指标分析。

1.4.2 低场核磁共振(LF-NMR)横向弛豫信号采集 将标准硫酸铜溶液置于直径为 60 mm 的核磁管中然后放入低场核磁成像分析仪中。磁体强度 0.5 T 、磁体温度 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。先利用 FID 序列稳定磁场,找出中心频率,然后寻找 90° 和 180° 脉冲宽度,然后取出标准硫酸铜溶液,将反复冻融后的南极磷虾肉样品放入低场核磁成像分析仪中,再用 CPMG 序列采集样品横向弛豫信号。信号采集参数: 90° 和 180° 脉冲时间分别为 $10\text{ }\mu\text{s}$ 和 $50\text{ }\mu\text{s}$,重复采样等待时间为 $3\text{ }000\text{ ms}$,RG1 为 10 ,DRG1 为 1 ,PRG 为 2 ,NECH 为 $1\text{ }500$,NS 为 8 。每次重复采样 3 次,然后使用 MultiExpInv Analysis 软件,结合迭代重建技术(SIRT)对 CPMG 弛豫数据进行多指数拟合,最后得到弛豫时间及每个峰面积的比例。

1.4.3 磁共振成像(MRI)测定 采用多层自旋回波(SE)序列对反复冻融的南极磷虾肉进行磁共振成像。打开 Nmimaging 软件,然后将标准硫酸铜溶

液放入低场核磁成像分析仪中,选择 Save Raw Fid File 和 Open without Filtering,点击 1-PRESCAN 后取出标准硫酸铜溶液,将反复冻融后的南极磷虾肉样品放入低场核磁成像分析仪中,按照 2-SCOUT、3-SCAN 顺序对样品进行扫描。参数设置如下:层数:1,视野 Fov: $100\text{ mm}\times 100\text{ mm}$,Read size:256,Phase size:192,氢质子加权成像的重复时间 TR: $2\text{ }100\text{ ms}$,回波时间 TE: 20 ms ,扫描次数 Average:2。使用 Osirix (OsiriX Life v.7.0.4, Geneva, Switzerland)软件绘制伪彩色图像。

1.4.4 解冻汁液损失测定 准确称量初始南极磷虾肉的质量,记为 m_1 ,经冻融处理后,利用滤纸吸干南极磷虾肉表面的水分,此时南极磷虾肉质量记为 m_2 。样品的解冻汁液损失率按如下公式进行计算。

$$\text{汁液流失率}(\%) = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

1.4.5 离心损失测定 参考林竹^[10]的方法,准确称量初始南极磷虾肉的质量,记为 m_1 ,经冻融处理后,用滤纸将南极磷虾肉包住,并于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 $5\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min ,离心后的质量记为 m_2 。样品的离心损失率按如下公式进行计算。

$$\text{离心损失率}(\%) = \frac{(m_1 - m_2)}{m_2} \times 100 \quad (2)$$

1.4.6 H & E 染色观察组织学变化 参考 Zhang 等^[11]的方法稍作修改。将南极磷虾肉浸泡于 37% 甲醛溶液中进行固定,固定后的样品用一系列乙醇溶液脱水。脱水后的样品用石蜡进行包埋,再用切片机切成 $2.5\sim 3\text{ }\mu\text{m}$ 厚的薄片。最后,用 H&E 对组织切片进行染色,在光学显微镜下观察肌肉的显微结构变化。

1.4.7 扫描电镜观察 将反复冻融后南极磷虾肉放入 2.5% 戊二醛(电镜专用)溶液中于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 48 h ,然后用清水冲洗 3 次,再用乙醇梯度脱水($40\%, 50\%, 60\%, 80\%, 90\%, 100\%$),每次 15 min 。置于 $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中预冷,然后置于冷冻干燥机内真空干燥 72 h ,取出喷金,通过场发射扫描电镜观察南极磷虾肉组织微观结构。

1.4.8 肌原纤维蛋白提取 参考柳佳彤^[12]的方法稍作修改。向南极磷虾肉中加入 10 倍体积的预冷 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L

KCl, pH 7.0), 8 000 r/min 匀浆 1 min, 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min, 保留沉淀并重复洗涤沉淀 2 次, 然后向沉淀中加入 3 倍体积预冷 Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 0.6 mol/L KCl, pH 7.0), 匀浆 1 min, 4 °C 静置 1 h, 4 °C、10 000 g 离心 15 min, 得到的上清液即肌原纤维蛋白(MP)溶液。

