冷藏过程中三疣梭子蟹的营养物质变化

裴　峰[1,2]，母昌考[1]，王春琳[1]，李荣华[1]，叶央芳[1,2,*]
（1.宁波大学 应用海洋生物学教育部重点实验室，浙江 宁波　315211；
2.浙江海洋高效健康养殖协同创新中心，浙江 宁波　315211）

摘　要：为了解冷藏条件下三疣梭子蟹的营养物质变化规律，采用基于核磁共振（nuclear magnetic resonance，NMR）的代谢组学技术对冷藏过程中的梭子蟹肌肉和肝胰腺的营养物质进行分析。结果表明，NMR技术共检测到梭子蟹肌肉中的30 种物质和肝胰腺中的27 种物质。鲜活梭子蟹在4 ℃海水中冷藏保存，肌肉的营养物质变化主要发生在前2 d，而肝胰腺的营养物质变化主要发生在第1天。冷藏可导致肌肉谷氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、牛磺酸和三磷酸腺苷水平的显著降低，乳酸、三甲胺-*N*-氧化物、肌苷、肌苷酸和单磷酸腺苷水平的显著升高；同时导致肝胰腺中多种氨基酸、甜菜碱、牛磺酸、葡萄糖、三甲胺-*N*-氧化物、胆碱-*O*-硫酸和2-吡啶甲醇等水平的显著降低，而乳酸水平显著升高。这些物质的变化显著改变了梭子蟹的口味和营养价值。

关键词：三疣梭子蟹；冷藏；营养物质；核磁共振；代谢组学

Changes in Nutrients of *Portunus trituberculatus* during Chilled Storage

PEI Feng[1,2], MU Changkao[1], WANG Chunlin[1], LI Ronghua[1], YE Yangfang[1,2,*]
(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo　315211, China;
2. Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-Efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo　315211, China)

Abstract: The changes of nutrients of the muscle and hepatopancreas of *Portunus trituberculatus* during chilled storage were analyzed using nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolomics. The results showed that a total of 30 nutrients were detected in swimming crab muscle and 27 nutrients in hepatopancreas. The levels of muscle nutrients changed mainly during the first two days of chilled storage; glutamate, glutamine, arginine, taurine, and ATP significantly increased while lactic acid, trimethylamine-*N*-oxide, inosine, inosine monophosphate, and adenosine monophosphate significantly decreased. The levels of hepatopancreas nutrients mainly changed during the first day of storage; the levels of the hepatopancreas amino acids, betaine, taurine, glucose, trimethylamine-*N*-oxide, choline-*O*-sulfate, and 2-pyridinemethanol significantly decrease while lactic acid significantly increased. As a result of these changes the taste and nutritional value of swimming crabs changed significantly.

Keywords: *Portunus trituberculatus*; chilled storage; nutrients; nuclear magnetic resonance (NMR); metabolomics
DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816037
中图分类号：S963　　文献标志码：A　　文章编号：1002-6630（2018）16-0256-09
引文格式：
裴峰, 母昌考, 王春琳, 等. 冷藏过程中三疣梭子蟹的营养物质变化[J]. 食品科学, 2018, 39(16): 256-264. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816037.　http://www.spkx.net.cn
PEI Feng, MU Changkao, WANG Chunlin, et al. Changes in nutrients of *Portunus trituberculatus* during chilled storage[J]. Food Science, 2018, 39(16): 256-264. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816037.　http://www.spkx.net.cn

作为我国重要的海洋经济动物，三疣梭子蟹（*Portunus trituberculatus*）在2015年的海水养殖产量已达到12万 t左右[1-2]。梭子蟹被捕获后常被直接放入冰水中，然后曝气培养在人工海水中用于销售。大部分梭子蟹被消费者购买后很快被食用，然而仍有部分梭子蟹被置于冷藏条件下短暂保存。这些被冰水刺激过的梭子蟹极易死亡，它们首先在冷藏条件下进入低温麻醉，继而快速死亡。死亡后的梭子蟹在酶和微生物

收稿日期：2017-07-10
基金项目：宁波市科技富民项目（2016C10062；2016C10037）；宁波大学王宽诚幸福基金资助项目
第一作者简介：裴峰（1992—），男，硕士研究生，研究方向为水产养殖。E-mail：740067559@qq.com
*通信作者简介：叶央芳（1974—），女，研究员，博士，研究方向为水产养殖。E-mail：yeyangfang@nbu.edu.cn

的作用下，其风味和品质开始下降，进而腐败变质。现有研究表明，梭子蟹在冷藏条件下肌肉三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）的含量持续下降，二磷酸腺苷（adenosine diphosphate，ADP）、单磷酸腺苷（adenosine monophosphate，AMP）、肌苷酸（inosine monphosphate，IMP）和次黄嘌呤核苷的含量呈先上升后下降的趋势，而次黄嘌呤和黄嘌呤的含量呈持续上升[3]。这些物质的变化改变了梭子蟹的鲜度和品质。然而，梭子蟹肌肉是一个复杂的混合物，除了这些核苷酸和核苷类物质外，还有多种有机物如氨基酸、有机酸和糖类等决定着梭子蟹肌肉的质量。如谷氨酸、甘氨酸和甜菜碱等是梭子蟹肌肉鲜味和甜味的主要贡献者[4]。此外，梭子蟹的肝胰腺也是人们喜食的重要组织，因此，全面分析梭子蟹肌肉和肝胰腺中的营养物质在冷藏过程中的动态变化，可对梭子蟹在冷藏过程中的质量变化作出准确评价。

基于核磁共振（nuclear magnetic resonance，NMR）的代谢组学方法是借助NMR波谱技术对所有低分子质量代谢物进行定性和定量分析的一种技术[5]。相比于传统的食品分析方法，它可以同时检测成百上千种有机化合物单体[6]，从有机分子水平更精确地解析食品的组分，从而达到系统和客观地评价食品质量的目的。在食品科学领域，该手段被广泛应用于食品组分分析[7-8]、食品质量鉴别[9-10]、食品质量控制[11-12]、食品贮存和加工[13-14]等方面。特别值得一提的是，该技术也已成功鉴别了不同级别的蟹糊[15]，并解析了蟹糊发酵过程中的营养物质变化[16]。因此，本研究采用基于NMR的代谢组学技术分析冷藏过程中梭子蟹营养物质的动态变化，为梭子蟹的贮藏和质量评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜活三疣梭子蟹购自宁海县一养殖场，置于冰水混合物中运回实验室。选取50 只雄性梭子蟹，每只梭子蟹的体质量为（130±20）g。

