



虾夷扇贝肌原纤维蛋白热稳定性的季节性差异

张 晴, 田元勇, 姜明慧, 刘俊荣*

(大连海洋大学食品科学与工程学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 为探究虾夷扇贝原料特性的季节性差异, 分别对春(4月)、夏(7月)、秋(10月)和冬(1月)产鲜活虾夷扇贝的商品属性及闭壳肌 ATP 和 ATPase 分布进行了分析比较; 以肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, Mf)Ca²⁺ATPase 活性为检测指标, 重点探索闭壳肌蛋白热稳定性的季节性差异, 并对闭壳肌 2 种肌肉即横纹肌和平滑肌的蛋白热稳定性做了对比分析。结果显示, 春季虾夷扇贝最肥满, 生殖腺占总重的比率高达 6.96%, 其他 3 个季节仅为 1.79%~2.95%。主要可食部位闭壳肌的蛋白质、脂肪和 ATP 的含量季节性差异不明显, 闭壳肌富含蛋白质, 含量占干基的 75%~80%, 脂肪含量很低, 仅为 0.63%~1.00%; 值得关注的是, 在春、夏 2 个季节闭壳肌总糖含量分别为 11.14% 和 13.84%, 显著高于秋、冬 2 季, 而冬季含量最低, 仅为 2.67%。横纹肌 ATP 含量在各个季节都高于平滑肌, 二者分别为 4.3~5.0 μmol/g 和 1.2~1.6 μmol/g。横纹肌与平滑肌的 ATP 及其关联物含量的季节性差异均不明显。此外, 横纹肌与平滑肌具有相似的热稳定性, 在 30 和 35 °C 下加热 30 min 后, Mf-Ca²⁺ATPase 活性均未有显著变化; 而 40 °C 加热下, Mf-Ca²⁺ATPase 活性开始降低, 45 °C 时酶活性下降加剧, 50 °C 加热 10 min 内, 二者的 Mf-Ca²⁺ATPase 活性均丧失殆尽。春季虾夷扇贝的肌肉蛋白热稳定性最差, 其横纹肌与平滑肌 Mf-Ca²⁺ATPase 易于失活, 且横纹肌失活速率略高于平滑肌; 秋、冬和夏季则差异不大。研究还发现, 闭壳肌肌肉 Mf 存在 2 种热变性速率, 推测在虾夷扇贝闭壳肌蛋白中具有 2 种稳定性不同的肌球蛋白, 需进一步分析。

关键词: 虾夷扇贝; 肌原纤维蛋白; 热稳定性; 季节差异

中图分类号: S 917.4; TS 254.1

文献标志码: A

虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 具有很高的经济价值, 目前主要养殖在我国辽宁大连、山东威海和青岛等沿海城市。虾夷扇贝主要以活品形式进行流通及销售, 从食品原料学角度出发, 产区及气候环境等差异对虾夷扇贝食用品质的影响至关重要, 其中季节对扇贝活品品质及贮藏条件的影响值得深入探索。

虾夷扇贝是海洋冷水性软体动物, 对生活环境要求严苛, 最适生存水温为 5.0~20.0 °C, 繁

殖期水温为 5.0~6.8 °C。从生长繁殖周期来看, 根据大连塔河湾海区和黄海北部养殖虾夷扇贝的性腺发育和繁殖规律, 将虾夷扇贝的性腺发育分为 5 个时期, 其中 11—12 月为增殖期, 1—2 月为生长期, 3 月为成熟期, 4—5 月为排放期, 6—10 月为休止期^[1-2]。有关原料品质季节性差异的研究报道涉及到不同水产品种, 不同季节墨西哥的太平洋狮爪扇贝 (*Nodipecten subnodosus*) 肌肉的碳水化合物、肌肉重量、颜色、亮度、pH、

收稿日期: 2019-09-08 修回日期: 2020-02-27

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901001); 国家自然科学基金(31671790)

通信作者: 刘俊荣, E-mail: ljunrong@dlo.edu.cn

持水率、氨基酸含量、蛋白和脂类等指标均有差异^[3]。有关鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)的季节性差异研究发现,鲢肌肉蛋白的热凝胶特性在夏、秋和冬、春显示出不一样的凝胶形成能力^[4];且肌球蛋白的热稳定性存在明显的季节性差异,并推测出鲢肌肉中存在2种类型的肌球蛋白,即稳定型和不稳定型,在夏季只有稳定型肌球蛋白存在,冬季只有不稳定型肌球蛋白存在,在春、秋季2种肌球蛋白均存在^[5]。对于上述2种肌球蛋白存在的假设也在后来的研究中得到了证实,并发现2种肌球蛋白的轻酶解肌球蛋白重链(light meromyosin, LMM)稳定性差异不大,而S-2区域稳定性差异较大^[6-8]。此外,在对不同季节草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肌肉蛋白热稳定性的研究中发现, Ca^{2+} -ATPase 活性具有夏>春>秋>冬的特性^[9]。目前为止,季节变化对活品虾夷扇贝食用品质特别是肌肉蛋白稳定性的影响还未有研究报道。

