T-2 毒素对凡纳滨对虾的经口急性毒性效应研究

王雅玲，代喆，孙力军，吕鹏莉，徐德峰，刘颖，叶日英，聂芳红
（广东省水产品加工与安全重点实验室，广东普通高等学校水产品深加工重点实验室，广东海洋大学食品科技学院，广东湛江 524088）

摘要：通过 T-2 毒素微胶囊毒饵料一次性染毒凡纳滨对虾，采用模型拟合法测定 T-2 毒素对凡纳滨对虾经口 LD_{50}，并分析 Ca^{2+}-ATPase、多酚氧化酶（PPO）活力以及肌肉病理组织学变化，进而探明 T-2 毒素对凡纳滨对虾急性毒性效应。结果表明，T-2 毒素对凡纳滨对虾的急性毒性经口一次性暴露的 LD_{50} 为 1.22 mg/(kg·bw)，T-2 毒素对 PPO 酶活性和 Ca^{2+}-ATPase 活性的急性毒性效应 ED_{50} 分别为 0.05 和 3.22 mg/(kg·bw)，比较风险评估指数 RI 可知，PPO 活性可作为生物学效应标记描述 T-2 毒素对对虾的急性毒性效应，且比 Ca^{2+}-ATPase 更加灵敏。T-2 毒素急性暴露可导致肌纤维间隙面积比增大，可导致对虾肌肉品质劣化。采用 LC-MS/MS 定量检测染毒对虾肌肉中的 T-2 毒素，但是没有发现游离态 T-2 毒素残留，说明对虾中 T-2 毒素急性暴露不会引起物质蓄积，但却产生功能蓄积，可能是 T-2 毒素以隐蔽态形式存在，导致初始轻微损伤逐渐累加的结果。

关键词：T-2 毒素；凡纳滨对虾；急性毒性
文章篇号：1673-9078(2015)1-43-47 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.009

Acute Oral Toxicity of T-2 Toxin on *Litopenaeus Vannamei*

WANG Ya-ling, DAI Zhe, SUN Li-jun, LV Peng-li, XU De-feng, LIU Ying, YE Ri-ying, NIE Fang-hong
(Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: *Litopenaeus vannamei* were orally administered as single-dose capsules containing the T-2 toxin (T-2), and the oral median lethal dose (LD_{50}) of the T-2 toxin in *Litopenaeus vannamei* was determined using the model-fitting method. The Ca^{2+}-ATPase and polyphenol oxidase (PPO) activities, as well as the histopathological changes in muscles were analyzed to explore the acute toxicity of T-2 on *Litopenaeus vannamei*. The results showed that the LD_{50} of T-2 via oral administration in a single dose was 1.22 mg/(kg·bw), and the medium effective dose (ED_{50}) levels of Ca^{2+}-ATPase and PPO activities were 0.05 and 3.22 mg/(kg·bw), respectively. According to the risk index (RI), the PPO activity can serve as a biological marker for the acute toxicity of T-2 on *Litopenaeus vannamei* and is more sensitive than Ca^{2+}-ATPase. Acute T-2 exposure could lead to an increasing area ratio of the muscle fiber gap and shrimp quality deterioration. Quantitative analysis of T-2 in shrimp muscles was conducted by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); no free T-2 residues were found, indicating that acute T-2 exposure in shrimp could cause functional accumulation but not material accumulation. This was probably because T-2 was present in a masked form, which led to the gradual accumulation of minor damage during the initial stage.

Key words: T-2 toxin; *litopenaeus vannamei*; acute toxicity;

T-2 毒素(T-2 toxin)是由镰孢菌(*Fusarium spp.*)产生的 A-型单端孢霉烯族倍半萜烯化合物的代表，是该类化合物中毒性最强的毒素之一[1]，T-2 毒素已被划为自然界存在的最危险的食品污染源。T-2 毒素是引起食物中毒性白细胞缺乏症（Alimentary toxic aleukia，ATA）的病原物质[2]，且广泛存在水产饲料中[3]。研究人员发现水产动物长期采食受 T-2 毒素污染的饲料会造成生长缓慢、健康受损的症状。当饲料中 T-2 毒素含量达到 6 mg/(kg·bw)时可导致虹鳟鱼致死[4]。饲料中含有 0.1 mg/kg 的 T-2 毒素饲喂凡纳滨对虾其生长速率显著降低，而在 2.0 mg/kg 的含量水平下才观察到斑节对虾生长减慢。以 1.0~2.0 mg/kg 的 T-2 毒素分别饲喂凡纳滨对虾 8 周和斑节对虾 10 周后，淋巴器官和造血组织出现炎症并联系松散，肝胰腺发生萎缩性变化且退化严重[5]。但是 T-2 毒素对对虾的危害的评价

