



## 菲律宾蛤仔肌原纤维蛋白热变性与其闭壳肌脱壳的关联性

支慧敏<sup>1</sup>, 李杨<sup>1</sup>, 王薇<sup>1</sup>, 董涵玉<sup>1</sup>, 卢航<sup>1</sup>,  
赵慧<sup>1</sup>, 姜玉声<sup>2</sup>, 田元勇<sup>1\*</sup>

(1. 大连海洋大学食品科学与工程学院, 辽宁 大连 116023;

2. 大连海洋大学, 大连市虾蟹繁育与健康养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 为了探讨菲律宾蛤仔热处理后闭壳肌脱壳与肌原纤维蛋白热变性的关联, 实验首先通过差示扫描量热仪 (DSC) 研究了闭壳肌蛋白的热变性规律, 然后利用光学显微镜和电子显微镜观察了加热对闭壳肌微观结构的影响, 以  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性、盐溶解度、SDS-PAGE 为指标研究了肌原纤维蛋白的热变性规律。新鲜的闭壳肌 DSC 结果显示, 在 50、60 和 78 °C 时共有 3 个吸收峰, 闭壳肌在 50 和 80 °C 加热 5 min 后对应的吸收峰消失, 可能分别对应肌球蛋白和肌动蛋白发生了热变性。菲律宾蛤仔在沸水浴加热处理后, 闭壳肌纤维呈现横向聚集和纵向收缩, 由于收缩程度不同导致闭壳肌和外壳出现不同程度分离状态。肌原纤维蛋白加热处理 (0.5 mol/L NaCl, 45 °C, 5 min) 后,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性和盐溶解度快速下降, 表明肌球蛋白发生了热变性。此外, 肌动蛋白在变性前对肌球蛋白具有非常明显的保护作用。研究表明, 使肌原纤维蛋白中肌球蛋白、肌动蛋白、副肌球蛋白同时变性, 有利于脱壳的发生。本研究可为菲律宾蛤仔后续加工提供理论依据和数据支撑。

**关键词:** 菲律宾蛤仔; 热处理; 微观结构; 肌原纤维蛋白

**中图分类号:** S 985; TS 254.1

**文献标志码:** A

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 在我国分布广泛, 是我国四大养殖经济贝类之一。据统计, 2022 年全国的总产量超 437 万 t, 其中辽宁省的产量约为 150 万 t, 占比约为 35%<sup>[1]</sup>。菲律宾蛤仔营养丰富、味道鲜美, 深受消费者的喜爱。其销售方式主要包括: ①生鲜品, 为主要的流通方式, 消费者购买后采用烤、炒、蒸、煮等烹饪方式加热后食用。烹饪后经常出现闭壳肌黏附到外壳上的情况, 而且不易分离, 造成了非常严重的食物浪费。②加工品, 包括即食产品<sup>[2]</sup>、干制品<sup>[3]</sup>和罐头产品<sup>[4]</sup>等。

脱壳是加工的关键工艺<sup>[5]</sup>。主要有加热脱壳<sup>[6]</sup>、

超高压脱壳<sup>[7-8]</sup>、微波脱壳<sup>[9]</sup>和激光脱壳<sup>[10]</sup>等。超高压脱壳具有效率高、蛋白变性程度低等优点; 微波脱壳和激光脱壳具有加热速率快、开壳率高、能耗低, 能最大程度保留贝肉的营养成分等优点。但这三种方法存在成本高、设备昂贵、不能同时大量处理等问题。而加热脱壳具有操作简单、生产成本低等优点, 被众多企业采用<sup>[11]</sup>。加热脱壳的基本原理是利用闭壳肌热收缩, 使肉与壳分离。肌肉收缩在微观上是肌原纤维蛋白中粗丝蛋白和细丝蛋白间的滑动<sup>[12]</sup>。温度是影响肌肉收缩非常重要的因素之一<sup>[13]</sup>, 但是关于加热温度和肌肉收缩之间的研究较少。研究肌原纤维蛋白在不同加

收稿日期: 2024-03-17 修回日期: 2024-04-22

资助项目: 国家重点研发计划“政府间国际科技创新合作”项目 (2022YFE0117900)

第一作者: 支慧敏 (照片), 从事水产品加工与综合利用研究, E-mail: zhihuimin\_99@163.com

通信作者: 田元勇, 从事水产品加工与综合利用研究, E-mail: tianyuanrong@foxmail.com



热温度下的变化规律有助于理解肌肉热收缩, 对热加工方式、烹饪方式的选择具有重要参考价值。目前, 针对菲律宾蛤仔加工工艺的研究主要集中在蛤仔蒸煮液<sup>[14]</sup>、蛤肉的呈味特性<sup>[15]</sup>等方面, 而忽视了加热温度对蛤仔闭壳肌蛋白质影响的基础研究。因此, 本研究从菲律宾蛤仔闭壳肌热变性温度入手, 研究了温度对闭壳肌微观结构、肌原纤维蛋白的热变性速率的影响, 为蛤仔脱壳工艺改进提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

活品菲律宾蛤仔 25 kg, 规格 (8.00±1.84) g, 购于辽宁省丹东某食品有限公司。菲律宾蛤仔到达实验室之后立即进行分选, 剔除活力弱的和已经死亡的样本, 放入充氧海水 (盐度 2.1%、温度 10.5 °C、溶解氧含量 6.5 mg/L、贝水质量比≈1:1) 中净化处理 12 h 用于后续分析。实验过程中操作人员严格遵守伦理规范, 并按照动物实验管理与技术规范执行。

氢氧化钠 (分析纯), 无水甲醇 (分析纯), 氯化钠 (NaCl, 分析纯) (天津市科密欧化学试剂有限公司), 马来酸 (纯度≥99%), 高氯酸 (perchloric acid, PCA, 分析纯), 牛血清白蛋白 V (纯度 97%), 乙二醇-双-(2-氨基乙醚) 四乙酸 (EGTA, 纯度≥97%), 氯化钙 (CaCl<sub>2</sub>) (纯度≥96%), 考马斯亮蓝 R-250、SDS (分析纯, 北京索莱宝科技有限公司), 米吐尔、钼酸铵 (分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 无水乙醇 (分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司), 预混型蛋白质 Marker (Premixed Protein Marker) 生化试剂 (6.5~200 ku, 宝生物工程有限公司), 甲醇 (纯度≥97%)、丙烯酰胺、SDS-聚丙烯酰胺电泳试剂 (西格玛奥德里奇贸易有限公司), 氯化钾 (KCl)、盐酸、磷酸二氢钾、丙酮 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 812 包埋剂 (美国 SPI 公司), 钼酸 (纯度≥99.6%, 庄信万丰化工有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