肌球蛋白的活性直接影响肌肉的品质。肌球蛋白头部具有ATPase活性,在 Ca^{2+} 的存在下能够促进ATP降解并释放能量,用于肌丝滑动引起肌肉收缩^[10],因此,在肌肉蛋白质研究时常以 Ca^{2+} -ATPase 活性作为监测蛋白稳定性的指标^[11]。本研究以活品虾夷扇贝闭壳肌蛋白为对象,以 Ca^{2+} -ATPase 的变化为热稳定性评价指标,探究在春季(4月)、夏季(7月)、秋季(10月)和冬季(1月)虾夷扇贝肌肉蛋白的热稳定性变化,为探明活品虾夷扇贝品质变化机制季节性差异,

对捕后品控措施的实施具有理论参考与实践指导双重意义。

1 材料与方法

1.1 样本及处理

实验用虾夷扇贝均为大连獐子岛集团股份有限公司底播养殖虾夷扇贝,长10.09~10.69 cm,高10.21~11.10 cm,宽2.33~2.71 cm,体质量118.57~143.21 g(图1-a),为中号商品规格的健康活体,前1天采捕上岸,经净化基地净化后冷藏运输至实验室。采样时间分别为2018年4月、7月、10月和2019年1月,每月取样3次,每次取10只,对扇贝长、宽、高和各组织重量进行测定,取20只进行生化测试。

采集活贝样本后进行拍照记录,用游标卡尺记录虾夷扇贝的长、宽和高;随后立即开壳速杀处理,手工分离后获取各解剖组织(依次为壳、闭壳肌、外套膜、生殖腺、体腔液及其他软体组织)并称量(图1-b),将各分离的软体组织分别匀浆后迅速置于-40℃冻藏待测。虾夷扇贝闭壳肌中具有2种类型的肌肉,即横纹肌与平滑肌(图1-c),分别用于ATP及蛋白热稳定性分析,将2种肌肉组织分离后立即进行蛋白分析检测。所有操作需在冰浴下完成。

1.2 实验仪器与试剂

实验仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); TMK-1K 恒温水浴锅(日本

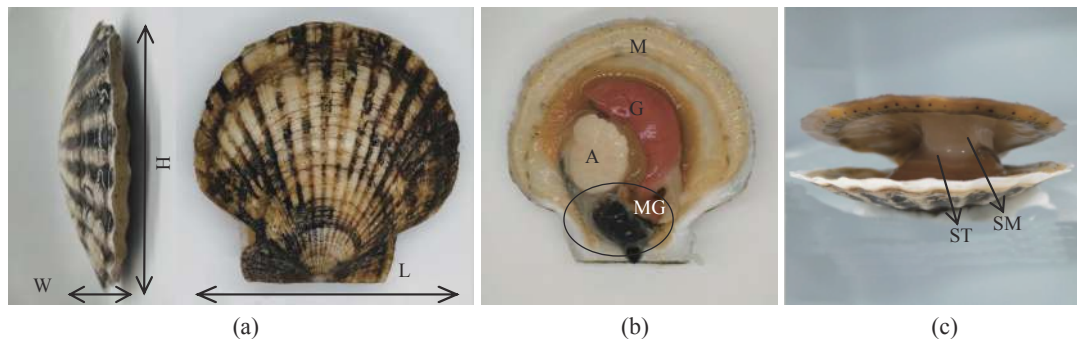


图1 虾夷扇贝基本组织形态特性

(a) 虾夷扇贝的长宽高测定, (b) 虾夷扇贝软体部位解剖图, (c) 闭壳肌2种肌肉类型; W. 宽, H. 高, L. 长, A. 闭壳肌, M. 外套膜, G. 生殖腺, MG. 中肠腺, ST. 横纹肌, SM. 平滑肌

Fig. 1 Morphological characteristics of *P. yessoensis*

(a) width, height and length of *P. yessoensis*, (b) anatomy of soft part of *P. yessoensis*, (c) two types of adductor muscle; W. width, H. height, L. length A. adductor muscle, M. mantle, G. gonad, MG. mid-gut gland, ST. striated muscle, SM. smooth muscle

亚速旺株式会社); Synergy™ H4 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); ims-25 全自动雪花制冰机(常熟市雪科电器有限公司); Lambda 25 紫外可见分光光度计(珀金埃尔默仪器有限公司); microsmart 离心机(北京昊诺斯科技有限公司); 101-1 型电热鼓风干燥机(上海实验仪器厂有限公司)。

实验试剂 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(国药集团化学试剂有限公司); 高氯酸(PCA)、HCl、氯化钠、氯化钙、苯酚、硼酸、氢氧化钾、硫酸(天津市科密欧化学试剂有限公司); 钼酸铵、米吐尔(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); ATP 二钠(北京索莱宝科技有限公司); 甲醇(美国 Sigma 公司)。其中除了氢氧化钾(优级纯)和甲醇(色谱纯)外均为分析纯。

1.3 肌原纤维蛋白提取

分别切碎横纹肌与平滑肌。首先用缓冲溶液(0.05 mol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)对碎肉进行漂洗, 碎肉与缓冲液的比例为 1:10, 搅匀后离心(3 000×g, 10 min)得沉淀物, 再次加入等量缓冲溶液搅匀后离心, 重复 3 次后进行 3 次均质(10 000 r/min, 30 s), 再次进行离心处理, 并重复 3 次, 取最终沉淀加入适量缓冲液混合均匀, 过双层纱布即得到肌原纤维蛋白^[12]。用双缩脲比色法对肌原纤维蛋白的浓度进行测定, 并按照需要用缓冲液稀释蛋白至相应浓度。