收稿日期：2014-06-24
基金项目：国家自然科学基金资助项目（31171634，31371777，31201309，31371746）
作者简介：王雅玲（1965-），女，博士，教授，研究方向：水产品质量与安全
通讯作者：孙力军（1965-），男，博士，教授，研究方向：水产品质量与安全

指标未见报道[6]。半数致死剂量 LD_{50} 是评价外源化合物毒性大小的常用指标[7]。而 T-2 毒素主要通过抑制蛋白质和 DNA 的合成使生物体能量代谢紊乱，破坏机体免疫系统，致使机体出现中毒症状[8]，钙泵即 Ca^{2+}-ATPase 活性是反映肌肉组织蛋白损伤效应的敏感指标[9]，已经被广泛用作评价肌动球蛋白完整性的指标也是判断肉品质的最佳指标之一[10]。多酚氧化酶（Polyphenol Oxidase，PPO）活力是凡纳滨对虾在贮藏和加工过程中黑变等品质控制最为直观的评价指标[11]。因此，本研究拟通过 T-2 毒素经饲 料一次性暴露染毒凡纳滨对虾，采用模型拟合法测定 T-2 毒素对凡纳滨对虾急性毒性的 LD_{50}，同时检测 Ca^{2+}-ATPase、PPO 酶活力以及肌肉病理组织学变化，进而探明 T-2 毒素对凡纳滨对虾急性毒性效应，为 T-2 毒素对对虾蓄积毒性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 对虾染毒分组

随机挑选体质健康、个体大小均一的凡纳滨对虾（5±0.5 g），按照每组 10 尾（设 3 个平行）随机分配到长方形硬塑养殖箱（容积为 40×30×12 cm^3），利用充气式养殖系统保持海水溶氧量 DO>6 mg/L，pH 6.5~7.5；水温 24~28 ℃；盐度 9.18~11.99 ‰。每天换水 1/3，采用自然光照，每日按凡纳滨对虾体重的 5%实验饲料饲喂三次（AM9:00；12:00；PM21:00），饲喂比为 2:3:5。

采用 T-2 毒素微胶囊饲料染毒，以 2 mg/(kg bw)为 T-2 毒素暴露的中剂量组，设 5 个染毒剂量组（0.5、1、2、4、8 mg/(kg bw)和空白对照组。对虾暂养 1 周后停喂 24 h 后进行投喂毒饵料。24 h 之后饲喂正常饲料，测定 7 d 凡纳滨对虾的死亡率和生物学效应变化。

1.2 Ca^{2+}- ATPase 活性的测定

将凡纳滨对虾去头、去尾、去壳，取得的肌肉样品，采用南京建成无机磷测定试剂盒测定肌肉中无机磷浓度，再将磷含量进行换算 Ca^{2+}-ATPase 活性[10]，单位为 μMPi/(min·mg)。

1.3 多酚氧化酶（PPO）活性的测定

取 50 μL 待测液于酶标板中，加入预热的 150 μL PBS，再加入 50 μL 0.01 M L-DOPA 混匀，立即放入酶标仪，492 nm 测 OD 值，每 2 分钟测一次，共测 10 次。每增加 0.001 OD_{492} 为一个酶活力单位。

1.4 采用 LC-MS/MS 方法检测对虾肌肉中的 T-2 毒素

采用 LC-MS/MS 定量检测染毒对虾肌肉中的 T-2 毒素。质谱参数为喷雾电压 4500 V，鞘气压力 35 au，辅助气压 15 au，毛细管温度 270 ℃，碰撞压 1.5 mTorr。选取了质荷比为 185.2、215、244.9、304.9 为 T-2 毒素的定性子离子，其中响应值较高者为定量离子。液相色谱条件中选取色谱柱为 Hypersil GOLD(100 mm×2.1 mm，5 μL)，进样量 10 μL，针头到瓶底距离 1.0 mm，进样速度 10.0 μL/s，淋洗体积 1500 μL，淋洗速度 100.00 μL/s，冲洗体积 1500 μL，进样速度 250.0 μL/min。流动相 A 相为甲醇，B 相为含 0.1%甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液。样品前处理过程为中性环境，提取溶剂为乙酸乙酯。根据标准曲线定量 T-2 毒素的量。