1.4.9 SDS-PAGE 分析 采用双缩脲测定上述 MP 的浓度, 并将 MP 浓度调节至 2 mg/mL。将 MP 溶液与 SDS-PAGE 样品缓冲液(5×)混合均匀, 于沸水中加热 5 min, 即得到电泳样品。SDS-PAGE 凝胶电泳采用 12% 分离胶, 5% 浓缩胶, 进样量为 5 μL。浓缩胶电压为 80 V, 分离胶电压为 100 V。用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 3 h, 再用醋酸乙醇溶液脱色至条带清晰, 最后在凝胶成像仪上进行拍照。

1.4.10 硫代巴比妥酸值 (TBA) 的测定 参考 John 等^[13]方法略作修改。称取 1 g 南极磷虾肉, 加入 5 mL 储备液 (含有 0.375% 2-硫代巴比妥酸, 15% 三氯乙酸和 0.25 mol/L 盐酸), 然后置于沸水中加热 20 min, 再用流水冷却。4 °C、8 000 r/min, 离心 15 min, 在 532 nm 处测上清液吸光值。

$$\text{TBA (mg/kg)} = A_{532} (\text{样品}) \times (1\text{M}/1.56 \times 10^5) \times [1 (\text{mol/L})/M \times (m+5) \times 10^{-3} (\text{L/g}) \times 72.07 (\text{g/mol}) \times 1\ 000 (\text{mg/g}) \times 1\ 000 (\text{g/kg})]$$

式中: M ——丙二醛分子质量 (g/mol)。

1.5 数据处理

试验数据采用 3 次平行试验的平均值, 数据间的差异通过 SPSS 软件进行统计分析, 结果以平均值±标准差表示。数据用 Origin Pro 8.5 软件制图。

2 结果与分析

2.1 反复冻融对南极磷虾肉持水能力的影响

解冻汁液损失率和离心损失率可反映肌肉的持水能力。由表 1 可知, 南极磷虾肉经过 7 次反复冻融后, 解冻汁液损失率从 14.3% 增加到 25.9%, 离心损失率从 45.0% 增加到 54.5%, 且差异显著 ($P < 0.05$), 该结果与 Du 等^[14]报道的结果一致。造成这种结果的原因可能是, 虾肉中的水分经反复冻融后形成体积较大的冰晶, 对肌肉组织和肌原纤维蛋白造成破坏^[15], 使细胞膜受损, 导致细胞液

表 1 南极磷虾肉经反复冻融后持水能力的变化

Table 1 Changes of water holding capacity of Antarctic kill meat after multiple freeze-thaw cycles

反复冻融次数	解冻汁液损失率/%	离心损失率/%
0	14.3 ± 1.7 ^a	45.0 ± 6.5 ^a
1	18.5 ± 0.8 ^b	53.1 ± 3.2 ^{ab}
3	18.9 ± 0.6 ^b	45.0 ± 3.6 ^a
5	21.7 ± 0.6 ^{bc}	51.7 ± 1.6 ^{ab}
7	25.9 ± 1.0 ^d	54.5 ± 4.9 ^b

注: 同一列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

流失^[6], 即持水能力下降。另外, 解冻汁液损失率的升高较离心损失率升高明显, 该结果与李玫等^[17]研究结果相似。

2.2 基于 LF-NMR 和 MRI 技术解析南极磷虾肉在冻融循环中水分迁移规律

低场核磁共振 (LF-NMR) 和磁共振成像 (MRI) 技术可应用于水产品中水分状态及分布的监测, 其中 LF-NMR 技术可快速、无损且直观地展示出水产品内部的质子信号及其变化, 可检测水产品中水分的结合状态、含量及迁移; MRI 技术具有内部可视化的特点, 可直观反映水产品内部各层面质子分布情况^[18]。如图 1 所示, 南极磷虾肉经 7 次反复冻融后得到 MRI 氢质子加权核磁成像的伪彩图 (a) 和对应的定量氢质子信号强度 (b)。通常情况下, 图像中的红色代表高质子密度, 蓝色代表低质子密度, 颜色越深信号强度越高, 反之, 信号强度越低。如图 1a, 随着反复冻融次数的增加, 图像的亮度逐渐下降, 红色区域分布不均匀, 表明南极磷虾肉中水分的含量在逐渐降低且分布发生改变。这可能是因为反复冻融导致冰晶生长破坏了细胞结构, 使细胞内的水分流失。另外还可以观察到样品的孔洞数量增加, 这可能与南极磷虾肉的内部结构发生变化有关。图 1b 中的氢质子信号强度也随着反复冻融次数的增加而逐渐下降, 表明南极磷虾肉中的水分越来越少, 与氢质子核磁成像中观察到结果一致, 也进一步证明了反复冻融会使南极磷虾肉的持水能力下降。