UV-1800PC 型紫外分光光度计, 上海美普达仪器有限公司; BS224S 型精密电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; GL-21M 型高速冷冻离心机, 德国 Hermle Labortechnik GmbH 公司; Synergy H1 型酶标仪, 美国博腾公司; HG-200 型

高速分散均质机, 日本 HSIANGTAI 公司; PB-10 型 pH 计, 德国 Sartorius 公司; OS-I 型回旋脱色摇床, 大连竞迈公司; TMK-1K 型恒温水浴锅, 日本亚速旺株式会社; IMS-40 型全自动雪花制冰机, 常熟市雪科公司; AE-6500 型垂直电泳槽, 日本 ATTO 公司; DMI3000B 型倒置荧光显微镜, 德国徕卡仪器有限公司; JEM1400PLUS 型透射电子显微镜, 日本电子株式会社; Q20 差示扫描量热仪 (differential scanning calorimeter, DSC), 美国 TA 公司。

### 1.3 实验方法

菲律宾蛤仔闭壳肌的 DSC 测定 在 300 mL 烧杯中加入 200 mL 自来水, 在烧杯中心水温分别达到 40、50、60、70、80 和 90 °C 后, 放入 6 只活品菲律宾蛤仔, 对蛤仔进行水浴加热 5 min 后取出。分别记为 40H、50H、60H、70H、80H 和 90H 组, 以未加热菲律宾蛤仔作为对照组, 设为 UH 组。各组蛤仔的闭壳肌中心位置称取 10 mg 置于固体铝坩埚内, 用空白铝坩埚作为基线进行校准, 将其压盖密封后放入差示扫描量热仪炉体中, 将程序设定为: 在 20 °C 下平衡 2 min, 然后从 20 °C 以 5 °C/min 的速率升至 90 °C, 所测温度与热流率的关系图谱即为 DSC 曲线。

菲律宾蛤仔在不同加热处理下脱壳状态

在 300 mL 烧杯中加入 200 mL 自来水, 加热至沸腾后放入 15 只活品菲律宾蛤仔, 水浴加热 5 min 后取出, 观察脱壳状态, 进行 3 次重复。

另外, 将菲律宾蛤仔分为 2 组, 1 组在 300 mL 烧杯中加入 200 mL 自来水, 在烧杯中心水温达到 60 °C 时放入 60 只活品菲律宾蛤仔, 水浴加热 20 min 后取出观察脱壳情况, 再将加热后的蛤仔放入沸水中加热 5 min 后观察脱壳情况; 另 1 组是将 60 只活品菲律宾蛤仔直接放入沸水中加热 5 min。两组分别记为 60H~100H 组和 100H 组, 观察两组的脱壳情况, 计算 60 只蛤仔加热后各状态的比例。

菲律宾蛤仔热处理后闭壳肌的组织结构变化 将菲律宾蛤仔分为 3 组, 其中未加热菲律宾蛤仔作为对照组, 设为 UH 组; 另外 2 组在 300 mL 烧杯中加入 200 mL 自来水, 在烧杯中心水温分别达到 50 °C 和 80 °C 后, 放入 15 只活品菲律宾蛤仔, 对蛤仔进行水浴加热 5 min 后取出, 分别记为 50H 组和 80H 组。

参照张龙<sup>[16]</sup>的方法, 取 UH 组、50H 组和 80H 组的闭壳肌(横纹肌), 切成大小为 2 cm×2 cm×3 cm 组织置于 4% 的多聚甲醛进行固定, 用石蜡进行包埋、切片后, 使用苏木精-伊红染色, 在光学显微镜下观察组织结构。

取 UH 组、50H 组和 80H 组的闭壳肌(横纹肌)中心位置, 将其切成 1 mm×1 mm×2 mm 大小, 立即浸入 2.5% 戊二醛中固定 2 h (4 °C 下保存)。用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 配制的 1% 锇酸避光室固定 2 h, 再用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。组织依次在 50%、70%、80%、90%、95%、100%、100% 梯度乙醇中脱水, 每次 15 min, 100% 丙酮脱水 2 次, 每次 15 min。组织在丙酮与 812 包埋剂 1 : 1 比例(体积比)、37 °C 中渗透 2~4 h。在丙酮与 812 包埋剂 2 : 1 比例(体积比)、37 °C 下渗透过夜。37 °C 下纯 812 包埋剂中渗透 5~8 h。将纯 812 包埋剂倒入包埋板, 将样品插入包埋板, 在 37 °C 的烘箱中过夜。包埋板放置在 60 °C 烤箱聚合 48 h, 取出树脂块备用。利用切片机将树脂块切成 60~80 nm 超薄切片, 150 目方华膜铜网捞片。铜网与 2% 醋酸铀饱和酒精溶液避光染色 8 min; 超纯水清洗 3 次, 滤纸稍吸干, 室内干燥过夜。在透射电子显微镜下观察, 采集图像分析。

#### 菲律宾蛤仔闭壳肌肌原纤维蛋白的提取

菲律宾蛤仔肌原纤维蛋白 (ruditapes philippinarum myofibrillar protein, RMP) 的提取方法参照姜明慧<sup>[17]</sup>等。闭壳肌切成肉糜后取 6.0 g, 加入 10 倍体积的缓冲溶液 A (含 0.1 mol/L NaCl、5 mmol/L EGTA、20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 后用玻璃棒捣碎, 5 000×g 离心 5 min 弃上清液, 重复该操作 3 次。向沉淀再次加入 10 倍体积的缓冲溶液 A, 在 10 000 r/min 均质 30 s, 重复 3 次, 每次间隔 30 s, 5 000×g 离心 5 min, 弃上清液。沉淀加入 7 倍体积缓冲液 B (含 0.1 mol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 重复漂洗 3 次至上清液透明, 最后取沉淀加入适量缓冲液 B 悬液后经双层纱布过滤, 滤液即为 RMP, 全程操作均在 4 °C 下进行。采用双缩脲法<sup>[18]</sup>测定蛋白质浓度。