1.4 肌肉蛋白 ATPase 活性

钼酸铵标曲 活性测定的方法为钼酸铵比色法。钼酸铵标曲采用磷酸二氢钾来提供 Pi, 磷酸根的浓度梯度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L, 取 0.5 mL 混合液加入 1.75 mL 钼酸铵和 0.25 mL elon 混合后发色 45 min, 使用酶标仪于 640 nm 波长下测吸光度值, 以磷酸根浓度为横坐标做磷酸根与吸光度值的标准曲线, 公式进行换算后得到最终标曲为 $y=0.348x$ 。

Ca²⁺-ATPase 设定含有 Ca²⁺的反应体系[包含 2 mmol/L ATP、5 mmol/L CaCl₂、25 mmol/L Tris-马来酸(pH 7.0)和 0.5 mol/L CaCl₂], 其中以 ATP 为底物, 用钼酸铵比色法分析蛋白分解 ATP 所产生的无机磷(Pi)的量, 进而比较蛋白的活性。反应温度为 20 °C, 反应时间为 15 min, 反应结束后取出 1 mL 加入到含有 0.5 mL 15% 的高氯酸(PCA)中终止反应, 离心(10 000×g, 5 min)

取 0.5 mL 上清液, 加入 1.75 mL 钼酸铵和 0.25 mL elon 混合均匀并静置 45 min 进行发色, 使用酶标仪于 640 nm 波长下测吸光度值, 根据钼酸铵标准曲线计算出酶活性。

1.5 肌肉蛋白热稳定性

将提取出的肌原纤维蛋白溶液分别在 30、35、40、45 和 50 °C 水浴锅中进行加热, 横纹肌蛋白浓度为 1 mg/mL, 平滑肌蛋白浓度为 4 mg/mL, 加热时间为 0、2、5、10、15、20、25 和 30 min, 加热后立即放入冰水浴中冷却 5 min, 再进行 Ca²⁺ATPase 活性测定。Ca²⁺ATPase 活性测定时间为 15 min, 温度为 20 °C, 用钼酸铵比色法分析蛋白分解 ATP 所产生的无机磷的量, 进而比较蛋白的活性。

1.6 ATP 及其关联物

ATP 及其关联物含量的测定参照刘慧慧等^[13]的方法, 准确称取 1 g 肌肉样品, 加入 10 mL 5% 的 PCA 立即进行组织捣碎 10 min, 使用 2 mol/L KOH 调节 pH 至 2~3.5, 加水补体积至 20 mL, 离心(3 000×g, 5 min), 取 4 mL 上清液过膜后加入 1 mL 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.5), 用反相高效液相色谱法测定 ATP 含量。以每个独立活体扇贝为一个样本。

1.7 一般化学组成

样品在 4 °C 下解冻后进行一般化学组成的测定。采用国标提供的方法测定水分(GB 5009.3—2016 第一法直接干燥法)、灰分(GB 5009.4—2016 第一法食品中总灰分的测定)、粗蛋白质(GB 5009.5—2—16 第一法凯氏定氮法)和粗脂肪(GB 5009.6—2016 第一法索氏抽提法)。

1.8 统计分析

采用 SPSS 软件对组间差异进行单因素方差分析, 显著性水平设为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 虾夷扇贝原料学基本属性的季节性差异

肥满度的季节性差异 分别对春(4月)、夏(7月)、秋(10月)和冬(1月)4个季节虾夷扇贝的肥满程度进行比较, 结果显示, 春季虾夷扇贝处于生殖腺的成熟期和排放期, 雌、雄生

殖腺均较为饱满,占扇贝总重的6.96%,雌性生殖腺呈粉红色月牙型,雄性生殖腺呈乳白色月牙型;至于夏季和秋季,因扇贝处于休止期,生殖腺仅占总重的2.12%和1.79%,此时生殖腺呈透明状,雌雄不易分辨;到了冬季,虾夷扇贝进入下一个发育周期,生殖腺逐渐增长,占到总重的2.95%(图2)。除了生殖腺外,闭壳肌和体腔液的比重也有一定差异,处于休止期的扇贝闭壳肌所占比率会更大,而体腔液在夏季最低,这与气候环境和扇贝生命状态有关(表1)。

化学组成的季节性差异 虾夷扇贝闭壳肌富含蛋白质,含量占干基的63%~75%,脂肪含量很低,仅为0.63%~1.00%,4个季节比较,均无显著差异,但是其中值得关注的是,在春、夏2个季节闭壳肌总糖含量显著高于秋、冬2季,分别为11.14%和13.84%,且冬季含量最低,仅为2.67%(表2)。

2.2 肌肉蛋白热稳定性季节差异

横纹肌与平滑肌的差异 由于样本全部为健康活体,因此ATP、ADP和AMP的核苷酸

降解产物均未检出。从ATP含量来看,横纹肌与平滑肌ATP含量均无显著季节性差异;横纹肌核苷酸总量无季节性差异,而平滑肌的核苷酸总量在夏季显著高于其他季节。无论是ATP含量还是核苷酸总量,横纹肌一直高于平滑肌,二者ATP值分别为4.3~5.0 μmol/g和1.2~1.6 μmol/g,核苷酸总量分别为5.06~5.94 μmol/g和2.31~3.08 μmol/g(图3)。有研究表明,日本养殖虾夷扇贝捕后闭壳肌ATP含量高达8.1 μmol/g,在采捕净化后的ATP含量仍可达到7.5 μmol/g,对于不同养殖产地的虾夷扇贝,生命活力存在一定差异^[14-15]。