进一步地, 采用 LF-NMR 横向弛豫时间 (T_2) 分析南极磷虾肉在反复冻融循环中水分状态及分布的变化情况。如图 2a 所示, 南极磷虾肉 LF-NMR 的弛豫信号曲线由 4 个峰组成。第 1 个峰为

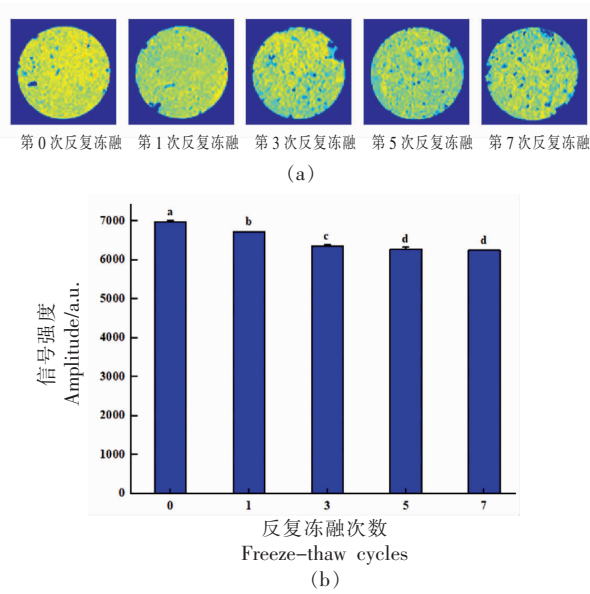


图 1 南极磷虾肉在不同反复冻融次数下的氢质子密度核磁共振成像(a)和对应的定量信号强度直方图(b)
Fig.1 Hydrogen-proton density NMR imaging of Antarctic krill meat (a) and corresponding quantitative signal intensity histogram (b) under different multiple freeze-thaw cycles

T_{2b} , 出峰时间范围为 0.1~1 ms, 这部分水通常是与大分子物质如蛋白质等结合的水, 也称为强结合水, 这部分水极其稳定, 通过表 2 和图 2b 可知, 在反复冻融 7 次后, 这部分水的弛豫时间和峰面积比率均无显著变化($P > 0.05$)。第 2 个峰为 T_{21} , 出峰时间范围为 1~10 ms, 这部分水通常是与肌纤维紧密结合的水, 也称为结合水, 这部分水也很稳定, 由表 2 和图 2b 可知, 经过反复冻融 7 次后, 这部分水的弛豫时间和峰面积比率也均无显著变化($P > 0.05$)。第 3 个峰为 T_{22} , 出峰时间范围为 10~100 ms, 这部分水通常是肌纤维外的不易流动的水, 也称为固定水。 T_{22} 随着反复冻融次数的增加而减少(表 2), 该部分水的峰面积比率也逐渐下降(图 2b), 表明不易流动水流动性和含量在经过反复冻融后开始逐渐下降, 固定水向自由水方向迁移, 虾肉内的水分分布发生了变化。在冻结过程中, 水的转运速度高于冰晶的形成速度, 就可能导致水分的再分布^[19]。这与 Ali 等^[20]发现的结果一致, 固定水含量下降可能是受肌纤维变性、聚集和

收缩影响的水和蛋白质质子之间的化学交换所导致的^[21]。另外, 由于固定水占总水量的 90% 以上, 其对虾肉的持水能力也有重要影响。固定水的弛豫时间越短, 含量越少, 持水能力也越弱^[6]。第 4 个峰为 T_{23} , 出现时间范围为 100~1 000 ms, 这部分水极易发生迁移且不稳定, 通常称为自由水。 T_{23} 弛豫时间逐渐下降(表 2), 说明反复冻融使固定水转变成自由水, 虾肉组织中的水分含量降低^[9]。该结果与 Cao 等^[8]的结果一致。然而, 经过 7 次反复冻融后自由水的峰面积比率逐渐增加(图 2b), 这可能是因为反复冻融导致冰晶增长使水不断从细胞内转移到细胞外, 导致自由水含量增加^[9]。