以 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 评价 RMP 的热稳定性 将 RMP 用缓冲液 B 调整蛋白浓度为 2.0 mg/mL, 再

将 1 mL RMP 溶液在 30、40、45、50 °C 下分别加热 0、2、5、10、15、20、30 min 后立即冰水浴冷却, 然后加入 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 反应液 (含 2 mmol/L ATP、5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、25 mmol/L 的 pH 7.0 Tris-马来酸、0.5 mol/L KCl), 置于 20 °C 的水浴锅内, 摇匀后计时开始反应, 分别于 0、10、20、30、45、60 min 时, 摇匀后吸取 1 mL 混合液, 加入 0.5 mL 15% 高氯酸以终止反应。静置 5 min 后, 取 0.5 mL 上清液, 加入 1.75 mL 钼酸铵和 0.25 mL 米吐尔, 混匀后在 25 °C 水浴锅内发色 45 min, 于 640 nm 波长处测定吸光度值。

以盐溶解性评价 RMP 的热稳定性 将 RMP 溶液调至 NaCl 终浓度为 0.5 mol/L, 蛋白终浓度 5 mg/mL, 在 30、40、45、50、60、70 °C 温度下分别加热 0、1、2、3、5、8、10、15 min, 将各实验组分别设为 30H、40H、45H、50H、60H 和 70H 组。在 4 °C 下 12 000×g 离心 20 min, 收集上清液, 通过上清液蛋白质量浓度和体积计算溶解度, 肌原纤维蛋白盐溶解度的计算公式:

$$\text{溶解度}(\%) = \frac{\rho_2 V_2}{\rho_1 V_1} \times 100\%$$

式中,  $\rho_1$  为 RMP 溶液中蛋白质量浓度 (mg/mL),  $V_1$  为 RMP 溶液体积 (mL),  $\rho_2$  为离心后上清液中蛋白质量浓度 (mg/mL),  $V_2$  为离心后上清液体积 (mL)。

RMP 的 SDS-PAGE 分析 将 RMP 溶液 (0.1 mol NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 在 40 和 45 °C 温度下分别加热 0、1、2、3、5、8、10、15、20、30 及 60 min 后, 在 4 °C 下 12 000×g 离心 20 min, 收集上清液。每组的上清液各取 0.5 mL 后, 以 1 : 1 (体积比) 加入电泳上样液 (含 0.14 mol/L SDS、8 mol/L 尿素、0.1 g/L 溴酚蓝、0.43 mol/L  $\beta$ -巯基乙醇、50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8), 混匀后 100 °C 加热 5 min 放置 10 min 进行电泳分析。浓缩胶质量分数为 5%, 分离胶质量分数为 7.5%, 进样量为 10  $\mu$ L, 然后用 R-250 考马斯亮蓝染色法检验, 再用甲醇-乙酸脱色液进行脱色, 扫描胶片后得到电泳图谱。

#### 1.4 数据分析

实验数据均以平均值±标准偏差的形式表示, 采用 Excel 2019 和 SPSS 25 软件进行数据统计分析、Origin 2019 软件作图, 所有实验均平行重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 菲律宾蛤仔不同温度加热后闭壳肌 DSC 分析

菲律宾蛤仔在不同温度加热后, 取闭壳肌进行 DSC 分析。发现菲律宾蛤仔的前、后闭壳肌的热变趋势基本一致, 从 UH 组中可以看出有 3 个

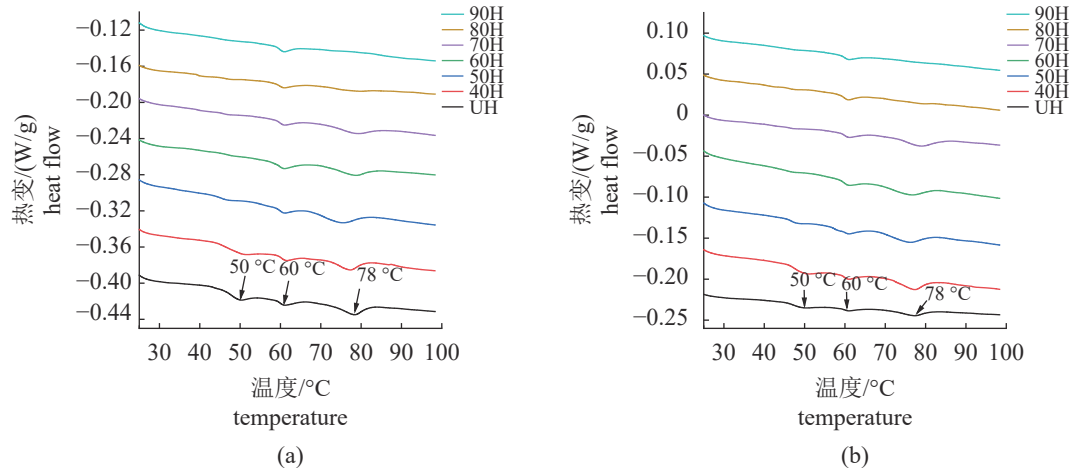


图 1 不同加热温度后菲律宾蛤仔闭壳肌肌肉 DSC 曲线

(a) 为前闭壳肌的 DSC 曲线; (b) 为后闭壳肌的 DSC 曲线。

Fig. 1 DSC curves of the adductor muscle of *R. philippinarum* after heating at different temperatures

(a) represents DSC curve of the anterior adductor muscle ; (b) represents DSC curve of the posterior adductor muscle.