甲醇、二水合磷酸二氢钠、三水合磷酸氢二钾（均为色谱纯） 上海国药集团化学试剂有限公司；2,2,3,3-氘代三甲基硅烷丙酸钠（sodium 3-trimethylsilyl [2,2,3,3-2D4] propionate，TSP）、重水（99.9%氘代）（均为色谱纯） 美国Sigma-Aldrich公司。

用50%重水溶液配制0.15 mol/L磷酸缓冲液（pH 7.4），内含0.001% TSP[17]。配制甲醇溶液（甲醇-水2∶1，*V*/*V*）作为组织胞内物质的提取液。

1.2 仪器与设备

Avance III 600 MHz NMR仪（配有超低温探头） 德国Bruker Biospin公司；TD-XBYM组织破碎仪 北京同德创业科技有限公司；5415R低温高速离心机 德国Eppendorf公司；2.5 L冷冻干燥机 美国Labconco公司。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

把50 只梭子蟹随机分成5 组，每组10 只，置于（4±1）℃海水中保存。分别于0、1、2、3 d和4 d的下午18:00取样。采集每个梭子蟹的游泳足肌肉和肝胰腺各约500 mg，用液氮速冻后置于－80 ℃保存备用。

1.3.2 营养物质分析

1.3.2.1 营养物质提取

为提取梭子蟹肌肉和肝胰腺组织中的胞内物质，把1 mL提取液加入到每个样品中，置于组织破碎仪中，设置破碎频率为20 Hz，破碎时间为90 s。所得提取物在4 ℃、12 000 r/min离心10 min，以获得上清液。残渣再用1 mL甲醇溶液提取液提取1 次。合并2 次提取所得的上清液，置于真空条件下挥发上清液中的甲醇，再进一步冷冻干燥。在冷冻干燥粉中加入600 μL磷酸缓冲液，在4 ℃、12 000 r/min离心10 min，把500 μL上清液移入直径为5 mm的核磁管中，以用于核磁分析。

1.3.2.2 梭子蟹肌肉和肝胰腺提取物的NMR分析

在298 K条件下采集样品的^{1}H NMR谱，所用的脉冲序列是标准的NOESYGPPR1D：RD-90°-t_1-90°-t_m-90°-ACQ，对应的质子共振频率为600.13 MHz。为抑制水峰，设置等待时间为2 s，混合时间为100 ms，并施加强度约50 Hz的低功率连续波。对于每个^{1}H NMR谱，均设置90°脉冲宽度约10 μs，谱宽为δ 20，采样点数为32 K，自由感应信号累加次数为64 次。把采集到的^{1}H NMR谱的自由感应信号先乘以增宽因子为0.5 Hz的指数窗函数，再进行傅里叶变换，根据内标物TSP（δ 0.0）的化学位移，手动定标^{1}H NMR谱，并作相位和基线校正。分别选择一个具有肌肉和肝胰腺提取物典型^{1}H NMR谱的样品用于二维NMR谱采集，采集的二维NMR谱包括同核COSY和TOCSY谱，异核HSQC和HMBC谱。二维谱的实验参数设置可参考娄永江等[18]。

1.3.2.3 NMR数据的多变量统计分析

为了对肌肉和肝胰腺样品的^{1}H NMR谱进行分段积分，选取谱区间为δ 9.7～0.8，去除δ 5.0～4.75和δ 3.38～3.35的信号区间以消除水和甲醇的干扰，设置积分区间为2.4 Hz。对积分数据进行重量归一化处理以消除样品之间的质量差异。把归一化的NMR数据导入SIMCA-P$^+$软件（V11.0，瑞典Umetrics公司），选择标准化的数据处理模式对NMR数据作主成分分析（principal component analysis，PCA），PCA结果不仅可提供样本的聚类情况，还可检测离群样本点。然后对NMR数据作正交偏最小二乘法判别分析（orthogonal projection to latent structure discriminant analysis，OPLS-DA），在OPLS-DA中，设置自动规格化的数据处理模式，并以NMR数据为*X*变量，以分组信息为*Y*变量。为验证OPLS-DA模型的可靠性，采用9 倍交叉验证的方法，如果验证所得的Q^2值越高说明模型的质量越高。此外，还采用交叉验证的方

差分析方法进一步验证OPLS-DA模型的可靠性，如果所得P值小于0.05，则证明OPLS-DA模型是可靠的[19]。为获得导致组间区分的物质，先对自动规格化的NMR数据作回溯转换[20]，再借助MATLAB软件制作OPLS-DA模型相对应的相关系数图。相关系数图上每个点具有不同的颜色，该颜色代表X变量（即回溯转换处理后的NMR数据）和Y变量（即分组信息）之间的皮尔森积差相关系数（r）值。由于本研究设置样本的重复数n为10，因此，只有当某一营养物质的$|r|$大于0.602时，才判定该物质对组间区分具有显著意义（P＜0.05）。

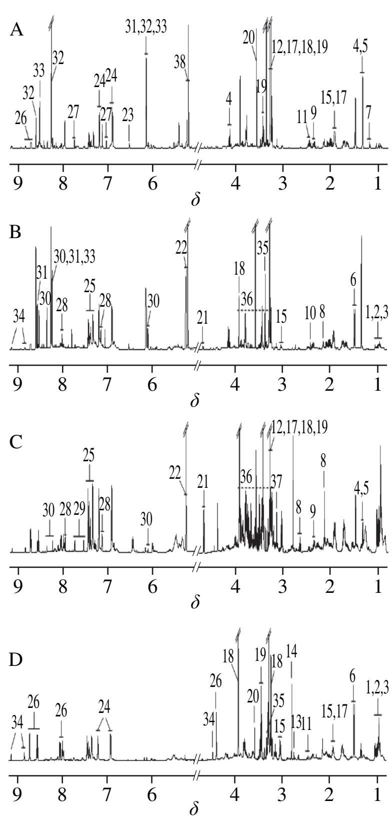
为获得冷藏后梭子蟹肌肉中核苷酸和核苷类物质含量的相对变化，本实验计算了这些物质相对于冷藏第0天的相对变化率，计算公式如下：