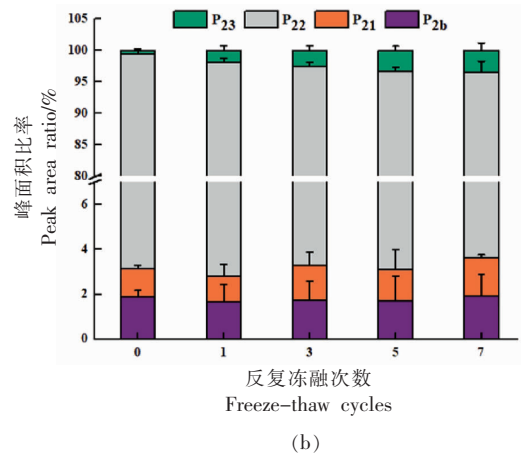
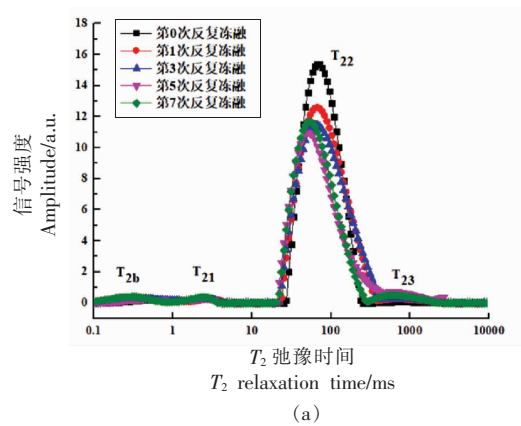


图 2 南极磷虾肉经反复冻融后 T_2 弛豫时间变化(a)和水分分布变化(b)

Fig.2 Changes in T_2 relaxation time (a) and water distribution (b) of Antarctic krill meat after multiple freeze-thaw cycles

表2 南极磷虾肉经反复冻融后横向弛豫参数的变化

Table 2 Changes of lateral relaxation parameters of Antarctic krill meat after multiple freeze-thaw cycles

冻融次数	T_2 弛豫时间				A_2 峰面积			
	T_{2b}	T_{21}	T_{22}	T_{23}	A_{2b}	A_{21}	A_{22}	A_{23}
0	0.6 ± 0.2^a	2.9 ± 0.1^a	69.1 ± 2.8^a	749.2 ± 29.7^a	5.8 ± 0.8^a	3.8 ± 0.5^a	293.5 ± 1.5^a	1.5 ± 0.8^a
1	0.7 ± 0.3^a	3.0 ± 0.2^a	67.5 ± 0.0^a	667.0 ± 0.0^a	5.1 ± 2.3^a	3.4 ± 1.5^a	287.5 ± 7.0^a	5.6 ± 2.4^{ab}
3	0.3 ± 0.1^a	2.3 ± 0.4^a	60.1 ± 2.4^b	652.1 ± 25.8^{bc}	5.2 ± 2.5^a	4.5 ± 1.8^a	277.5 ± 5.6^a	7.3 ± 2.5^b
5	0.4 ± 0.2^a	2.3 ± 0.6^a	52.3 ± 2.1^c	622.2 ± 0.0^c	4.6 ± 3.0^a	3.7 ± 2.2^a	248.5 ± 11.3^b	8.9 ± 1.6^b
7	0.3 ± 0.0^a	2.2 ± 0.3^a	54.8 ± 0.0^c	622.2 ± 0.0^c	5.2 ± 2.4^a	4.6 ± 0.6^a	251.5 ± 18.7^b	9.2 ± 2.9^b

注:同一列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 南极磷虾肉持水能力与 NMR 参数相关性分析

通过皮尔逊相关系数对南极磷虾肉的持水能力与 NMR 参数进行相关性分析,结果如表 3 所示,解冻损失率与 T_{22} 、 T_{23} 、 A_{22} 、 P_{22} 呈极显著负相关($P < 0.01$),与 A_{23} 、 P_{23} 呈极显著正相关($P < 0.01$),这

是因为在反复冻融过程中, T_{22} 、 T_{23} 、 A_{22} 、 P_{22} 呈下降趋势,而 A_{23} 、 P_{23} 呈上升趋势。该结果可说明 NMR 参数可间接反映南极磷虾肉的持水能力。而离心损失率在 7 次反复冻融中的变化不如解冻汁液损失率变化大,因此其与 NMR 参数之间没有显著相关性。

表3 南极磷虾肉持水能力与 NMR 参数的相关性

Table 3 Correlation between water holding capacity of Antarctic krill meat and NMR parameters

	T_{22}	T_{23}	A_{22}	A_{23}	P_{22}	P_{23}
解冻汁液损失率	-0.773**	-0.834**	-0.750**	0.697**	-0.745**	0.713**
离心损失率	-0.289	-0.475	-0.353	0.320	-0.330	0.324