### 2.2 菲律宾蛤仔热处理后的脱壳状态

菲律宾蛤仔沸水加热后外壳和闭壳肌出现 4 种不同状态: 未开壳 (图 2-a); 开壳, 为一侧闭壳肌或两侧与外壳黏附 (图 2-b, c); 脱壳, 为双侧外壳与闭壳肌完全分离 (图 2-d)。当把菲律宾蛤仔放入沸水中加热时, 闭壳肌产生热收缩, 收缩力超过黏附力时, 闭壳肌会从外壳脱落; 当闭壳肌的收缩力低于黏附力时, 闭壳肌会黏附在外壳上, 因此会出现不同脱壳情况。

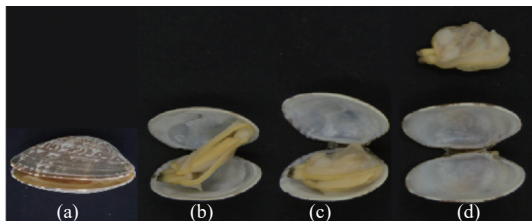


图 2 沸水加热后菲律宾蛤仔外壳与闭壳肌的分离状态 (a)~(d) 分别为菲律宾蛤仔闭壳肌与外壳的不同分离状态。

Fig. 2 Separation of the shell and adductor muscle of *R. philippinarum* after heating in boiling water

(a)~(d) are different separation states of adductor muscle and shell of *R. philippinarum*.

吸收峰, 分别对应 50、60 和 78 °C。50 和 78 °C 的吸收峰分别在 60H 和 80H 消失, 60 °C 的吸收峰即使加热至 90 °C 依然保持不变。肌球蛋白的热变性温度集中在 40~50 °C, 副肌球蛋白的热变性温度集中在 55~65 °C, 肌动蛋白的热变性温度集中在 70~80 °C<sup>[19]</sup>(图 1)。

实验比较了先 60 °C 加热然后沸水加热方式 (60H~100H)、直接沸水加热方式 (100H) 的脱壳状态, 结果如图 3 所示。60 °C 加热 20 min 不会开壳 (图 2-a), 然后再继续沸水加热 5 min 会开壳 (图 2-c), 但是几乎不会出现脱壳情况 (图 2-d)。而直接沸水加热全部开壳, 其中一部分发生了脱壳。60H~100H 开壳的比例为 100%, 但是无脱壳现象。100H 同样全部开壳, 但是其中 23.21% 脱壳。

### 2.3 不同加热条件对菲律宾蛤仔闭壳肌微观结构的影响

**闭壳肌光学显微镜观察** 热处理对菲律宾蛤仔闭壳肌微观结构的影响如图版 I 所示, 从 UH 组可以看出, 肌原纤维经苏木精-伊红染色后呈现浅红色, 肌纤维具有高度同向性, 呈直线柱状。从 50H 和 80H 组的横切面可以明显看出, 随着加热温度的升高, 闭壳肌的结构变得更加紧密, 肌纤维排列更加紧凑, 50H 和 80H 组的肌纤维走向呈现为横向聚集和纵向收缩, 肌膜也随之变宽。

**闭壳肌透射电镜观察** 进一步通过电子显微镜观察三组样品闭壳肌的微观结构, 发现 UH 组的闭壳肌横切面呈现出均匀分散的纤维状, 从

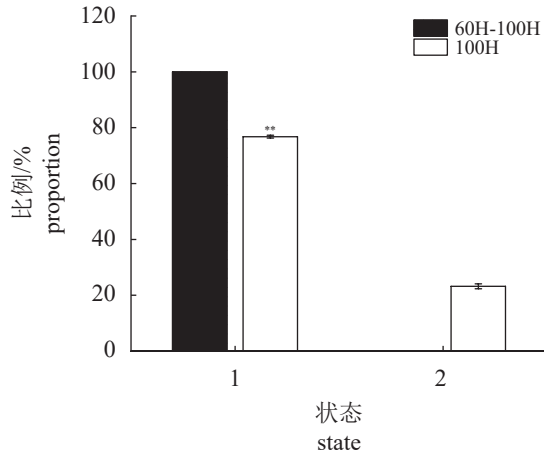


图3 两段加热(60 °C加热后沸水加热)与一段加热(直接沸水加热)对脱壳状态的影响

“\*\*\*”代表差异显著,  $P < 0.05$ 。1. 开壳, 2. 脱壳。

**Fig. 3 Effects of two-stage heating (boiling water heating after 60 °C heating) and one-stage heating (direct boiling water heating) on the shelling state**

“\*\*\*”represents significant difference,  $P < 0.05$ . 1. open shell state, 2. shelling state.

纵切面可以看出, 纤维之间基本保持平行分布, 具有一定的规律性(图版II)。50H组的闭壳肌肌纤维的横纵切面呈现出更紧密的纤维排列, 且间隙较小, 该结构能防止肌肉组织汁液流失, 说明加热使蛋白质聚集, 改变了闭壳肌的构象和质地; 80H组的闭壳肌肌纤维排列较为疏松, 并出现不同程度的开裂和断裂现象。

## 2.4 菲律宾蛤仔闭壳肌肌原纤维蛋白质性质分析

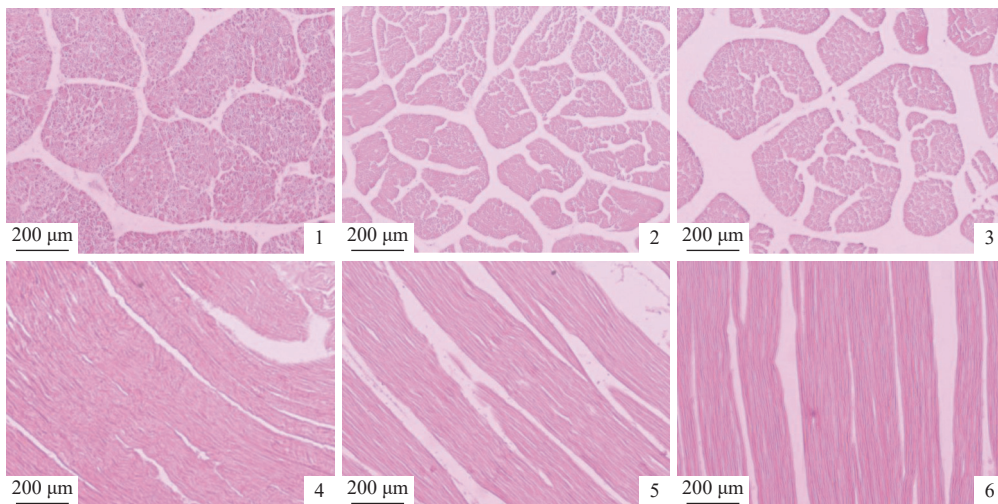
$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性评价肌球蛋白热变性速率  
 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性被用作肌球蛋白变性指标。RMP在不同温度加热后的 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase失活速率如图4所示, 当加热温度超过30 °C时,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase失活速率快速增加, 并且在40和45 °C的失活速率出现了拐点, 在5 min之内失活速率很快, 分别为 $4 \times 10^{-4}$ 和 $8 \times 10^{-4}/\text{min}$ , 5 min之后失活速率变缓。分析可能因为肌动蛋白与肌球蛋白结合状态影响了 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase失活速率。