从核苷酸降解产物分布来看,横纹肌与平滑肌的ATP降解特性存在明显差异。横纹肌ADP和AMP积累量相对ATP含量较少,仅占核苷酸总量的14%~17%;而平滑肌呈现十分明显的降解特性,ADP和AMP积累量占核苷酸的总量高达39%~52%,其中ADP为主导降解产物达核苷酸总量的28%~32%。

ATP、ADP及AMP均参与调解软体动物特有的肌肉收缩状态“catch”,平滑肌与横纹肌

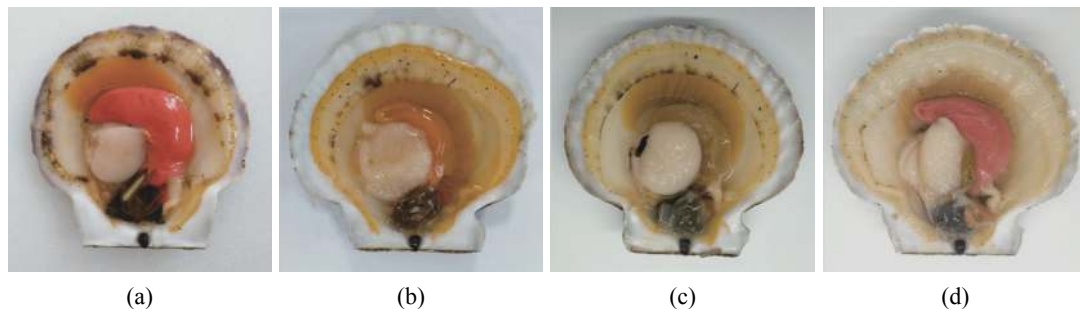


图2 虾夷扇贝组织特性季节差异

(a) 2018年4月,春季;(b) 2018年7月,夏季;(c) 2018年10月,秋季;(d) 2019年1月,冬季

Fig. 2 Seasonal changes of tissue characteristics of *P. yessoensis*

(a) April 2018, spring; (b) July 2018, summer; (c) October 2018, autumn; (d) January 2019, winter

表1 虾夷扇贝各组织重量百分比的季节性差异

Tab. 1 Seasonal changes of anatomical weight composition of *P. yessoensis*

季节 season	壳 shell	闭壳肌 adductor muscle	外套膜 mantle	体腔液 mantle cavity fluid	生殖腺 gonad	%
2018-01 (winter)	51.34±0.14 ^a	7.99±0.38 ^b	7.66±0.35 ^a	12.61±2.48 ^a	2.95±0.28 ^b	
2018-04 (spring)	48.59±3.94 ^a	9.78±0.93 ^b	7.19±0.59 ^a	11.95±2.89 ^a	6.94±0.87 ^a	
2018-07 (summer)	54.18±1.20 ^a	12.95±1.16 ^a	7.43±0.71 ^a	9.50±1.90 ^a	2.11±0.22 ^b	
2018-10 (autumn)	54.96±0.22 ^a	10.68±1.50 ^{ab}	6.58±0.28 ^a	14.95±1.73 ^a	1.77±0.28 ^b	

注: 同列不同字母为不同季节之间差异显著($n=3$, $P<0.05$); 下同

Notes: column values with the different superscripts mean significant difference ($n=3$, $P<0.05$); the same below

表 2 虾夷扇贝闭壳肌一般化学组成季节性差异
Tab. 2 Seasonal changes of proximate compositions of adductor muscle of *P. yessoensis* g/100 g

季节 season	干/湿基 wet/dry basis	水分 moisture	蛋白 protein	总糖 total sugars	脂肪 fat	灰分 ash
春(4月) spring (Apr.)	W	75.24±1.22 ^b	16.53±0.44	2.77±0.42	0.16±0.03	2.46±0.14
	D		67.03±5.23 ^b	11.14±1.31 ^a	0.63±0.11 ^a	9.93±0.33 ^b
夏(7月) summer (July)	W	76.12±0.44 ^b	15.20±0.58	3.31±0.59	0.17±0.01	2.22±0.05
	D		63.64±1.38 ^b	13.84±2.20 ^a	0.70±0.03 ^a	9.29±0.22 ^b
秋(10月) autumn (Oct.)	W	77.64±1.13 ^b	14.35±1.14	1.45±0.38	0.23±0.08	2.44±0.09
	D		64.12±2.04 ^b	6.45±1.21 ^b	1.00±0.29 ^a	10.96±0.97 ^{ab}
冬(1月) winter (Jan.)	W	79.90±0.88 ^a	14.95±0.19	0.54±0.02	0.14±0.02	2.53±0.17
	D		74.49±2.87 ^a	2.67±0.17 ^c	0.70±0.05 ^a	12.62±1.13 ^a

注: W. 以湿基计, D. 以干基计

Notes: W. wet basis, D. dry basis

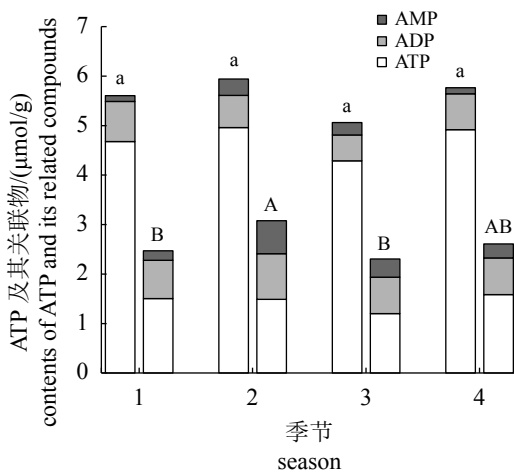


图 3 虾夷扇贝横纹肌与平滑肌 ATP 关联物分布及季节性差异

每组中左边柱子为横纹肌, 右边柱子为平滑肌; 小写字母与大写字母分别为不同季节横纹肌与平滑肌核苷酸总量差异显著性 ($n=9$, $P<0.05$); 1. 春季, 2. 夏季, 3. 秋季, 4. 冬季