1.5 数据处理统计

用 Excel 绘制死亡曲线并拟合饲料中 T-2 毒素剂量与死亡率的关系曲线；用 Mathematica 5.0 根据关系曲线求出死亡率达 50%时的 T-2 毒素剂量，即 LD_{50}。采用 Origin 8.5 进行剂量-反应曲线的绘制。求出第七天时饲料中 T-2 毒素剂量与凡纳滨对虾肌肉相关酶活性的剂量-反应关系。根据拟合曲线求出半数效应量（ED_{50}）、风险评估指数（$RI=LD_{50}/ED_{50}$）风险评估系数（$RF = LD_5 / ED_{95}$）、可靠或确定风险评估系数（$CRF=LD_1/ED_{99}$），其中 ED_{95} 为基本有效量，ED_{99} 为肯定有效量。

2 结果与讨论

2.1 T-2 毒素对凡纳滨对虾的急性毒性 LD_{50} 的测定

在生物体系中，一般外源化合物诱导的生物学效应指标都符合正态分布。正态分布的钟形曲线可能是窄而高或者是宽而矮。两端的数据没有代表性。所以取中点，半数致死浓度或剂量。因此，采用半数致死浓度或剂量表示受试物的急性毒性大小。本研究以 T-2 毒素暴露剂量为横坐标，染毒组凡纳滨对虾群体累积死亡率为纵坐标拟合曲线（图 1），拟合公式为 $y=0.67x^3-11.01x^2+58.14x-5.63$($R^2=0.987$)，根据方程可知当饲料中 T-2 毒素暴露剂量为 1.22 mg/(kg bw)时，试验染毒对虾群体死亡率达 50%。即 T-2 毒素对凡纳

滨对虾的急性毒性经口一次性暴露的 LD_{50} 为 1.22 mg/(kg·bw)，LD_1 为 0.19，LD_5 为 0.12 mg/(kg·bw)。

迄今为止，国内外没有任何报道针对 mg/(kg·bw)药品或毒物对凡纳滨对虾 LD_{50} 的测定，大部分只是停留在 LC_{50} 的检测上[12]，关于 T-2 毒素的半数致死剂量(LD_{50})只有 1991 年之前有所研究，主要是针对家兔和大小鼠等陆生动物。本研究结果 T-2 经口一次性暴露剂量为 0.19 mg/(kg·bw)时，对虾出现死亡，远远低于文献报道的 T-2 毒素对虹鳟鱼的剂量[4]，说明 T-2 毒素对对虾的毒性比虹鳟鱼强。根据毒理学急性毒性试验设计原则，动物体重是剂量分组所要考虑的重要影响因素，因为不同体重的同种动物对同一外源化合物的易感性存在很大差异，导致 LD_{50} 不同，由此可见，对于不同体重的对虾，半数致死量也是有所差异的，本实验主要是针对成年中虾（体重 5 g 左右）。这一研究结果将为 T-2 毒素对凡纳滨对虾的实验性研究及限量标准研究提供理论依据。

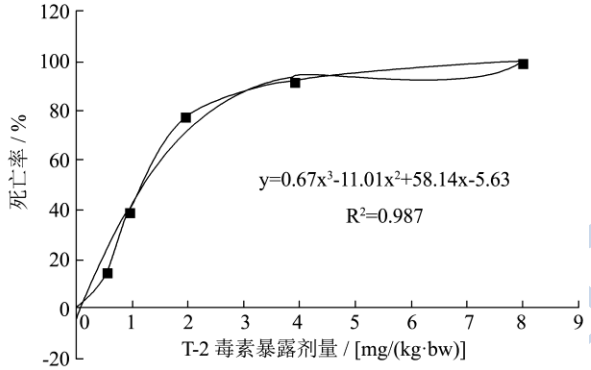


图 1 T-2 毒素暴露剂量与对虾群体累积死亡率的剂量反应关系

Fig.1 Dose-response relationship between the T-2 toxin exposure dose and cumulative mortality rate of the shrimp groups