$$相对变化率/\% = \frac{C_i - C_0}{C_0} \times 100$$

式中：C_i和C_0分别表示在冷藏后某一天和冷藏第0天时的营养物质相对浓度。

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹肌肉和肝胰腺的营养物质组成



A. 0 d肌肉；B. 1 d肌肉；C. 0 d肝胰腺；D. 1 d肝胰腺。数字代表的代谢产物见表1。肌肉和肝胰腺组织中δ 9.2～5.0的信号强度分别比δ 4.7～0.8垂直放大了32 倍和16 倍。

图1 三疣梭子蟹肌肉和肝胰腺提取物的典型600 MHz ^{1}H NMR谱

Fig. 1 Typical 600 MHz ^{1}H NMR spectra of muscle and hepatopancreas extracts of *P. trituberculatus*

表1 三疣梭子蟹肌肉和肝胰腺营养物质的NMR数据

Table 1 NMR data of nutrients detected in the muscle and hepatopancreas of *P. trituberculatus*

编号	营养物质	基团	δ ^{1}H和多重性	δ ^{13}C	组织
1	异亮氨酸	βCH、γCH_2、$\gamma' CH_3$、δCH_3	1.98（m）、1.24（m）、1.45（m）、1.01（d）、0.94（t）	38.9、27.2、17.7、14.1	M、H
2	亮氨酸	αCH、βCH_2、γCH、δCH_3、$\delta' CH_3$	3.71、1.71（m）、1.66（m）、0.98（d）、0.96（d）	62.4、42.7、27.0、24.7、23.8	M、H
3	缬氨酸	αCH、βCH、γCH_3、COOH	3.62（d）、2.27（m）、0.99（d）、1.04（d）	63.2、31.9、19.7、20.9	M、H
4	乳酸	αCH、βCH_3、COOH	4.13（q）、1.33（d）	71.2、23.1、185.3	M、H
5	丝氨酸	αCH、βCH、γCH_3	3.60（d）、4.29（m）、1.33（d）	68.7、63.3、23.0	M、H
6	丙氨酸	αCH、βCH_3、COOH	3.79（q）、1.49（d）	53.3、19.3、178.7	M、H
7	乙醇	αCH_2、βCH_3	1.19（t）、3.67	19.4、60.5	M
8	蛋氨酸	αCH、βCH_2、γCH_2、S—CH_3	3.86（dd）、2.17（m）、2.65（t）、2.14（s）	56.8、32.7、31.5、16.9	M、H
9	谷氨酸	βCH_2、γCH_2、δCOOH	2.02（m）、2.08（m）、2.36（dt）	57.8、29.8、36.5、184.3	M、H
10	琥珀酸	CH_2	2.41（s）	37.1	M
11	谷氨酰胺	αCH、βCH_2、γCH_2	3.77（t）、2.14（m）、2.46（m）	29.7、33.8	M、H
12	三甲基-*N*-氧化物	CH_3	3.27（s）	62.3	M、H
13	肌氨酸	CH_2、N—CH_3、COOH	3.61（s）、2.74（s）	53.8、35.7、175.2	H
14	琥珀酸亚胺	CH_2	2.79（s）	41.9	H
15	赖氨酸	βCH_2、γCH_2、δCH_2、εCH_2	1.91（m）、1.48（d）、1.73（m）、3.03（t）	29.5、42.2	M、H
16	磷酸胆碱	N（CH_3）$_3$、N—CH_2、O—CH_2	3.23（s）、3.58（t）、4.26（m）	56.8、68.8、57.6	H
17	精氨酸	εC、αCH、βCH_2、γCH_2、δCH_2	3.78（t）、1.92（m）、1.70（m）、3.25（t）	160.0、57.3、31.6、28.6、43.4	M、H
18	甜菜碱	CH_3、CH_2、COO^-	3.27（s）、3.91（s）	56.2、69.1、172.1	M、H
19	牛磺酸	CH_2SO_3、CH_2NH_2	3.27（t）、3.43（t）	50.7、38.5	M、H
20	甘氨酸	αCH_2、COOH	3.57（s）	44.6、175.4	M、H
21	*β*-葡萄糖	C_1H、C_2H、C_3H	4.67（d）、3.25（dd）、3.48（m）	98.9、77.2、78.9	M、H
22	*α*-葡萄糖	C_1H、C_2H、C_3H	5.24（d）、3.54（dd）、3.72（m）	95.1、74.9、75.6	M、H
23	延胡索酸	CH、COOH	6.53（s）	138.2、178.0	M
24	酪氨酸	αCH、βCH_2、Ring $C_{2,6}H$、Ring $C_{3,5}H$、Ring C_4、COOH	3.95（dd）、3.20（dd）、3.06（dd）、7.20（d）、6.90（d）	59.4、38.5、133.6、118.8、157.5、177.1	M、H
25	苯丙氨酸	βCH_2、Ring $C_{2,6}H$、Ring $C_{3,5}H$、Ring C_4、Ring C_1	3.13（dd）、3.29（dd）、7.33（q）、7.43（t）、7.38（m）	39.3、132.6、132.4、131.3、137.9	M、H
26	2-吡啶甲醇	C_2、C_3H、C_4H、C_5H、C_6H、C_7H	8.72（dd）、7.98（td）、8.55（td）、8.04（dd）、4.38（s）	154.7、148.4、130.0、149.3、128.8、49.5	M、H
27	组胺	C_2H、C_3、C_4H	7.75（d）、7.04（d）	141.1、136.1、122.6	M
28	组氨酸	C_1H、C_2H、C_3	7.88（d）、7.10（d）	139.1、120.1、134.1	M、H
29	色氨酸	Ring C_2H、Ring C_3、Ring C_4H、Ring C_5H、Ring C_6H、Ring C_7H、Ring C_8、Ring C_9	7.34（s）、7.55（d）、7.28（m）、7.20（m）、7.74（d）	128.3、110.0、115.1、125.1、122.3、121.6、129.5、139.5	H
30	肌苷	C_1H、C_2、C_3、C_4H、C_5、$C_{1'}H$、$C_{2'}H$	8.34（s）、8.23（s）、6.10（d）、4.77、4.44（dd）、4.28（dd）	143.0、127.2、161.8、149.1、151.5、91.2、77.1	M、H
31	IMP	C_2H、C_4、C_8H、$C_{1'}H$、$C_{3'}H$、$C_{4'}H$、$C_{5'}H$、$C_{6'}H$	8.24（s）、8.58（s）、6.15（d）、4.78、4.51（m）、4.37（m）、4.02（m）	142.6、151.7、149.0、89.9、77.4、73.3、87.4、66.2	M
32	AMP	C_2H、C_4、C_8H、$C_{1'}H$、$C_{3'}H$、$C_{4'}H$、$C_{5'}H$、$C_{6'}H$	8.26（s）、8.61（s）、6.14（d）、4.77、4.51（m）、4.37（m）、4.02（m）	155.5、151.7、142.8、89.6、77.3、73.5、87.0、66.3	M