Fig. 3 Distributions and seasonal changes of ATP-related compounds in striated muscle and smooth muscle of *P. yessoensis*

The left column is striated muscle and the right column is smooth muscle in each group; different letters within striated muscle or smooth muscle indicate significant differences ($n=9$, $P<0.05$); 1. spring, 2. summer, 3. autumn, 4. winter

ADP 和 AMP 积累量的差异可能与 2 种肌肉调解的模式不同有关^[16]。横纹肌控制活体运动, 需要消耗的能量大; 而平滑肌主要与“catch”状态有关, 在较少能量的消耗下就能维持肌肉紧张状态, 以此调解贝体的长期闭合状态^[16-17]。

通过 4 个季节虾夷扇贝横纹肌和平滑肌肌

肉 Mf 蛋白热稳定性分析结果, 可以看出对于横纹肌与平滑肌在 4 个季节呈现的温度特征相似 (图 4)。横纹肌与平滑肌 Mf 在 30 和 35 °C 时均较稳定, 对肌原纤维蛋白进行 30 min 的加热, 酶活性变化并不显著, 而在 40 °C 之后热稳定性开始发生变化; 加热至 50 °C 时, 肌球蛋白快速失活, 失活时间不超过 10 min。横纹肌与平滑肌 Mf 蛋白在各个变性温度上均无显著季节差异, 在 0.05 mol/L NaCl 体系中, Mf 加热 30 min, 蛋白仍能保持较好的活性。

热稳定性的季节性差异 分别比较 4 个季节虾夷扇贝横纹肌与平滑肌 Mf 在 45 °C 加热 30 min 后热稳定性的差异 (图 5)。春季扇贝的肌肉蛋白呈现明显的不稳定性, 横纹肌和平滑肌中的 Mf 变性率最快, 二者的 Mf-ATPase 失活速率均显著高于其他 3 个季节, 且横纹肌 Mf 失活速率高于平滑肌。此外, 横纹肌中 Mf 在夏季最稳定, 其次是冬季和秋季; 在平滑肌中冬季 Mf 较稳定, 夏季和秋季变性差异不大。此外, 各季节及不同肌肉组织的蛋白热稳定性失活速率有所差异, 于 5 min 左右出现拐点。经初始阶段的快速失活后变性速率趋缓。

3 讨论

3.1 虾夷扇贝横纹肌与平滑肌 ATP 关联物分布

不同季节虾夷扇贝在运达实验室后生命状态差异不大, 并且仍能保持较好的生命活性。但是从核苷酸降解产物分布来看, 横纹肌与平滑肌的 ATP 降解特性存在明显差异。横纹肌