2.2 T-2 毒素对肌肉 Ca^{2+}-ATPase 活性和 PPO 活性的影响

T-2 毒素剂量与凡纳滨对虾肌肉 Ca^{2+}-ATPase 活性的剂量-反应曲线为 $y=-3839+4047\ (1+10^{-0.03\ (41.87+x)})^{-1}$（$R^2=0.968$）。通过拟合公式得到 T-2 毒素对凡纳滨对虾毒性的半数效应量 ED_{50} 为 3.22 mg/(kg·bw)，基本有效量 ED_{95} 为 7.52 mg/(kg·bw)，肯定有效量 ED_{99} 为 7.96 mg/(kg·bw)。RI、RF 和 CRF 分别为 0.38、0.03 和 0.02 (图 2)。

T-2 毒素剂量与凡纳滨对虾肌肉 PPO 活性的剂量-反应曲线为 $y=-108518+108617\ (1+10^{-5.15\ (0.60\ +x)})^{-1}$（$R^2=0.998$）。通过拟合公式得到半数效应量 ED_{50} 为 0.05 mg/(kg·bw)，基本有效量 ED_{95} 为 2.40 mg/(kg·bw)，肯定有效量 ED_{99} 为 8.00 mg/(kg·bw)。RI、RF 和 CRF 分别为 24.4、0.08 和 0.02（图 3）。

风险评估参数反映 T-2 毒素对待测指标的影响及其与最大危害效应之间的距离，用定量的方法描述了待测的生物学指标显示 T-2 毒素潜在危害的准确程度 ，是 T-2 毒素危害评价创新方法。比较 Ca^{2+}-ATPase 活性和 PPO 活性的风险评估指数（RI）、风险评估系数（RF）和确定风险评估系数（CRF），可知采用 PPO 活性来描述 T-2 毒素对对虾的潜在危害比 Ca^{2+}-ATPase 活性指标更加灵敏。该结论解决了 T-2 毒素对凡纳滨对虾危害评估指标缺乏的问题，相对于前人报道结果[5,9]，本研究推进了 T-2 毒素对水产动物危害评估的研究进程。

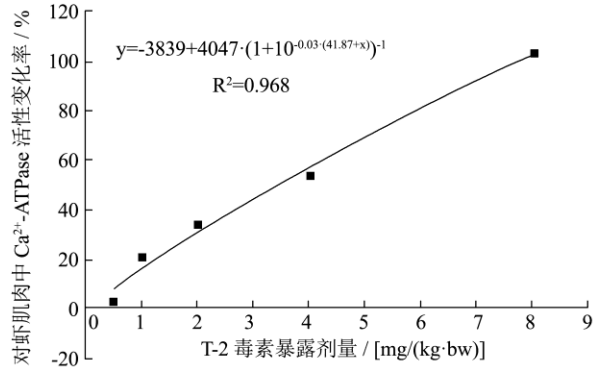


图 2 T-2 毒素剂量与凡纳滨对虾肌肉中 Ca^{2+}-ATPase 活性剂量-反应关系

Fig.2 Dose-response relationship between the T-2 toxin and Ca^{2+}-ATPase activity in shrimp musdes

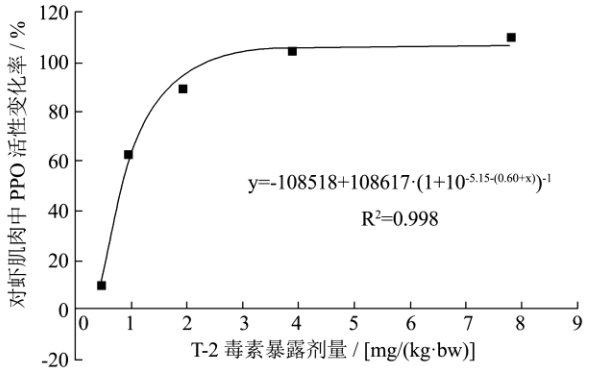


图 3 T-2 毒素剂量与凡纳滨对虾肌肉中 PPO 活性剂量-反应关系

Fig.3 Dose-response relationship between the T-2 toxin and PPO activity in shrimp musdes