注:**表示 $P < 0.01$ 。

2.4 南极磷虾肉在反复冻融循环中肌原纤维微观结构的变化规律

通过图 3a 可观察到,南极磷虾肉在第 0 次反复冻融时,其肌原纤维排列整齐连贯且比较紧密(红色染色),肌原纤维之间可观察到一些小冰晶(白色区域)^[11]。经过多次反复冻融后,南极磷虾肉肌原纤维发生断裂,且出现排列不规整现象,尤其是从第 5 次冻融后,肌原纤维之间的间隙变得越来越明显,冰晶体积增大、数量减少,大小与形状越来越不规整,肌原纤维之间排列越来越杂乱无章,说明反复冻融可以使肌肉细胞内的冰晶增长,这是因为在贮藏过程中,由于溶质的反扩散,冰晶的生长促使细胞外溶液更加浓缩,使肌原纤维进一步脱水,从而降低了表面的凝固点温度,为冰晶在细胞内生长提供了更多的空间以产生更大的冰晶^[22],这些更大的冰晶对肌原纤维的破坏力也更大,使肌纤维严重变形,造成这种结果的原因可能是大的冰晶对肌原纤维的压力更大。这也使细胞

内的物质释放到细胞间隙,同时这些被扩大的胞外间隙很可能是造成解冻汁液损失率增加的原因^[23]。肌原纤维的破坏程度加深会使南极磷虾肉对水分的保持能力越来越小,造成虾肉内的水分流失越来越严重,这也进一步验证了持水能力和低场核磁的结果。

通过场发射扫描电镜能够更细致地观察到肌纤维的变化。如图 3b 所示,不同反复冻融处理的南极磷虾肌纤维束表面有颗粒状物质,这些物质可能是肌内膜和肌束膜等结缔组织和某些肌浆蛋白降解产生的^[24]。柳佳彤^[12]在罗氏沼虾冻藏过程中通过扫描电镜也发现了类似的颗粒状物质。另外,虾肉经过多次反复冻融后,肌纤维束之间缝隙越来越大,甚至发生断裂。在反复冻融过程中,肌肉组织结构的逐渐疏松可能与蛋白质变性和肌内膜破坏有关^[25],而蛋白质变性可能是由于在反复冻融过程中冰晶对蛋白质的完整性造成了破坏。Jommark 等^[26]通过扫描电镜观察到太平洋白虾在

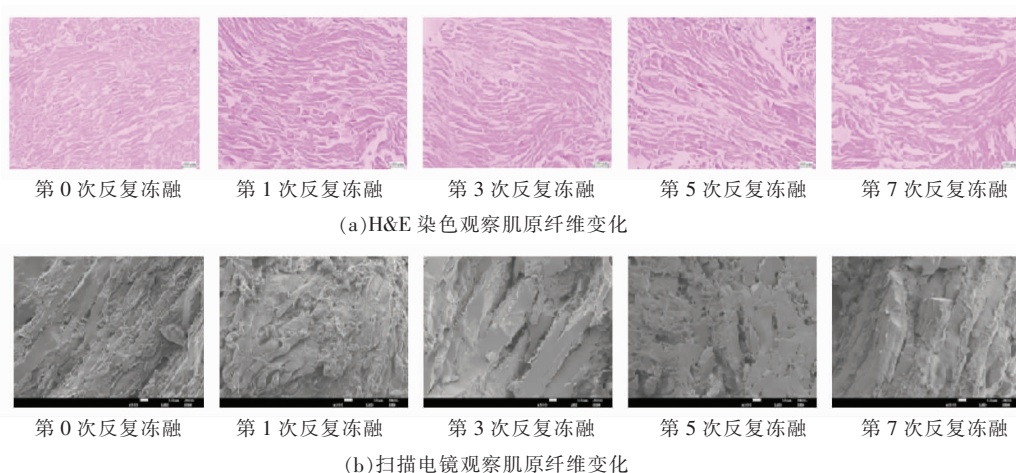


图 3 南极磷虾肉经反复冻融后微观结构分析

Fig.3 Microstructure analysis of Antarctic krill meat after multiple freeze-thaw cycles

冻融循环过程中肌肉组织之间有较大的空隙,结构受损,与本研究结果一致。

2.5 南极磷虾肉在反复冻融循环中肌原纤维蛋白的降解情况

利用 SDS-PAGE 对南极磷虾肉在反复冻融循环中肌原纤维蛋白的降解情况进行分析。如图 4 所示,南极磷虾肉的肌原纤维蛋白由肌球蛋白重链(约 180 ku)、肌动蛋白(约 45 ku)、肌钙蛋白 T(约 34 ku)和肌球蛋白轻链(约 17 ku)组成。