续表1

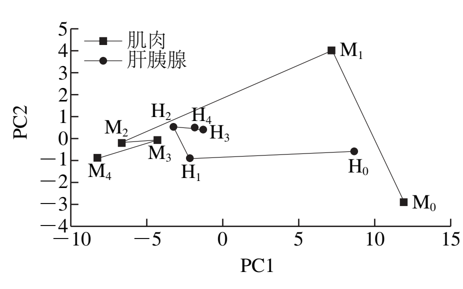
编号	营养物质	基团	δ ¹H和多重性	δ ¹³C	组织
33	ATP	C_2H、C_4、C_8H、$C_{1'}H$、$C_{3'}H$、$C_{4'}H$	8.24（s）、8.53（s）、6.13（d）、4.80、4.51（m）、4.39（m）	155.3、151.7、142.5、89.3、77.0、73.0、86.6	M
34	葫芦巴碱	C_2H、C_3、C_4H、C_5H、C_6H	9.13（s）、8.84（m）、8.1（m）、8.85（m）、4.44（s）	148.2、139.2、147.3、130.3、148.5、51.2	M、H
35	残留的甲醇	CH_3	3.37（s）	52.0	M、H
36	糖和氨基酸	αCH resonances	3.25～4.00		M、H
37	胆碱-*O*-硫化物	αCH_2、βCH_2、N—CH_3	4.33、3.68、3.14（s）	68.9、55.7	H
38	海藻糖	C_1H、C_2H、C_3H	5.20（d）、3.64、3.86	95.8、75.3	M

注：多重性：s.单峰；d.双峰；t.三重峰；q.四重峰；dd.双重二重峰；m.多重峰；dt.二重三重峰；td.三重二重峰；组织：M.肌肉；H.肝胰腺。

依照梭子蟹肌肉样品二维NMR谱提供的氢碳信息，并参考文献[21-22]的物质归属信息，确定梭子蟹肌肉中含有30 种小分子有机化合物，包括14 种氨基酸（3 种支链氨基酸、丝氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、甘氨酸、组氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸）、4 种有机羧酸（牛磺酸、乳酸、琥珀酸和延胡索酸）、4 种核苷和核苷酸类物质（肌苷、IMP、AMP和ATP）、2 种醇类（乙醇和2-吡啶甲醇）、2 种碱类（甜菜碱和葫芦巴碱）、2 种糖类（葡萄糖和海藻糖）以及三甲基-*N*-氧化物（trimethylamine *N*-oxide，TMAO）和组胺，如图1、表1所示。同样，发现核磁共振方法可检测到梭子蟹肝胰腺中的27 种小分子有机化合物。与肌肉相比，肝胰腺中未测到乙醇、琥珀酸、延胡索酸、组胺、IMP、AMP、ATP和海藻糖，但含有肌氨酸、色氨酸、琥珀酸亚胺、磷酸胆碱、胆碱-*O*-硫化物（图1、表1）。这些物质组成的差异，可能与组织本身的结构和功能相关。

此外，比较肌肉和肝胰腺冷藏前后的核磁谱可以发现，冷藏对这2 种组织的代谢谱产生了显著影响。如冷藏1 d导致了肌肉和肝胰腺物质组成的变化（图1），肌肉中ATP的信号在冷藏后快速消失，取而代之于IMP、AMP和肌苷信号的增强；而更明显的信号变化发生在肝胰腺的核磁谱中，大量的来自葡萄糖、蛋氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等物质的信号明显减弱。