2.3 T-2 毒素对凡纳滨对虾肌肉组织形态的影响

凡纳滨对虾肌肉横切图的肌束呈平行排列。空白对照组的凡纳滨对虾肌肉结构完整，肌纤维排列致密，肌节较丰满，仅有少量的间隙（图 4a）。低剂量时，

肌纤维会变得更加致密，间隙变小（图 4b），当 T-2 毒素剂量大于 1 mg/kg 时，肌纤维间隙不断变大并且不断地发生断裂的现象，出现小片化，肌节间隙逐渐增大，肌纤维结构由致密变得松散（图 4c）。T-2 毒素 2 mg/kg 时，前期出现肌节间隙变大（图 4d），小片化和断裂情况严重（图 4e），直至溶融（图 4f）。

同一剂量组的肌肉组织切片随着时间的推移呈现相同的变化趋势。第 4 d 时，肌肉的肌纤维开始出现小片化（图 5，4d），第 5 d 时，肌肉的肌纤维小片化程度严重（图 5，5d），随着时间的推移，肌肉组织开始自我修复，肌节的间隙逐渐减小，肌肉组织开始变得整齐（图 5，6d），随即又会发生肌节间隙变大并伴随断裂现象（图 5，7d）。

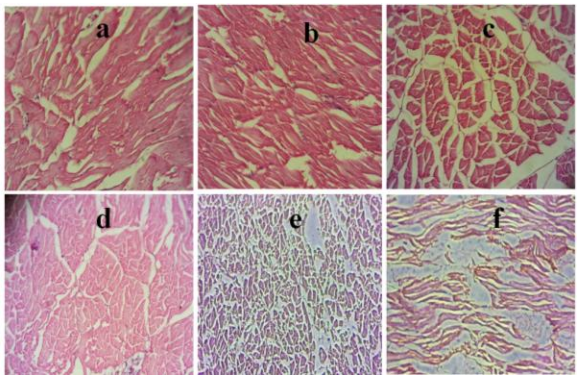


图 4 T-2 毒素急性暴露 7 天后凡纳滨对虾肌肉组织变化

Fig.4 Transection of shrimp muscle after 7 days of T-2 toxin exposure (a-0 ppm, b-0.5 ppm, c-1 ppm, d-2 ppm, e-4 ppm, f-8 ppm)

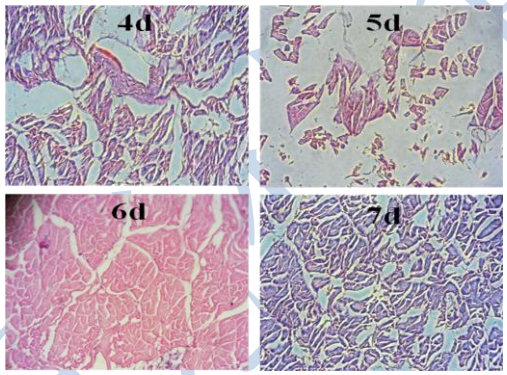


图 5 急性毒性 2ppmT-2 毒素急性暴露后不同天数的凡纳滨对虾肌肉组织变化

Fig.5 Transection of shrimp muscles following acute T-2 toxin exposure (2 ppm) for different number of days

肌肉收缩的物质基础是肌纤维,肌纤维结构的改变可能会影响到肌肉的收缩功能。一定剂量的 T-2 毒素对凡纳滨对虾肌肉组织结构产生不同程度的损伤。肌节间隙的增大可能是因为 T-2 毒素使肌节产生收缩和聚合，使间隙增大；由于体内蛋白酶的作用，肌纤维与肌内膜发生脱离，细胞间的连接力减弱，肌纤维的收缩作用逐渐消失，间隙有所减少。随着肌肉组织尤其是结缔组织不断的降解，肌纤维会发生断裂和小片化，最终会导致肌节间隙的增大，肌纤维结构会由致密变得疏松[13]，肌纤维和肌纤维间隙的面积比例是评价肌肉组织结构变化和肉质优劣常用的指标，肌纤维面积比例越大，肌纤维间隙面积比例越小，说明肌肉组织越致密，肉质越好[14]。T-2 毒素急性暴露可导致肌纤维间隙面积比增大,可导致对虾肌肉品质劣化，但具体的量效关系还有待于进一步研究。本研究首次报道 T-2 毒素对凡纳滨肌肉组织形态学的影响，进一步阐明了前人研究发现的 T-2 毒素对斑节对虾淋巴器官、造血组织和肝胰腺危害可导致对虾肌肉品质劣化的后果。