一般情况下,蛋白质冷冻变性的主要形式是蛋白聚集或降解^[27]。如图 4 所示,南极磷虾肉肌原纤维蛋白中的肌球蛋白重链条带强度较弱,之前也有类似的研究报道^[28],并且该条带仅经过 1 次反复冻融后就完全消失,这可能是由于温度波动

使肌球蛋白重链发生了降解。肌球蛋白重链是虾肌肉中对温度变化最敏感的蛋白质,比肌动蛋白更敏感。当肌球蛋白重链完全降解后,肌动蛋白和其他蛋白可能会随之发生变性或降解^[11]。因此,我们可以观察到,经过 1 次反复冻融后,肌球蛋白重链完全降解后,肌动蛋白开始发生降解,并且随着反复冻融次数的增加,降解程度也逐渐增加。另外,肌钙蛋白 T 和肌球蛋白轻链也有少量的降解。这些蛋白的降解可能都是由于在反复冻融过程中冰晶对蛋白质造成了破坏,使蛋白质发生变性或降解。

2.6 南极磷虾肉在反复冻融循环中脂质氧化情况

本研究用硫代巴比妥酸值(TBA)分析南极磷虾肉在反复冻融循环中脂质氧化情况。如图 5 所

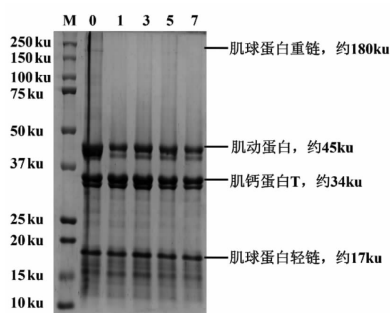
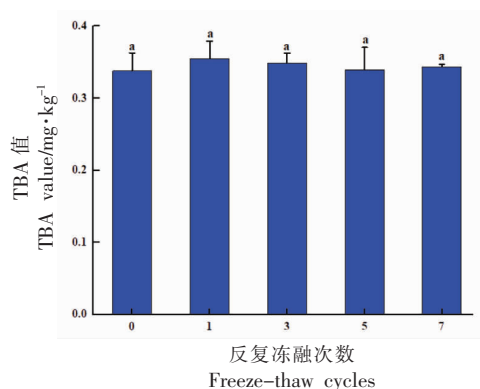


图 4 SDS-PAGE 观察南极磷虾肉经反复冻融后肌原纤维蛋白的变化

Fig.4 SDS-PAGE results of changes of myofibrillar protein after multiple freeze-thaw cycles of Antarctic krill meat



注:小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

图 5 南极磷虾经反复冻融后 TBA 值的变化
Fig.5 Changes in TBA value of Antarctic krill after multiple freeze-thaw cycles

示,南极磷虾肉经过7次反复冻融后TBA值变化不显著,说明反复冻融对南极磷虾肉的脂质氧化影响不大。这可能是因为南极磷虾肉中仅含有1.1%的脂质^[29],短暂的冻融对脂质氧化不显著。郭慧等^[30]发现南极磷虾肉在长期的冻藏过程中,TBA值变化也不显著。

3 结论

南极磷虾肉经反复冻融后,由于冰晶生长使其肌原纤维排列由整齐紧密变为杂乱疏松,甚至发生断裂,肌原纤维蛋白发生降解,其中肌球蛋白重链完全降解,肌动蛋白、肌钙蛋白T和肌球蛋白轻链均有不同程度的降解。疏松的肌原纤维结构使南极磷虾肉的持水能力下降以及水分分布发生改变,表现为解冻汁液损失率和离心损失率增加以及不易流动水向自由水方向迁移,不易流动水含量减少,自由水含量增加,且解冻汁液损失率与这两种水分的横向弛豫参数有极显著的相关性。然而,反复冻融对南极磷虾肉脂质氧化的影响不显著。综上,反复冻融循环主要是通过改变南极磷虾肉肌原纤维和肌原纤维蛋白结构以及水分分布来影响其品质变化的。

参 考 文 献

[1] 左青,左晖. 南极磷虾开发现状和展望[J]. 粮食与食品工业, 2019, 26(4): 13-16.
ZUO Q, ZUO H. Outlook and present antarctic krill development[J]. Cereal & Food Industry, 2019, 26(4): 13-16.

[2] 刘志东,王鲁民,陈雪忠,等. 南极磷虾蛋白的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(7): 242-251.
LIU Z D, WANG L M, CHEN X Z, et al. Research progress on the protein derived from Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana) [J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(7): 242-251.

[3] 吴伟平,谢营樑. 南极磷虾及磷虾渔业[J]. 现代渔业信息, 2010, 25(1): 10-13.
WU W P, XIE Y L. Antarctic krill and krill fishery [J]. Modern Fisheries Information, 2010, 25(1): 10-13.