2.2　冷藏对梭子蟹营养物质组成的影响



M_0～M_4表示0～4 d的肌肉；H_0～H_4表示0～4 d的肝胰腺。图3、4同。

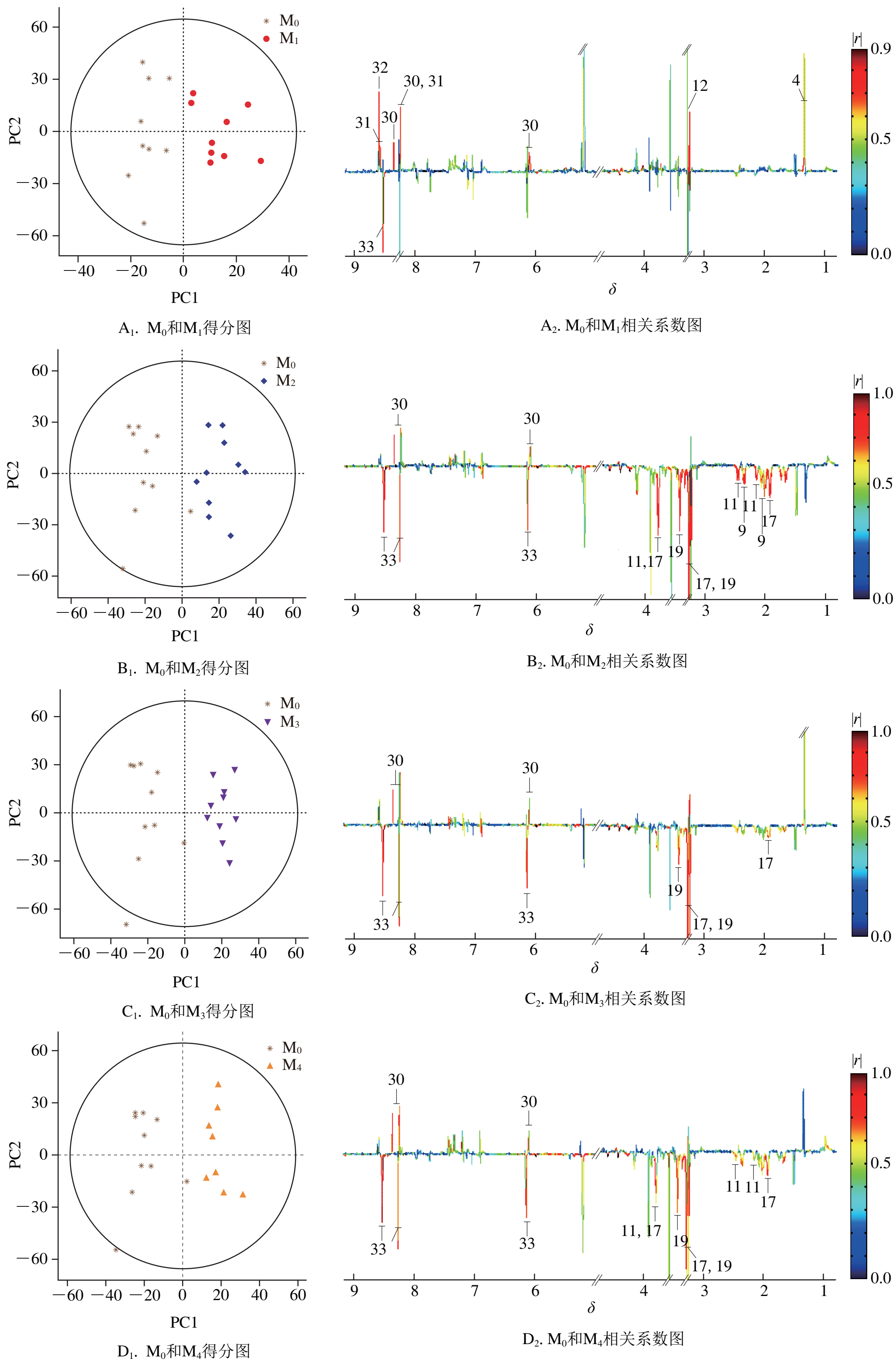
图 2　三疣梭子蟹肌肉和肝胰腺提取物的PCA轨迹图

Fig. 2　Trajectory derived from PCA of ¹H NMR spectra of the muscle and hepatopancreas extracts of *P. trituberculatus*

消费者食用雄性梭子蟹的主要部位是肌肉和肝胰腺，因此本实验以这2 个组织为研究对象，分析冷藏对梭子蟹营养物质组成的影响。为揭示肌肉和肝胰腺营养物组成的变化情况，首先对所有梭子蟹组织样品的NMR数据做PCA，把所得的PC1和PC2用于制作轨迹图，由图2可知，肌肉和肝胰腺样品随着冷藏时间的延长，在PC1和PC2上均产生了明显区分。肌肉的物质组成在冷藏前2 d变化显著，而且第2天的变化比第1天更为显著，而后2 d的变化较小。与肌肉相比，肝胰腺的物质组成变化主要发生在冷藏第1天，而后3 d的变化较小。

为进一步揭示梭子蟹组织中随冷藏过程显著变化的营养物质，对不同冷藏阶段肌肉和肝胰腺样品的NMR数据分别与冷藏前样品作两两比较的OPLS-DA。首先对建立的8 个模型进行可靠性验证，根据9 倍交叉验证和交叉验证的方差分析，这8 个OPLS-DA模型都是可靠的，如图3、4所示。根据肌肉的OPLS-DA相关系数图（图3），冷藏1 d可导致ATP水平的显著降低，而乳酸、TMAO、肌苷、IMP和AMP水平显著升高。冷藏2 d可导致谷氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、牛磺酸和ATP的显著降低，而肌苷水平显著升高。冷藏3 d可导致精氨酸、牛磺酸和ATP的显著降低，而肌苷水平显著升高。冷藏4 d可导致谷氨酰胺、精氨酸、牛磺酸和ATP的显著降低，而肌苷水平显著升高。上述与冷藏显著相关的肌肉营养物质的相关系数见表2。

鲜活的梭子蟹肌肉含有较高水平的ATP，在梭子蟹死亡后ATP快速水解成为ADP、AMP、IMP、肌苷和腺苷等，其中，AMP具有肉样的鲜味[23]，而IMP具有牛肉汤样的鲜味[24]，都是梭子蟹的重要呈味核苷酸[3]，是梭子蟹之所以味道鲜美的原因之一。本研究也发现，鲜活的梭子蟹肌肉含有较高水平的ATP，在冷藏1 d后，ATP即被分解了32.7%，2 d以后，ATP几乎被完全分解（图3、5）。而其代谢产物随之在肌肉中大量积累，如AMP含量在冷藏第1天就增加了283.5%，2 d之后其含量呈下降趋势，同时IMP含量也在冷藏第1天时达到最大值，随之显著降低。与这些核苷酸变化不同的是，肌苷水平在冷藏过程中快速升高，在冷藏第1天就升高到对照的277.3%，第2天达到对照的520.1%，第3天和第4天仍维持在对照的570%以上。肌苷赋予梭子蟹肌肉苦味[24]，因此，随着冷藏时间的延长，梭子蟹肌肉的鲜味降低，苦味上升。这些核苷酸和核苷类物质的变化趋势与宋雪等[3]研究结果类似（文献中的次黄嘌呤核苷与本研究中的肌苷为同一物质），只是在物质的浓度变化幅度和变化时间上存在



δ 9.2～5.0的信号强度已在δ 4.75～0.8基础上进行垂直放大。图4同。

图3 冷藏后三疣梭子蟹肌肉提取物的OPLS-DA得分图（A_1～D_1）和相关系数图（A_2～D_2）

Fig. 3 OPLS-DA scores plots (A_1–D_1) and corresponding color-coded correlation coefficient loadings plots (A_2–D_2) derived from NMR data for muscle extracts of swimming crab after chilled storage