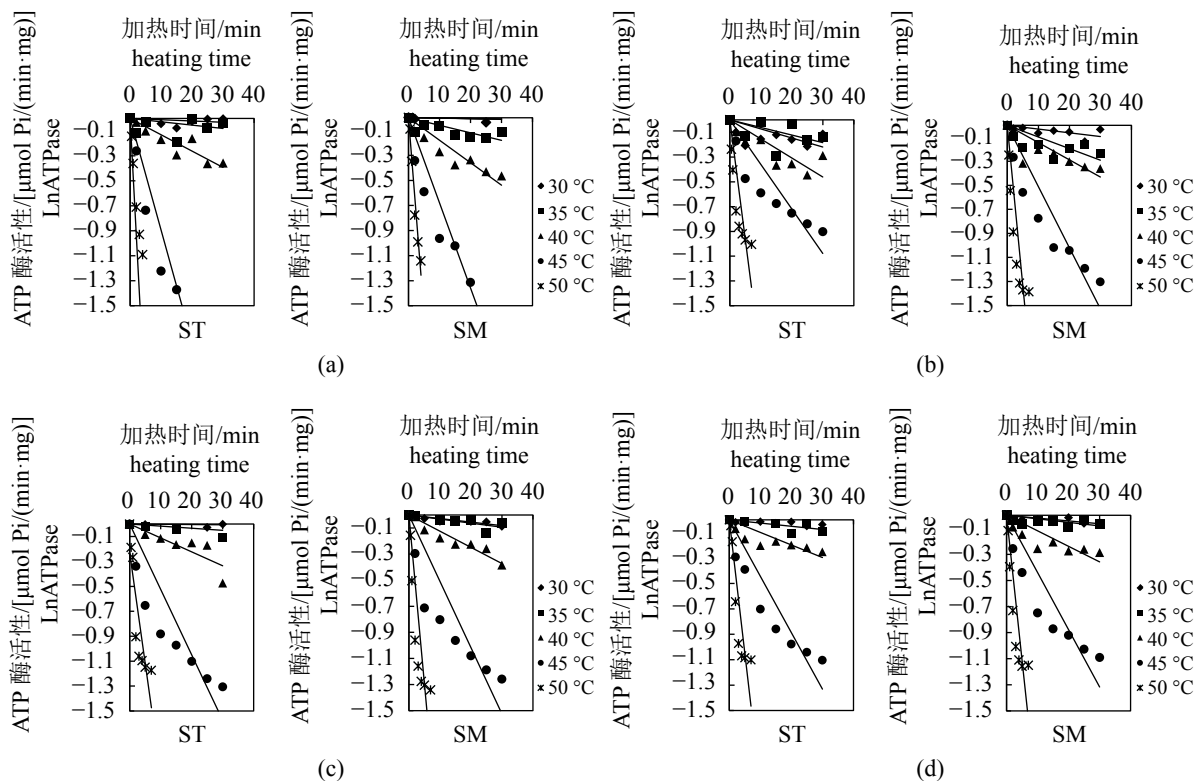


图 4 虾夷扇贝横纹肌与平滑肌 Mf 在不同温度下的热稳定性

(a) 春季, (b) 夏季, (c) 秋季, (d) 冬季; ST: 横纹肌, SM: 平滑肌

Fig. 4 Thermal stability at different temperatures of Mf in striated and smooth muscles of *P. yessoensis*

(a) spring, (b) summer, (c) autumn, (d) winter; ST: striated muscle, SM: smooth muscle

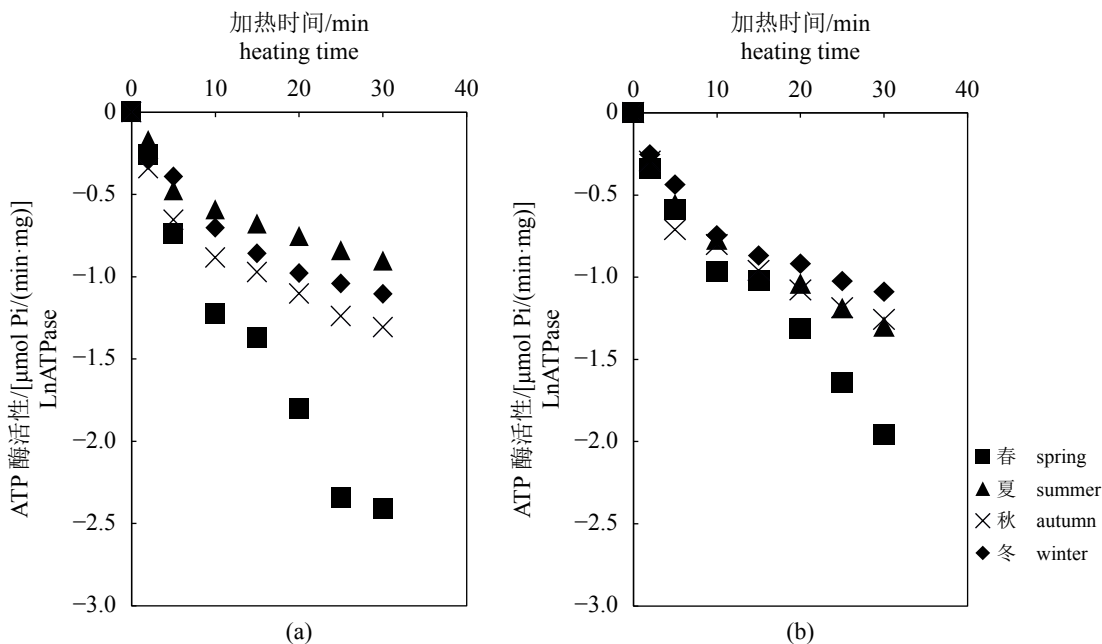


图 5 虾夷扇贝横纹肌与平滑肌 Mf 在 45 °C 下热稳定性季节差异

(a) 横纹肌, (b) 平滑肌

Fig. 5 Seasonal changes of thermal stability at 45 °C of Mf in striated and smooth muscles of *P. yessoensis*

(a) striated muscle, (b) smooth muscle

ADP 和 AMP 积累量相对 ATP 含量较少, 而平滑肌呈现十分明显的降解特性。平滑肌和横纹肌在扇贝闭壳肌中具有特殊的生理功能。ATP、ADP 及 AMP 均参与调解软体动物特有的肌肉收缩状态“catch”, 平滑肌与横纹肌 ADP 和 AMP 积累量的差异可能与 2 种肌肉调解的模式不同有关。横纹肌控制活体运动需要消耗的能量大; 而平滑肌主要与“catch”状态有关, 在较少的能量消耗下就能维持肌肉紧张状态, 并以此调解贝体的长期闭合状态。因此, 横纹肌与平滑肌所表现出的 ATP 及其关联物差异性应与肌肉生理功能特性有关。

3.2 虾夷扇贝横纹肌与平滑肌热稳定性差异

横纹肌与平滑肌 Mf 在 40 °C 加热之后热稳定性开始发生变化, 在对蛋白的加热温度达到 50 °C 时, 肌球蛋白快速失活, 说明虾夷扇贝 Mf 的热稳定性较好, 对温度的耐受能力强。Hideo 等^[18] 研究发现, 扇贝平滑肌的热稳定性要高于横纹肌, 在本研究中对不同季节 45 °C 热处理下的横纹肌与平滑肌热稳定性进行对比分析发现, 横纹肌 Mf 失活速率高于平滑肌。此前, 针对虾夷扇贝 2 种类型肌肉的蛋白即横纹肌与平滑肌特性研究表明, 横纹肌与平滑肌具有相似的蛋白组分, 均含有肌球蛋白、肌动蛋白、原肌球蛋白、肌钙蛋白和副肌球蛋白。但是, 二者在蛋白组分方面存在明显的差异, 横纹肌中肌球蛋白含量远远高于平滑肌, 分别为 30.50% 与 17.60%; 平滑肌则比横纹肌更加富含副肌球蛋白, 二者分别为 31.15% 与 11.53%^[19-20]。此外, 平滑肌还具有独特的“Myorod”蛋白, 这种蛋白在菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 的平滑闭壳肌中也有发现^[21]。