不同温度加热后RMP中蛋白溶解性变化

RMP在0.5 mol/L的盐浓度下, 不同温度加热后的溶解度如图5所示, 30H组的RMP盐溶解性几乎没有变化; 40H组的RMP盐溶解性随着加热时间的延长而逐渐减小; 45H到70H组的RMP盐溶解性在加热前5 min时, 盐溶解性随着加热时间的延长而迅速下降, 下降速率分别为 $93.7 \times 10^{-3}$ 、 $163.2 \times 10^{-3}$ 、 $231.4 \times 10^{-3}$ 和 $268.0 \times 10^{-3}/\text{min}$ , 下降的速率随着加热温度的升高而更加迅速, 加热5 min后, 再延长加热时间, 盐溶解性的下降趋势趋于平缓, 不再有显著变化。

不同温度加热后RMP的SDS-PAGE分析

RMP在40和45 °C加热不同时间(0、1、2、3、5、8、10、15、20、30、60 min)的溶解蛋白组成如图6所示, 分子质量200 ku附近通常认定

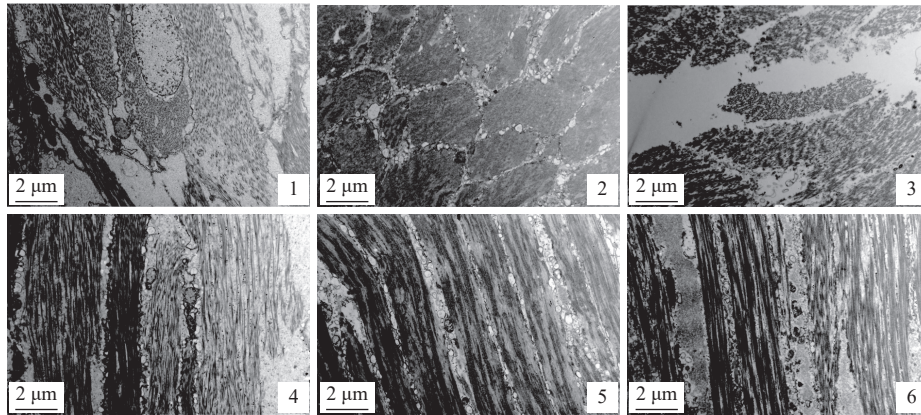


图版 I 不同温度加热后菲律宾蛤仔闭壳肌的光学显微结构

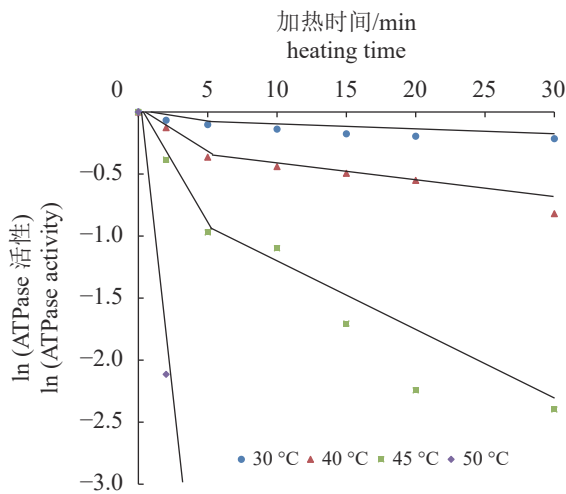
1~3 分别为 UH、50H、80H 组的闭壳肌横切面; 4~6 分别为 UH、50H、80H 组的闭壳肌纵切面, 下同。

**Plate I Light microscopical feature of the adductor muscle of *R. philippinarum* after heating at different temperatures**

1-3 represent the transverse sections of adductor muscle in UH, 50H and 80H groups, respectively. 4-6 represent the longitudinal sections of adductor muscle in UH, 50H and 80H groups, respectively; the same below.



图版 II 不同温度加热后菲律宾蛤仔闭壳肌的电子显微结构

Plate II Electron microscopical feature of the adductor muscle of *R. philippinarum* after heating at different temperatures图 4 不同温度加热后的肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性变化Fig. 4 Changes in myosin  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activities after heating at different temperatures

为肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MHC) 的条带消失最快, 在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  加热 5 min、 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  加热 4 min 后, MHC 条带几乎消失。其次是分子质量 40 ku 的肌动蛋白的条带也呈现减少趋势。而 100 ku 附近的副肌球蛋白条带再加热 30 min 后才观察到减少。分子质量大于 200 ku 的条带在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  加热 20 min 快速消失, 在  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  加热 15 min 快速消失。该条带和 100 ku 附近的副肌球蛋白条带变化趋势基本一致。

### 3 讨论

#### 3.1 菲律宾蛤仔不同温度加热后的闭壳肌的 DSC 曲线变化

菲律宾蛤仔在  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  加热后, 仅使闭壳肌中的肌球蛋白发生变性; 在  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  加热后, 可使闭壳

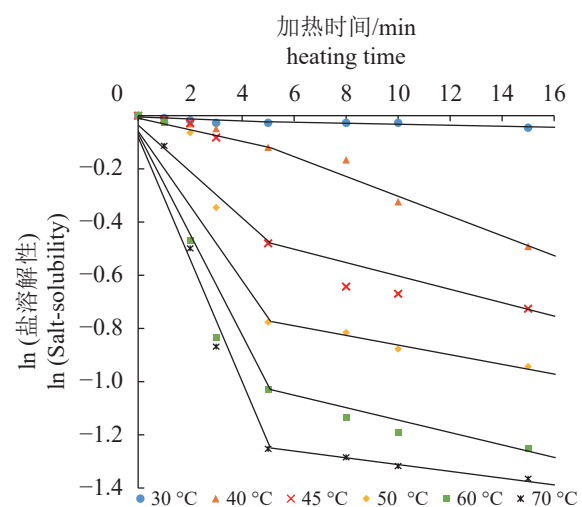


图 5 不同温度加热后 RMP 中蛋白溶解性变化

Fig. 5 Changes in protein salt solubility of RMP after heating at different temperatures