2.4 对虾肌肉中 T-2 毒素的定量检测

表 1 LC-MS/MS 方法测定对虾肌肉中 T-2 的准确度与精密度

Table 1 Accuracy and precision of LC-MS/MS in measuring the T-2 toxin in shrimps

测定物 (ng/g,n=6)	回收率 (平均值±标准差)/%	RSD /%
1	109.92±5.39	4.90
10	94.14±1.90	2.01
100	90.77±2.10	2.31

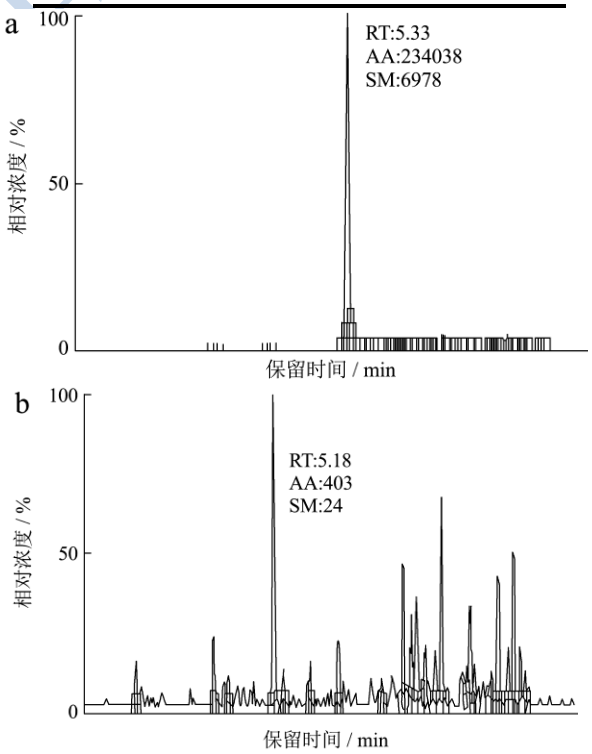


图 6 凡纳滨对虾肌肉组织中 T-2 毒素的 LC-MS/MS 图谱

Fig.6 LC-MS/MS chromatograms of the **T-2 toxin in *Litopenaeus vannamei* muscles**

注：a: T-2 毒素标准品；b-对虾肌肉。

准确度由回收率衡量，精密度用相对标准偏差的百分数表示(RSD%)。通过测定肌肉中高中低三个浓度值得出。T-2 毒素高中低浓度在不同部位的回收率在88.67%~115.31%之间，满足 80%~120%的范围内。T-2 的相对标准偏差在 1.95%~9.03%间，HT-2 的相对标准偏差在 2.01%~4.90%间，不超过 15%(表 1)，说明对虾肌肉中 T-2 毒素检测的 LC-MS/MS 方法具有良好的准确度和精密度。

采用该方法测定急性一次性暴露 7 d 的对虾肌肉中 T-2 毒素含量，T-2 毒素的保留时间为 5.33 min（图 6A），而结果所有剂量组的对虾肌肉中在此保留时间均为出现峰值即均未发现 T-2 毒素残留（图 6B），说明 T-2 毒素急性暴露 7 d 后不会产生 T-2 毒素蓄积，可能 T-2 毒素经生物酶转化为其他代谢产物，因此采用 T-2 毒素检测方法无法识别，而形成隐蔽态 T-2 毒素，至于隐蔽态 T-2 毒素的毒性还有待于进一步研究。但是，从对虾的组织形态和酶学指标的生物学改变角度，发现 T-2 毒素急性暴露可引起对虾的生物功能改变，也就是说 T-2 毒素急性暴露可引起对虾的功能蓄积毒性。

3 结论

本研究首次报道了 T-2 毒素对凡纳滨对虾的急性毒性经口一次性暴露的 LD_{50} 为 1.22 mg/(kg·bw)，T-2 毒素对 PPO 酶活性和 Ca^{2+}-ATPase 活性的急性毒性效应 ED_{50} 分别为 0.05 和 3.22 mg/(kg·bw)，比较风险评估指数 RI 可知，PPO 活性可作为生物学效应标记描述 T-2 毒素对对虾的急性毒性效应，且比 Ca2+-ATPase 更加灵敏。T-2 毒素急性暴露可导致肌纤维间隙面积比增大，可导致对虾肌肉品质劣化。采用准确度和精密度良好的 LC-MS/MS 方法，虽然未发 现对虾肌肉中 T-2 毒素均残留，但是从对虾的组织形态和酶学指标的生物学改变角度，发现了 T-2 毒素急性暴露可引起对虾的功能蓄积毒性。