3.3 虾夷扇贝热稳定性的季节性差异

春季虾夷扇贝的肌肉蛋白呈现明显的不稳定性, 其在夏季最稳定, 其次是冬季和秋季。在对冷水与温水驯养的鲤 (*Cyprinus carpio*) 蛋白研究中发现, 不同水温下鲤肌肉中肌球蛋白的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase 活性性质存在差异, 热稳定性结果显示, 冷水驯养的鲤体内 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase 失活速率是温水驯养鱼的 4 倍^[22]。也有研究表明水温和鱼种类均会影响蛋白的热稳定性^[23], 本研究不同季节虾夷扇贝蛋白热稳定性也存在差

异, 这种差异可能受水温影响, 但是与鲤有些许不同, 这与物种差异密不可分。值得关注的是, 春季虾夷扇贝肥满度最高, 鉴于蛋白热稳定性较差, 采取有季节针对性的捕后管理措施, 以最大限度保存扇贝活力状态对于提高活品品质十分重要。

本研究中, 发现各季节及不同肌肉组织的蛋白热稳定性失活速率有所差异。吴忠等^[24] 对比分析了虾夷扇贝闭壳肌与外套膜在温度为 20~40 °C 的热稳定性, 发现在 30~40 °C 时稳定性变化明显, 但并未出现明显拐点; 本研究中, 在 40~50 °C 条件下蛋白出现明显变性 (图 4), 可见虾夷扇贝对温度敏感, 温度及加热时间等条件可能会对结果造成影响。值得借鉴的是, 不同季节淡水鱼肌肉蛋白热稳定性曲线出现拐点。Yuan 等^[6] 在不同季节鲢蛋白热稳定性的研究中发现, 鲢的肌肉蛋白在春季和秋季出现拐点, 作者分析鲢肌肉存在 2 种不同类型的肌球蛋白, 分别为夏季模式和冬季模式, 夏季模式的肌球蛋白相对稳定, 冬季模式的肌球蛋白稳定性较差, 期间还有 2 种类型的肌球蛋白共存现象, 但 2 种肌球蛋白比例不同, 推测鲢的 2 种肌球蛋白可以相互转化^[5,7], 其作者在后续研究中证实了这个推测, 发现夏季模式和冬季模式肌球蛋白的 S1 部分分子量不同, 质谱分析结果进一步确定了 2 种类型肌球蛋白 S1 确实存在差异, 在蛋白转换季节存在 2 种类型的肌球蛋白^[8]。

如果存在不同类型肌球蛋白, 加热初始阶段, 蛋白体系中的 ATPase 快速失活, 稳定性较差的肌球蛋白首先丧失活性, 之后的蛋白失活速率主要归于稳定型的肌球蛋白, 伴随着热变性曲线斜率发生变化而出现拐点。根据 Hooper 等^[25] 的报道, 某些无脊椎动物肌肉往往具有 2 种特殊性, 即 catch 夹持机制和异步肌 (asynchronous muscle) 的分布特性。无脊椎动物的细丝与脊椎动物的细丝相似, 但在螺旋结构和原肌球蛋白排列中仍显示出些许的差异, 而粗丝则具有很大的差异, 这种差异一部分来源于副肌球蛋白含量的变化, 其增加了无脊椎动物粗丝的直径; 另一个原因是肌丝骨架结构变化导致的肌球蛋白头部安置发生变化。上述脊椎动物与软体动物肌肉组分及结构功能的差异会影响蛋白的稳定性。因此, 对于虾夷扇贝收缩蛋白构性在不同季节呈现出的代谢表达机制需要进行深入的

研究。值得指出的是, 虾夷扇贝为冷水海洋无脊椎软体动物, 鲢则属于温暖淡水脊椎动物, 2种类型动物的肌肉蛋白显然具有天然差异。因此, 虾夷扇贝肌肉是否也存在肌球蛋白类型的季节性差异则需要进一步探索。

4 结论

虾夷扇贝在肥满度、总糖含量及闭壳肌蛋白热稳定性上均存在季节性差异。春季虾夷扇贝最为肥满, 并且总糖含量相对更高, 但是闭壳肌蛋白热稳定性较差; 闭壳肌肌肉 ATP 含量、蛋白质及脂肪含量无显著性季节差异; 对比横纹肌与平滑肌发现, 横纹肌 ATP 含量高于平滑肌, 但是横纹肌蛋白热稳定性相对较差。因此, 采取有季节针对性的捕后管理措施以最大限度保存扇贝活力状态, 对于提高活品品质十分重要。

参考文献 (References):