肌中的肌动蛋白和肌球蛋白同时发生变性。为验证两种蛋白同时变性更有利于脱壳的假设, 设定了  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  加热先使肌球蛋白变性, 然后再升温至  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  使肌动蛋白变性的加热方式, 这种加热方式几乎未观察到脱壳现象。而将蛤仔直接采用  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  加热, 使肌球蛋白和肌动蛋白同时变性, 脱壳比例显著增加。初步验证了实验的假设, 但是直接沸水加热依然有部分蛤仔没有发生脱壳, 分析蛤仔的活力状态 (加热前肌肉中 ATP 含量) 可能是影响脱壳发生的另外一个重要因素, 有必要深入研究。

#### 3.2 热处理对菲律宾脱壳状态的影响

菲律宾蛤仔在沸水浴加热后出现 4 种脱壳状态, 脱壳与否可能与闭壳肌的收缩力、闭壳肌和外壳的黏附力有关 [20-21]。肌动蛋白和肌球蛋白之

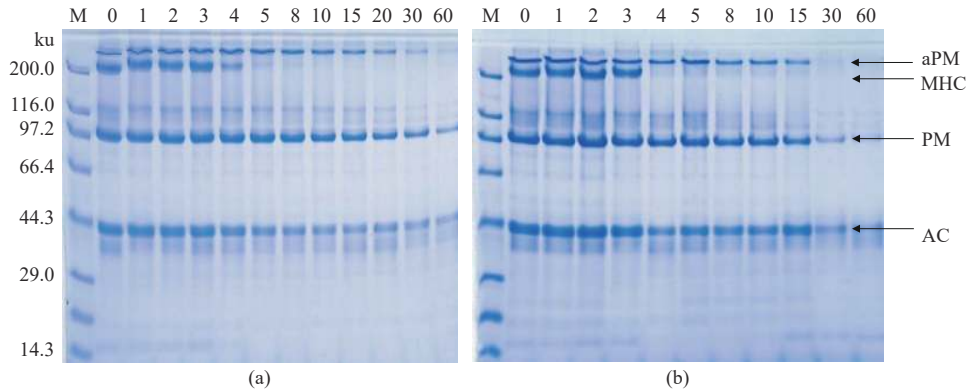


图 6 不同温度加热后 RMP 溶解蛋白组成的 SDS-PAGE

(a) 为 40 °C 条件下加热, (b) 为 45 °C 条件下加热; M. 标准蛋白 Marker, aPM. 副肌球蛋白聚合体, MHC. 肌球蛋白, PM. 副肌球蛋白, AC. 肌动蛋白。

Fig. 6 SDS-PAGE of RMP solubilized protein composition after heating at different temperatures

(a) represents heating at 40 °C, (b) represents heating at 45 °C; M. marker, aPM. aggregated paramyosin, MHC. myosin heavy chain, PM. paramyosin, AC. actin.

间的相对运动是肌肉收缩的分子基础, 该过程需要消耗 ATP。肌球蛋白头部具有 ATP 酶活性, 通过分解 ATP 释放磷酸基团, 消耗能量使肌球蛋白与肌动蛋白解离。此外, 先 60H~100H 和 100H 条件下脱壳情况的差异, 说明快速升温使粗丝蛋白(肌球蛋白、副肌球蛋白)和细丝蛋白(肌动蛋白)同时变性, 更利于脱壳。

### 3.3 热处理对菲律宾蛤仔闭壳肌微观结构的影响

肌纤维由肌膜、肌浆、肌原纤维构成, 肌原纤维是构成肌纤维的主要组成部分<sup>[22]</sup>。加热过程中伴随着水分流失、细胞膜降解、肌浆蛋白聚集、肌原纤维收缩等变化, 从而导致了闭壳肌微观结构的改变。50 和 80 °C 加热均引起了肌纤维的收缩, 但是 80 °C 加热的条件下肌肉收缩更明显。肌节收缩程度更大, 从而更有利于闭壳肌从外壳的分离。肌浆蛋白的热变性温度在 55 °C 左右, 50 °C 以上的温度肌浆蛋白也发生了热变性, Liu 等<sup>[23]</sup>发现变性的肌浆蛋白可以在肌纤维内部和外部形成网格, 缩小晶格空间。此外, 肌膜的构成主要是胶原蛋白, 胶原蛋白的热变性温度为 60~70 °C<sup>[24]</sup>, 胶原蛋白发生热变性后形成溶于水的明胶, 随着水分一起流失到体外, 可能也是肌细胞间隙增大的主要原因。说明加热温度越高, 肌纤维微观结构的完整性被破坏的程度越大<sup>[25-26]</sup>。微观结构变化与 Li 等<sup>[27]</sup>的研究结果相似。

### 3.4 热处理对肌原纤维蛋白理化性质的影响

肌原纤维蛋白是闭壳肌中的主要蛋白, 在参与肌肉收缩过程中需要消耗 ATP, 其中的肌球蛋

白头部具有 ATP 水解酶功能<sup>[28]</sup>。在 0.5 mol/L 的盐浓度下, 肌球蛋白和肌动蛋白处于解离状态, 肌球蛋白热稳定性下降。因此肌原纤维蛋白在更低的 40 °C 已经失活。但是在变性过程中出现的失活速率变慢可能是加热导致的热凝聚行为, 可能促进了肌动蛋白和肌球蛋白的结合, 从而为肌球蛋白提供了保护作用, 从而减缓  $Ca^{2+}$ -ATPase 失活速率。Wang 等<sup>[29]</sup>在对鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 肌动蛋白和肌球蛋白相互关系研究中提出了肌动蛋白对肌球蛋白具有保护作用, 可以提高肌球蛋白热稳定性, 本研究中也验证了该结论。