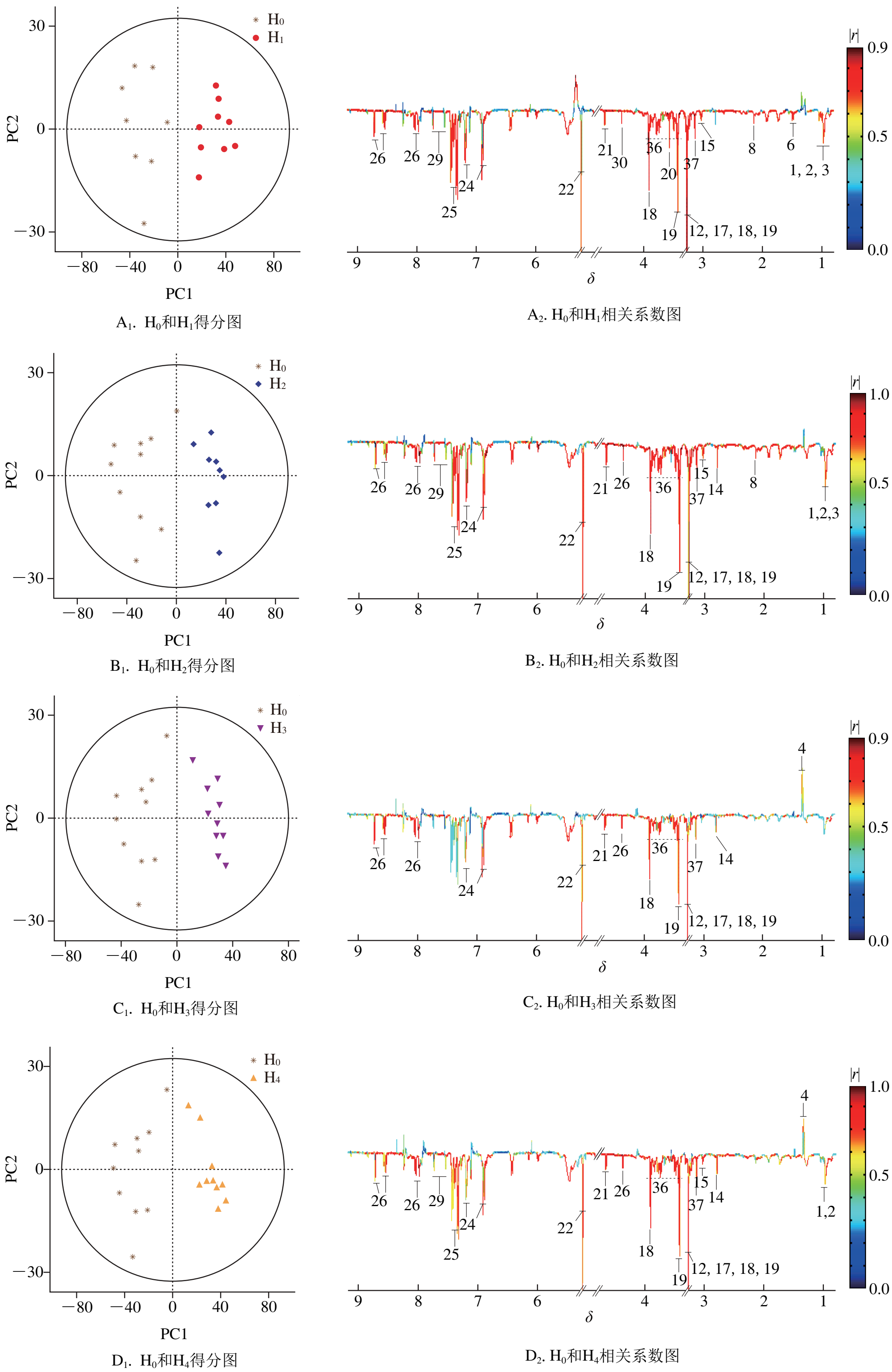


图 4 冷藏后三疣梭子蟹肝胰腺提取物的OPLS-DA得分图（A_1～D_1）和相关系数图（A_2～D_2）

Fig. 4 OPLS-DA scores plots (A_1–D_1) and corresponding color-coded correlation coefficient loadings plots (A_2–D_2) derived from NMR data for hepatopancreas extracts of swimming crab after chilled storage

差异，这可能与样品的处理方法和冷藏方式不同有关。然而，本研究并未检测到在冷藏初期含量较低的ATP其他水解产物如ADP、腺苷、次黄嘌呤和黄嘌呤，这可能与NMR谱仪相比于液相色谱仪较低的灵敏度所致[25]。

表 2　与冷藏相关的三疣梭子蟹肌肉和肝胰腺提取物中显著改变的营养物质的OPLS-DA相关系数

Table 2　OPLS-DA correlation coefficients for significant changes of nutrients in the muscle and hepatopancreas of *P. trituberculatus* associated with chilled storage

营养物质	相关系数（*r*）							
	肌肉				肝胰腺			
	1 d/0 d	2 d/0 d	3 d/0 d	4 d/0 d	1 d/0 d	2 d/0 d	3 d/0 d	4 d/0 d
异亮氨酸	—	—	—	—	−0.70	−0.70	—	−0.65
亮氨酸	—	—	—	—	−0.70	−0.69	—	−0.65
缬氨酸	—	—	—	—	−0.67	−0.64	—	—
丙氨酸	—	—	—	—	−0.75	—	—	—
蛋氨酸	—	—	—	—	−0.83	−0.78	—	—
谷氨酸	—	−0.78	—	—	—	—	—	—
谷氨酰胺	—	−0.78	—	−0.66	—	—	—	—
赖氨酸	—	—	—	—	−0.71	−0.72	—	−0.70
精氨酸	—	−0.95	—	−0.94	−0.80	−0.81	−0.80	−0.80
牛磺酸	—	−0.70	−0.79	−0.68	−0.75	−0.81	−0.70	−0.72
甘氨酸	—	—	—	—	−0.74	—	—	—
酪氨酸	—	—	—	—	−0.87	−0.86	−0.80	−0.78
苯丙氨酸	—	—	—	—	−0.72	−0.66	—	−0.71
色氨酸	—	—	—	—	−0.65	−0.69	—	−0.64
乳酸	0.78	—	—	—	—	—	0.68	0.78
葡萄糖	—	—	—	—	−0.82	−0.81	−0.83	−0.83
甜菜碱	—	—	—	—	−0.88	−0.92	−0.86	−0.87
肌苷	0.86	0.85	0.84	0.95	—	—	—	—
IMP	0.83	—	—	—	—	—	—	—
AMP	0.84	—	—	—	—	—	—	—
ATP	−0.83	−0.87	−0.89	−0.91	—	—	—	—
TMAO	0.92	−0.88	−0.84	−0.85	−0.94	−0.94	−0.89	−0.86
琥珀酰亚胺	—	—	—	—	—	−0.68	−0.67	−0.69
胆碱-*O*-硫酸	—	—	—	—	−0.93	−0.92	−0.85	−0.89
2-吡啶甲醇	—	—	—	—	−0.89	−0.90	−0.85	−0.89