参考文献

[1] Krska R, Welzig, E, Boudra H. Analysis of Fusarium toxins in feed [J]. Animal Feed Science and Technology, 2007, 137 : 241-264

[2] Yan D, Kang P, Yang J, et al. The effect of Kashin-Beck disease-affected feed and T-2 toxin on the bone development of Wistar rats [J]. International Journal of Rheumatic Diseases, 2010, 13(3): 266-272

[3] 张自强.我国饲料中黄曲霉毒素 B_1、T-2 毒素和赭曲霉毒素 A 分布规律的研究[D].四川农业大学硕士论文:2009
ZHANG Zi-qiang. The contamination and distribution rule of aflatoxin B_1, T-2 Toxin and ochratoxin a in feedstuffs in China [D], Sichuan Agricultural University Master's Dissertation, 2009

[4] Hooft J M, Elmor H I, Encamacao P, et al. Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) is extremely sensitive to the feed-borne Fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON) [J]. Aquaculture, 2011, 311: 224-232

[5] Supamattaya K, Bundit O, Boonyarapatlin M, et al. Effects of mycotoxins T-2 and Zearalenone on growth performance immuno-ohysiological parameters and histological changes in Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. XII International Symposium of Fish Nutrition & Feeding, 2006, 41: 218-221

[6] Santacroce M P, Conversano M, Casalino E , et al. Aflatoxins in aquatic species: metabolism , toxicity and perspectives [J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2008, 18: 99-130

[7] 顾兵,张政,李玉萍,等.半数致死量及其计算方法概述.中国职业医学,2009,36(6):507-511
GU Bing, ZHANG Zheng, LI Yuping, et al. Summary of median lethal dose and its calculation methods [J]. Chinese Occupation Medicine , 2009, 36(6): 507-511

[8] 王雅玲,励建荣,孙力军.养殖对虾 T-2 毒素蓄积危害研究现状[J].中国食品学报,2012,12:124-129
WANG Ya-ling, LI Jian-rong, SUN Li-jun. Research status of T-2 accumulation harm in cultured prawn [J], Journal of Chinese Food Science and Technology, 2012, 12: 124-129

[9] 黄卉,李来好,杨贤庆,等.对虾产品质量分级要素及评价技术[J].中国水产科学,2010,17(6):1371-1376
HUANG Hui, LI Lai-hao, YANG Xian-qing, et al. Quality grading factors and evaluation technology of prawn [J]. Journal of Fishery Science of China, 2010, 17(6): 1371-1376

[10] 林洪,王长峰,李兆杰,等.中国对虾肌动球蛋白变性后 ATPase 活性的研究[J].青岛海洋大学学报,1996,4:475-480
LIN Hong, WANG Chang-feng, LI Zhao-jie, et al. The Chinese of the ATPase activity of prawn am (*Penaeus chinensis*) due to freeze and thermal denaturation [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1996, 4: 475-480

[11] 黄万有,吉宏武,刘书成,等.凡纳滨对虾 PPO 的组织分布和活性与其贮藏过程中黑变的关系[J].现代食品科技, 2014, 30(2):89-94
HUANG Wan-you, JI Hong-wu, LIU Shu-cheng, et al. Relation of tissue distribution and activity of polyphenol oxidase from *Litopenaeus vannamei* and its melanosis during storage [J]. Modern Food Science and Technology, 2014,

30(2): 89-94

[12] Tumburu L., Shepard E F, Strand A E, et al. Effects of endosulfan exposure and Taura Syndrome Virus infection on the survival and molting of the marine penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Chemosphere, 2012, 86(9): 912-918

[13] Wang H, Joseph J A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader [J]. Free Radical Biology Medicine, 1999, 27(5-6): 612-616

[14] Diaz-tenorio L M, Garcia-carreno F L, Pacheco-aguilar R. Comparison of freezing and thawing treatments on muscle properties of whiteieg shrimp (*Litopenaeiis vannamei*) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2007, 31(5): 563-576

现代食品科技