[4] 陈京美. 南极磷虾贮藏过程中功能脂质的品质变化

及机理研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2017.

CHEN J M. Quality changes and mechanisms of functional lipids in antarctic krill during storage[D]. Qingdao: Qingdao University, 2017.

- [5] NIAN L Y, CAO A L, CAI L Y. Investigation of the antifreeze mechanism and effect on quality characteristics of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) during F-T cycles by hAFP[J]. Food Chemistry, 2020, 523(30): 126918.
- [6] CHENG S S, WANG X H, LI R R, et al. Influence of multiple freeze-thaw cycles on quality characteristics of beef semimembranous muscle: With emphasis on water status and distribution by LF-NMR and MRI[J]. Meat Science, 2019, 147: 44-52.
- [7] WACHIRASIRI K, WANLAPA S, UTTAPAP D, et al. Effects of multiple freeze-thaw cycles on biochemical and physical quality changes of white shrimp (*Penaeus vannamei*) treated with lysine and sodium bicarbonate[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(7): 1784-1790.
- [8] CAO M J, WANG J, CAO A L, et al. The impact of recrystallisation on the freeze-thaw cycles of red seabream (*Pagrus major*) fillets [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2019, 54(5): 1642-1650.
- [9] LAN W Q, HU X Y, SUN X H, et al. Effect of the number of freeze-thaw cycles number on the quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): An emphasis on moisture migration and microstructure by LF-NMR and SEM[J]. Aquaculture and Fisheries, 2020, 5(4): 193-200.
- [10] 林竹一. 基于低场核磁共振技术对保水剂影响马鲛鱼鱼糜品质机制的研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2018.
LIN Z Y. Influence of water retaining agent on the quality mechanism of *Sceniberomorus nipponius surirai* based on low-field nuclear magnetic resonance technique[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2018.
- [11] ZHANG B, CAO H J, WEI W Y, et al. Influence of temperature fluctuations on growth and recrystallization of ice crystals in frozen peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) pre-soaked with carrageenan oligosaccharide and xylooligosaccharide[J]. Food Chemistry, 2020, 306(15): 125641.

- [12] 柳佳彤. 冻藏罗氏沼虾品质劣变现象及其机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
LIU J T. Study on quality deterioration phenomenon and its mechanism of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) during frozen storage [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [13] JOHN L, CORNFORTH D, CARPENTER C E, et al. Color and thiobarbituric acid values of cooked top sirloin steaks packaged in modified atmospheres of 80% oxygen, or 0.4% carbon monoxide, or vacuum[J]. *Meat Science*, 2005, 69(3): 441-449.
- [14] DU X, CHANG P, TIAN J Y, et al. Effect of ice structuring protein on the quality, thermal stability and oxidation of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by freeze-thaw cycles[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 124: 109140.
- [15] DALVI-ISFAHAN M, HAMDAMI N, LE-BAIL A. Effect of freezing under electrostatic field on the quality of lamb meat[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2016, 37(Part A): 68-73.
- [16] LEYGONIE C, BRITZ T J, HOFFMAN L C. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review[J]. *Meat Science*, 2012, 91(2): 93-98.
- [17] 李玫, 李苗云, 赵改名, 等. 冻融循环下鸡肉品质变化的低场核磁共振研究 [J]. *食品科学*, 2013, 34(11): 58-61.
LI M, LI M Y, ZHAO G M, et al. Changes in quality indexes of chicken breast determined by LF-NMR during freezing-thawing cycles[J]. *Food Science*, 2013, 34(11): 58-61.
- [18] 王偲琦, 黄琳琳, 臧秀, 等. 低场核磁共振无损检测技术在水产品加工贮藏方面的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(8): 1725-1729.
WANG S Q, HUANG L L, ZANG X, et al. Application of low field nuclear magnetic technology in aquatic products processing and storage[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2018, 9(8): 1725-1729.
- [19] WANG B, LI F F, PAN N, et al. Effect of ice structuring protein on the quality of quick-frozen patties subjected to multiple freeze-thaw cycles[J]. *Meat Science*, 2021, 172: 108335.
- [20] ALI S, ZHANG W G, RAJPUT N, et al. Effect of multiple freeze-thaw cycles on the quality of chicken breast meat[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 808-814.
- [21] SÁNCHEZ-VALENCIA J, SÁNCHEZ-ALONSO I, MARTINEZ I, et al. Low-field nuclear magnetic resonance of proton (^1H LF NMR) relaxometry for monitoring the time and temperature history of frozen hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2015, 8(10): 2137-2145.
- [22] MA L K, ZHANG B, DENG S G, et al. Comparison of the cryoprotective effects of trehalose, alginate, and its oligosaccharides on peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during frozen storage[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(3): C540-6.
- [23] JIANG Q Q, NAKAZAWA N, HU Y Q, et al. Changes in quality properties and tissue histology of lightly salted tuna meat subjected to multiple freeze-thaw cycles[J]. *Food Chemistry*, 2019, 293: 178-186.
- [24] PIENIAZEK F, MESSINA V. Scanning electron microscopy combined with image processing technique: Analysis of microstructure, texture and tenderness in Semitendinosus and Gluteus Medius bovine muscles[J]. *Scanning*, 2016, 38(6): 727-734.
- [25] ZHANG B, DENG S G, GAO M, et al. Effect of slurry ice on the functional properties of proteins related to quality loss during skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) chilled storage[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(4): C695-702.
- [26] JOMMARK N, RUNGLERDKRIANGKRAI J, KONNO K, et al. Effect of cryoprotectants on suppression of protein structure deterioration induced by freeze-thaw cycle in pacific white shrimp[J]. *Taylor & Francis*, 2017, 27(1): 91-106.
- [27] 沈春蕾. 冻藏南美白对虾虾肉糜品质变化及保障技术研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
SHEN C L. Study on quality change and guarantee technology of frozen preserved shrimp surimi of *Penaeus vannamei*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019.
- [28] 徐蓓蓓, 胡玲萍, 姜晓明, 等. 冷冻南极磷虾(*Euphausia superba*)肌肉的理化性质及蛋白的加工特性[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(21): 56-64.
XU B B, HU L P, JIANG X M, et al. Physicochemical properties and processing characteristics of Antarctic krill (*Euphausia superba*) muscle[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(21): 56-64.
- [29] JIANG Q X, LI S J, XU Y S, et al. Nutrient