注：相关系数正值和负值分别表示营养物质浓度变化的正相关和负相关；$|r|$=0.602作为组间比较时营养物质产生显著差异的分界值（P=0.05，自由度=9）；—.未检出或$|r|$小于0.602。

然而，基于NMR的代谢组学技术的优势在于其对被检测物质的无偏向性[25-26]，只要某有机物质的含量高于其检测限，均能被检测到。因此，本研究除了观察到上述核苷酸和核苷类物质，还观察到梭子蟹肌肉中乳酸、谷氨酸、精氨酸、牛磺酸和TMAO水平在冷藏过程中的显著波动。乳酸和谷氨酸可赋予梭子蟹肌肉柔和的酸味和强烈的鲜味，而精氨酸具有苦味[24]，这些物质的变化可能改变了梭子蟹原本的味道。而牛磺酸是有益于人体健康的活性物质[27]，该物质在冷藏过程中的持续减少，可能降低了梭子蟹肌肉的营养价值。此外，肌肉中的TMAO在梭子蟹冷藏第1天显著升高，TMAO是海洋生物中普遍存在的渗透调节物质[28]，在冷藏第1天，梭子蟹仍然存活，可能为了抵抗低温的胁迫，累积TMAO以维持肌肉细胞的渗透平衡。TMAO通常在梭子蟹死亡后被微生物或酶降解成为二甲胺或者三甲胺[29]，然而本研究并未检出这2 种胺类物质，可能低温保存抑制了微生物或酶的活性。三甲胺具有毒性[30]，经常被作为水产品新鲜度的指标[31]，因此，低温海水保存的梭子蟹尽管其营养价值和口味下降，但在实验期内（4 d）并未产生二甲胺或三甲胺等有害物质。

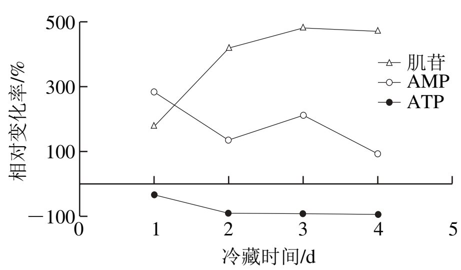


图 5　冷藏对三疣梭子蟹肌肉ATP、AMP和肌苷含量的影响

Fig. 5　Effects of chilled storage on the levels of ATP, AMP, and inosine in the muscle of *P. trituberculatus*

与肌肉类似，本研究也对肝胰腺进行了两两比较的OPLS-DA分析。由图4可知，冷藏1 d可导致包括11 种氨基酸水平的显著降低，同时伴随着甜菜碱、牛磺酸、葡萄糖、TMAO、胆碱-*O*-硫酸和2-吡啶甲醇水平的显著降低。冷藏2 d导致9 种氨基酸、甜菜碱、牛磺酸、葡萄糖、琥珀酸亚胺、TMAO、胆碱-*O*-硫酸和2-吡啶甲醇水平的显著降低。冷藏第3、4天仍导致精氨酸、酪氨酸、甜菜碱、牛磺酸、葡萄糖、琥珀酸亚胺、TMAO、胆碱-*O*-硫酸和2-吡啶甲醇水平的显著降低，而乳酸水平开始显著升高。另外，冷藏第4天还引起亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸和色氨酸水平的显著降低。上述与冷藏显著相关的肝胰腺营养物质的相关系数见表2。

与梭子蟹肌肉不同的是，肝胰腺在冷藏条件下的物质变化更为显著，表现在更多营养物质的流失，特别是氨基酸的流失。氨基酸不仅是人体必要的营养物质，而且是重要的呈味物质。如丙氨酸和甘氨酸具有甜味，3 种支链氨基酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸具有

苦味，而蛋氨酸可影响食品肉样的味道[24]。氨基酸含量的变化不仅影响梭子蟹的口感，更重要的是影响了梭子蟹的营养价值。同样，甜菜碱、牛磺酸和葡萄糖水平的显著下降不仅降低了肝胰腺的甜度，而且降低了肝胰腺的营养价值。此外，TMAO在肝胰腺中显著降低，但其代谢产物三甲胺并没有产生，从肝胰腺这一组织进一步说明梭子蟹在海水中冷藏4 d并未产生这些有害的胺类代谢物。与这些显著降低的代谢物相反，肝胰腺中的乳酸水平在冷藏后期发生了显著升高。在动物体内，乳酸由乳酸脱氢酶转化丙酮酸后产生，这个反应通常在缺氧条件下发生，因此乳酸水平的升高表明肝胰腺组织在冷藏后期呈缺氧状态，同时肝胰腺的口味开始呈现柔和的酸味。

3 结 论

本研究利用基于NMR的代谢组学技术，分析了冷藏对三疣梭子蟹肌肉和肝胰腺营养物质的影响。NMR技术共检测到肌肉中的30 种物质和肝胰腺中的27 种物质。鲜活梭子蟹在4 ℃海水中冷藏保存，肌肉的营养物质变化主要发生在前2 d，而肝胰腺的营养物质变化主要发生在第1天。肌肉中主要变化的物质是ATP及其水解产物以及乳酸、牛磺酸、TMAO、谷氨酸和谷氨酰胺。肝胰腺中主要变化的物质是一系列氨基酸、甜菜碱、牛磺酸、葡萄糖、琥珀酸亚胺、TMAO、胆碱-*O*-硫酸和2-吡啶甲醇等。这些物质的变化显著改变了梭子蟹的口味和营养价值，但4 d的海水冷藏仍然保证了梭子蟹的可食用性。本研究结果可为三疣梭子蟹的贮藏和质量评价提供参考。

参考文献：

[1] 高保全, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹4 个野生群体形态差异分析[J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 223-228. DOI:10.3321/j.issn:1005-8737.2007.02.007.