蛋白质盐溶解性常认为是评价肌球蛋白尾部结构稳定性的重要指标之一。蛋白质变性通常伴随着凝集行为发生, 从而导致蛋白溶解性下降。DSC 结果反映肌球蛋白发生热变性的温度最低, 因此推测在加热 0~5 min 时, 盐溶解性的下降主要是由于肌球蛋白变性引起的。为验证该假设, 对 40 和 45 °C 加热后盐溶解部分的蛋白组成进行了 SDS-PAGE 分析, 的确观察到肌球蛋白条带消失速率最快, 其次是肌动蛋白。而 100 ku 附近的副肌球蛋白的条带具有最高的稳定性。此外, 在前期研究中大于 200 ku 的条带被鉴定为副肌球蛋白聚合体 (aggregated paramyosin)<sup>[30]</sup>。该条带的变化趋势和副肌球蛋白基本一致。有研究认为, 贝类的粗丝以副肌球蛋白为核心<sup>[31]</sup>, 外周缠绕肌球蛋白共同构成粗丝, 也不能排除副肌球蛋白稳定性受到了肌球蛋白的保护。由于肌原纤维蛋白是一个复杂的多种蛋白的复合体, 关于各种蛋白的热稳定性, 有必要分离纯化后进行深入研究。各

种蛋白参与热收缩的分子机制还需要进行更深入的系统研究, 同时还需要分析 ATP 在该过程中的作用, 以揭示闭壳肌热收缩的分子机制, 为生产中菲律宾蛤仔脱壳提供理论依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2023[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 23-27.
- Bureau Ministry of Agriculture Fisheries, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2023 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2023: 23-27 (in Chinese).
- [2] 叶琳弘, 蔡水淋, 吴靖娜, 等. 即食菲律宾蛤仔休闲食品加工工艺研究 [J]. 渔业研究, 2016, 38(5): 363-371.
- Ye L H, Cai S L, Wu J N, *et al.* Study of processing technology for leisure food of ready-to-eat *Ruditapes philippinarum*[J]. Journal of Fisheries Research, 2016, 38(5): 363-371 (in Chinese).
- [3] 单康, 王紫薇, 汤海莲, 等. 蚬子调味休闲食品的研究 [J]. 中国调味品, 2014, 39(9): 87-90, 94.
- Shan K, Wang Z W, Tang H L, *et al.* Study on the flavoring snack food *Corbicula fluminea*[J]. China Condiment, 2014, 39(9): 87-90, 94 (in Chinese).
- [4] 路海霞, 吴靖娜, 许旻, 等. 菲律宾蛤仔调味软罐头的工艺研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(4): 1240-1247.
- Lu H X, Wu J N, Xu M, *et al.* Processing technology of *Ruditapes philippinarum* soft canned products[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(4): 1240-1247 (in Chinese).
- [5] 赵煜, 朱旭, 朱建平, 等. 带壳类水产品的壳肉分离技术研究进展 [J]. 大连海洋大学学报, 2023, 38(6): 1083-1096.
- Zhao Y, Zhu X, Zhu J P, *et al.* Research progress on shell-meat separation technology of shelled aquatic products: a review[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2023, 38(6): 1083-1096 (in Chinese).
- [6] Yoneda C. Extractive components of frozen short-neck clam and state of shell-opening during cooking[J]. Journal of Home Economics of Japan, 2011, 62(6): 361-368.
- [7] 黄雅婷. 超高压预处理对杂色蛤发酵酱品质与安全性的影响 [D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- Huang Y T. Effect of high-pressure pretreatment on quality and safety of fermented *ruditapes philippinarum* sauce[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [8] 巩雪, 常江. 超高压技术在贝类脱壳加工中的应用 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(15): 394-396.
- Gong X, Chang J. Application of ultra high pressure technology in the processing of shellfish shell[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(15): 394-396 (in Chinese).
- [9] 余炼, 颜栋美, 侯金东. 牡蛎微波干燥特性及动力学研究 [J]. 食品科学, 2012, 33(11): 111-115.
- Yu L, Yan D M, Hou J D. Characteristics and kinetics of microwave drying for oyster[J]. Food Science, 2012, 33(11): 111-115 (in Chinese).
- [10] 龙官誉, 柯志刚, 相兴伟, 等. 激光开壳技术对贻贝肉脱壳率和品质的影响研究 [J]. 核农学报, 2023, 37(5): 990-998.
- Long G Y, Ke Z G, Xiang X W, *et al.* Effects of laser shucking technology on shucking rate and quality of mussel meat[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2023, 37(5): 990-998 (in Chinese).
- [11] 欧阳杰, 张军文, 谈佳玉, 等. 贝类开壳技术与装备研究现状及发展趋势 [J]. 肉类研究, 2018, 32(5): 64-68.
- Ouyang J, Zhang J W, Tan J Y, *et al.* Current status and future perspectives of shellfish shucking technology and equipment[J]. Meat Research, 2018, 32(5): 64-68 (in Chinese).
- [12] Clarke M. Muscle sliding filaments: sliding filament model for muscle contraction[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010, 9(S1): 7.
- [13] Caremani M, Fusi L, Linari M, *et al.* Dependence of thick filament structure in relaxed mammalian skeletal muscle on temperature and interfilament spacing[J]. Journal of General Physiology, 2021, 153(3): e202012713.
- [14] 吕学皎. 菲律宾蛤仔蒸煮液多糖的提取、分离鉴定及微胶囊化研究 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2020.
- Lü X J. Extraction, isolation, identification and microencapsulation of polysaccharides from clam (*Ruditapes philippinarum*) cooking liquid[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [15] 饶梦微, 章超桦, 林海生, 等. 菲律宾蛤仔肉不同提取物呈味特性 [J]. 广东海洋大学学报, 2022, 42(1): 90-97.