- compositions and properties of Antarctic krill (*Euphausia superba*) muscle and processing by-products [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2016, 25(3): 434–443.
- [30] 郭慧, 齐祥明. 冻藏过程中南极磷虾蛋白理化特性和品质的变化[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(23):

293–299.

GUO H, QI X M. Physicochemical properties and quality changes of antarctic krill during frozen storage process[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(23): 293–299.

Moisture Migration and Microstructure Changes of Antarctic Krill Meat during Multiple Freeze–thaw Cycles

Diao Huayu¹, Lin Songyi^{1,2,3}, Liang Rui¹, Liu Yao¹, He Xueqing¹, Sun Na^{1,2,3*}

¹*School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning*

²*National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, Liaoning*

³*Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian 116034, Liaoning*

Abstract Moisture migration of Antarctic krill meat during multiple freeze–thaw cycles was analyzed using low–field nuclear magnetic resonance (LF–NMR) and magnetic resonance imaging (MRI) techniques, combining with the results of the loss rate of thawed juice and centrifugal loss rate. The structure and protein changes of myofibrils after multiple freeze–thaw cycles were observed by electron microscopy, optical microscopy and SDS–PAGE, and the lipid oxidation was determined by thiobarbituric acid (TBA) value. The results showed that thawing loss rate and centrifugal loss rate of Antarctic krill meat significantly increased ($P<0.05$) and the brightness of the MRI hydrogen proton–weighted pseudo–color map gradually decreased with increase of freeze–thaw cycles times, indicating that the moisture content of Antarctic krill meat gradually decreased. As seen from LF–NMR results, there was no significant change in the content of strongly bound water and bound water ($P>0.05$), the content of immobile water significantly reduced ($P<0.05$), and the content of free water significantly increased ($P<0.05$), indicating the immobile water in Antarctic krill meat was easily converted to free water during freeze–thaw cycles. According to the correlation results, the NMR parameters of immobile water and free water had a very significant correlation with the thawing rate ($P<0.01$) after multiple freeze–thaw cycles. Due to the growth of ice crystals, the myofibril arrangement of Antarctic krill meat changed from neat and compact to disorder, and even broken. Further, SDS–PAGE results showed that the myosin heavy chain was completely degraded, and that the actin, troponin T and myosin light chain were degraded to varying degrees. Nevertheless, the TBA value did not change significantly ($P>0.05$). The above results showed that multiple freeze–thaw cycles could cause moisture migration and protein degradation of Antarctic krill meat, but the effect on lipid oxidation is not significant.

Keywords Antarctic krill meat; freeze–thaw cycles; moisture migration; microstructure; protein degradation