[2] 农业部渔业局. 中国渔业年鉴2016[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.

[3] 宋雪, 邱伟强, 陈舜胜, 等. 冷藏条件下蟹肉中ATP关联产物含量变化及其降解途径的探究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(12): 334-338; 360. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.12.055.

[4] 刘磊, 王春琳, 母昌考, 等. 野生、养殖和“科甬1号”群体三疣梭子蟹营养和风味品质比较分析[J]. 食品科学, 2017, 37(12): 334-338. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720009.

[5] NICHOLSON J K, LINDON J C. Systems biology: metabonomics[J]. Nature, 2008, 455: 1054-1056. DOI:10.1038/4551054a.

[6] WISHART D S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research[J]. Trends in Food Science & Technology, 2008, 19(9): 482-493. DOI:10.1016/j.tifs.2008.03.003.

[7] HU F, FURIHATA K, KATO Y, et al. Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(11): 4307-4311. DOI:10.1021/jf062803x.

[8] RODRIGUES J E A, ERNY G L, BARROS A S, et al. Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 674(2): 166-175. DOI:10.1016/j.aca.2010.06.029.

[9] GALL G L, PUAUD M, COLQUHOUN I J. Discrimination between orange juice and pulp wash by ^{1}H nuclear magnetic resonance spectroscopy: identification of marker compounds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(2): 580-588. DOI:10.1021/jf001046e.

[10] SANTUCCI C, BRIZZOLARA S, TENORI L. Comparison of frozen and fresh apple pulp for NMR-based metabolomic analysis[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(8): 2135-2140. DOI:10.1007/s12161-015-0107-9.

[11] KO B K, AHN H J, VAN DEN BERG F, et al. Metabolomic insight into soy sauce through ^{1}H NMR spectroscopy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(15): 6862-6870. DOI:10.1021/jf901454j.

[12] LIU C L, PAN D D, YE Y F, et al. 1H NMR and multivariate data analysis of the relationship between the age and quality of duck meat[J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 1281-1286. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.03.102.

[13] PIRAS C, SCANO P, LOCCI E, et al. Analysing the effects of frozen storage and processing on the metabolite profile of raw mullet roes using ^{1}H NMR spectroscopy[J]. Food Chemistry, 2014, 159: 71-79. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.02.160.

[14] ZANARDI E, CALIGIANI A, PALLA L, et al. Metabolic profiling by 1H-NMR of ground beef irradiated at different irradiation doses[J]. Meat Science, 2015, 103: 83-89. DOI:10.1016/j.meatsci.2015.01.005.

[15] YE Y F, ZHANG L M, TANG H R, et al. Survey of nutrients and quality assessment for crab paste by ^{1}H NMR spectroscopy and multivariate data analysis[J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(25): 3353-3362. DOI:10.1007/s11434-012-5119-x.

[16] CHEN D, YE Y, CHEN J, et al. Evolution of metabolomics profiles of crab paste during fermentation[J]. Food Chemistry, 2016, 192: 886-892. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.07.098.

[17] XIAO C N, HAO F H, QIN X R, et al. An optimized buffer system for NMR-based urinary metabonomics with effective pH control, chemical shift consistency and dilution minimization[J]. Analyst, 2009, 134(5): 916-925. DOI:10.1039/B818802E.

[18] 娄永江, 魏丹丹, 陈超, 等. 运用代谢组学研究保鲜处理对坛紫菜小分子物质的影响[J]. 中国食品科学, 2016, 16(11): 196-203. DOI:10.16429/j.1009-7848.2016.11.027.

[19] ERIKSSON L, TRYGG J, WOLD S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS (R) models[J]. Journal of Chemometrics, 2008, 22: 594-600. DOI:10.1002/cem.1187.

[20] CLOAREC O, DUMAS M E, TRYGG J, et al. Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in ^{1}H NMR spectroscopic metabonomic studies[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77: 517-526. DOI:10.1021/ac048803i.

[21] FAN T W M. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures[J]. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1996, 28: 161-219. DOI:10.1016/0079-6565(95)01017-3.

[22] FAN T W M, LANE A N. Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR[J]. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2008, 52: 69-117. DOI:10.1016/j.pnmrs.2007.03.002.

[23] YAMAGUCHI S, YOSHIKAWA T, IKEDA S, et al. Measurement of the relative taste intensity of some *L*-*α*-amino acids and 5′-nucleotides[J]. Journal of Food Science, 1971, 36(6): 846-849. DOI:10.1111/j.1365-2621.1971.tb15541.x.

[24] SCHILICHTHERLE-CERNY H, GROSCH W. Evaluation of taste compounds of stewed beef juice[J]. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A, 1998, 207(5): 369-376. DOI:10.1007/s002170050347.

[25] TANG H R, WANG Y L. Metabonomics: a revolution in progress[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2006, 33(5): 401-417.

[26] NICHOLSON J K, LINDON J C, HOLMES E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. Xenobiotica, 1999, 29: 1181-1189. DOI:10.1080/004982599238047.

[27] STAPLETON P P, CHARLES R P, REDMOND H P, et al. Taurine and human nutrition[J]. Clinical Nutrition, 1997, 16(3): 103-108. DOI:10.1016/S0261-5614(97)80234-8.

[28] YANCEY P H, SIEBENALLER J F. Trimethylamine oxide stabilizes teleost and mammalian lactate dehydrogenases against inactivation by hydrostatic pressure and trypsinolysis[J]. Journal of Experimental Biology, 1999, 202(24): 3597-3603.

[29] GRAM L, DALGAARD P. Fish spoilage bacteria problems and solutions[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(3): 262-266. DOI:10.1016/S0958-1669(02)00309-9.

[30] ANTHONI U, CHRISTOPHERSEN C, GRAM L, et al. Poisonings from flesh of the Greenland shark *Somniosus microcephalus* may be due to trimethylamine[J]. Toxicon, 1991, 29(10): 1205-1212. DOI:10.1016/0041-0101(91)90193-U.

[31] GILL T A. Objective analysis of seafood quality[J]. Food Reviews International, 1990, 6(4): 681-714. DOI:10.1080/87559129009540899.