- Rao M W, Zhang C H, Lin H S, *et al.* Sensory characteristic of different extracts from *Ruditapes philippinarum* [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2022, 42(1): 90-97 (in Chinese).
- [16] 张龙. 菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 的蛋白分布特性 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.
- Zhang L. The distribution profiles of muscle protein from *Ruditapes philippinarum*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [17] 姜明慧, 田元勇, 闫丽新, 等. 冷藏过程中虾夷扇贝横纹肌微观结构变化与肌原纤维蛋白稳定性 [J]. *食品科学*, 2020, 41(21): 175-181.
- Jiang M H, Tian Y Y, Yan L X, *et al.* Microstructure change and myofibrillar protein stability of *Patinopecten yessoensis* striated adductor muscle during chilling storage[J]. *Food Science*, 2020, 41(21): 175-181 (in Chinese).
- [18] 路莘, 于同泉, 王淑英, 等. 蛋白质测定方法评价 [J]. *北京农学院学报*, 2006, 21(2): 65-69.
- Lu P, Yu T Q, Wang S Y, *et al.* A review on determination of protein[J]. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2006, 21(2): 65-69 (in Chinese).
- [19] 吴燕燕, 熊添, 王悦齐, 等. 热处理温度对卵形鲳鲆品质和肌肉蛋白质理化特性的影响 [J]. *广东海洋大学学报*, 2022, 42(6): 1-10.
- Wu Y Y, Xiong T, Wang Y Q, *et al.* Effects of heat treatment temperature on quality and physicochemical properties of muscle protein in *Trachinotus ovatus*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2022, 42(6): 1-10 (in Chinese).
- [20] Iwata K S. Opening mechanism of bivalves by boiling[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1948, 14(2): 82-86.
- [21] 文丽华. 扇贝超高压脱壳机制及有限元分析 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
- Wen L H. High hydrostatic pressure shelling mechanism and finite element analysis of scallop[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [22] 康怀彬, 吴锁链. 烧鸡加工过程中肌肉超微结构的变化 [J]. *食品工业科技*, 2011, 32(9): 181-183.
- Kang H B, Wu S L. Changes of muscle ultra-structure of roast chicken during processing[J] *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32(9): 181-183 (in Chinese).
- [23] Liu J, Arner A, Puolanne E, *et al.* On the water-holding of myofibrils: effect of sarcoplasmic protein denaturation[J]. *Meat Science*, 2016, 119: 32-40.
- [24] 吴燕燕, 熊添, 李来好, 等. 鱼肉蛋白的热变性研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2018, 39(5): 343-347.
- Wu Y Y, Xiong T, Li L H, *et al.* A review of studies on thermal denaturation of fish protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(5): 343-347 (in Chinese).
- [25] Gao Y, Qiao S Y, Lin Y W, *et al.* Effects of high-humidity hot air impingement cooking on physicochemical properties and microstructure of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*)[J]. *LWT*, 2023, 182: 114836.
- [26] 郑文雄, 杨榕琳, 水珊珊, 等. 热加工对 3 种带鱼肌球蛋白功能特性的影响 [J]. *食品科学*, 2024, 45(7): 211-217.
- Zheng W X, Yang R L, Shui S S, *et al.* Effect of heat processing on the functional properties of myosin in three kinds of hairtail[J]. *Food Science*, 2024, 45(7): 211-217 (in Chinese).
- [27] Li C, Wang D Y, Xu W M, *et al.* Effect of final cooked temperature on tenderness, protein solubility and microstructure of duck breast muscle[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, 51(1): 266-274.
- [28] 齐琳, 刘悦朋, 蔡琰, 等. 杂交河鲀与红鳍东方鲀肌肉质构及肌原纤维蛋白生化特性比较 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(2): 18-24.
- Qi L, Liu Y P, Cai Y, *et al.* Comparison of muscle structure and biochemical characteristics of myofibrillar protein in hybrid pufferfish and *Takifugu rubripes*[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2023, 14(2): 18-24 (in Chinese).
- [29] Wang Z L, Niu Y B, Zhao S Z, *et al.* Thermal stability of actin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) harvested in summer and winter as affected by myosin complexation[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022, 46(11): e17003.
- [30] 宋扬. 贝类肌肉副肌球蛋白的分布及理化性质 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2018.
- Song Y. Paramyosin distribution of mollusks muscle protein in different commercial species[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [31] Squire J M, Paul D M, Morris E P. Myosin and actin filaments in muscle: structures and interactions[M]//Parry D A D, Squire J M. *Fibrous proteins: structures and mechanisms*. Cham: Springer, 2017, 82: 319-371.

## Correlation analysis between the thermal denaturation of myofibrillar proteins and adductor muscle shelling in *Ruditapes philippinarum*

ZHI Huimin<sup>1</sup>, LI Yang<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, DONG Hanyu<sup>1</sup>, LU Hang<sup>1</sup>,  
ZHAO Hui<sup>1</sup>, JIANG Yusheng<sup>2</sup>, TIAN Yuanyong<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Dalian Key Laboratory of Breeding, Reproduction and Aquaculture of Crustaceans,  
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Frozen-cooked product is a common product form of *Ruditapes philippinarum*, with heating shelling being a key processing technique. The basic principle of heating shelling relies on thermal contraction of the adductor muscle to separate the meat from the shell. Temperature is one of the crucial factors significantly affecting the protein in the adductor muscles of *R. philippinarum*. To investigate the correlation between adductor muscles decalcification and thermal denaturation of myofibrillar proteins in *R. philippinarum* following heat treatment, the thermal denaturation behavior of adductor muscle protein was initially investigated using a differential scanning calorimeter (DSC). Subsequently, the impact of heating on the microstructure of adductor muscles was observed using optical and electron microscopy. Additionally, the thermal denaturation pattern of myofibrillar proteins was examined using  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity, salt solubility, and SDS-PAGE as indicators. The results showed that the DSC analysis of fresh adductor muscle revealed three absorption peaks at temperatures of 50, 60 and 78 °C. After heating for 5 minutes, the absorption peaks at 50 °C and 80 °C were no longer detectable, suggesting they likely correspond to the thermal denaturation of myosin and actin, respectively. Following boiling treatment, the adductor muscle fibers in *R. philippinarum* demonstrated lateral aggregation and longitudinal contraction. This morphological change resulted in varying degrees of separation between the muscle and shell due to differential contraction rates. A specific heating regimen for myofibrillar proteins (0.5 mol/L NaCl at 45 °C for 5 min) led to a marked decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and salt solubility, indicating myosin thermal denaturation. Additionally, actin played a significant protective role over myosin before denaturation. The simultaneous denaturation of myosin, actin, and tropomyosin, which contributed to the facilitation of shelling. This study provided a scientific basis and data support for further developing processing techniques for *R. philippinarum*.

**Key words:** *Ruditapes philippinarum*; heat treatment; microstructure; myofibrillar protein

**Corresponding author:** TIAN Yuanyong. E-mail: [tianyuanyong@foxmail.com](mailto:tianyuanyong@foxmail.com)

**Funding projects:** National Key Research and Development Program of China (2022YFE0117900)