- [1] 高悦勉, 田斌, 于永刚, 等. 大连塔河湾海区虾夷扇贝的性腺发育与繁殖规律[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(5): 335-339.
- Gao Y M, Tian B, Yu Y G, *et al.* The gonadal development and reproductive cycle of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* in Tahe Bay in Dalian[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(5): 335-339(in Chinese).
- [2] 李文姬, 滕炜鸣, 王笑月, 等. 黄海北部虾夷扇贝性腺发育及繁殖规律研究[J]. 水产科学, 2012, 31(12): 703-707.
- Li W J, Teng W M, Wang X Y, *et al.* The gonadal development and life cycle in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* in northern Yellow Sea[J]. Fisheries Science, 2012, 31(12): 703-707(in Chinese).
- [3] Beltrán-Lugo A I, Maeda-Martínez A N, Pacheco-Aguilar R, *et al.* Seasonal variations in chemical, physical, textural, and microstructural properties of adductor muscles of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*)[J]. Aquaculture, 2006, 258(1-4): 619-632.
- [4] Yuan C, Fukuda Y, Kaneniwa M, *et al.* Comparison of gel-forming properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi prepared in different seasons[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(5): C326-C331.
- [5] Duan R, Konno K, Zhang J J, *et al.* Different thermostability of collagens from scale of carp (*Cyprinus carpio*) in winter and summer[J]. Journal of Food Biochemistry, 2010, 34(6): 1275-1287.
- [6] Yuan C H, Kaneniwa M, Wang X, *et al.* Seasonal expression of 2 types of myosin with different thermostability in silver carp muscle (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(1): C39-C43.
- [7] Yuan C H, Wang X C, Chen S S, *et al.* Structural stability of myosin rod from silver carp as affected by season[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(5): C686-C693.
- [8] Zheng L, Yu K F, Yuan C H, *et al.* Characterization of myosin subfragment-1 of summer and winter silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) muscle[J]. Journal of Food Science, 2012, 77(9): C914-C920.
- [9] 韩黎, 陶妍, 汪之和. 淡水鱼肌球蛋白Ca²⁺-ATPase热稳定性的季节变化[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(4): 362-367.
- Han L, Tao Y, Wang Z H. Seasonal changes in thermal stability of Ca²⁺-ATPase for myosins from freshwater fish[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2007, 16(4): 362-367(in Chinese).
- [10] Kendrick-Jones J, Lehman W, Szent-Györgyi A G. Regulation in molluscan muscles[J]. Journal of Molecular Biology, 1970, 54(2): 313-326.
- [11] Takahashi M, Yamamoto T, Kato S, *et al.* Species-specific thermal denaturation pattern of fish myosin when heated as myofibrils as studied by myosin subfragment-1 and rod denaturation rates[J]. Fisheries Science, 2005, 71(2): 405-413.
- [12] Hashimoto K, Watabe S, Kono M, *et al.* Muscle protein composition of sardine and mackerel[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1979, 45(11): 1435-1441.
- [13] 刘慧慧, 周晏琳, 张晴, 等. 菲律宾蛤仔捕后干露处置对其复水湿藏稳定性的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(2): 244-250.
- Liu H H, Zhou Y L, Zhang Q, *et al.* Effect of air exposure on biochemical metabolism of harvested Manila clam *Ruditapes philippinarum* during live wet storage[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2018, 33(2): 244-250(in Chinese).
- [14] Kaneko K I, Satomi M, Kimura M, *et al.* Effects of

- microbial growth on the preservation of scallop muscle in a vital state[J]. *Fisheries Science*, 2005, 71(5): 1167-1173.
- [15] Takeda T, Akino M, Imamura T, *et al.* Effects of low-temperature preservation of Japanese scallop adductor muscle on rigor mortis[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2010, 76(5): 946-952.
- [16] Galler S. Molecular basis of the catch state in molluscan smooth muscles: a catchy challenge[J]. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 2008, 29(2-5): 73-99.
- [17] Chantler P D. Chapter 4 Scallop adductor muscles: structure and function[J]. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 2016, 35: 229-316.
- [18] Hideo O, Shugo W, Yoshihiro O. Thermostability of striated and smooth adductor muscle tropomyosins from Yesso scallop *Mizuhopecten yessoensis*[J]. *Journal of Biochemistry*, 2010, 147(6): 823-832.
- [19] 宋扬, 张晴, 周晏琳, 等. 虾夷扇贝横纹肌和平滑肌的蛋白分布及理化性质[J]. *水产学报*, 2017, 41(11): 1798-1805.
- Song Y, Zhang Q, Zhou Y L, *et al.* Protein distribution and physicochemical properties in striated muscle and smooth muscle of *Patinopecten yessoensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(11): 1798-1805(in Chinese).
- [20] Shelud'ko N, Permjakova T, Tuturova K, *et al.* Myorod, a thick filament protein in molluscan smooth muscles: isolation, polymerization and interaction with myosin[J]. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 2001, 22(1): 91-100.
- [21] 张龙, 刘俊荣, 田元勇, 等. 菲律宾蛤仔闭壳肌组织学及其蛋白特性[J]. *大连海洋大学学报*, 2017, 32(3): 356-362.
- Zhang L, Liu J R, Tian Y Y, *et al.* Characteristics of histology and protein in adductor of Manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(3): 356-362(in Chinese).
- [22] Hwang G C, Watabe S, Hashimoto K. Changes in carp myosin ATPase induced by temperature acclimation[J]. *Journal of Comparative-Physiology B*, 1990, 160(3): 233-239.
- [23] Kawabata R, Kanzawa N, Ogawa M, *et al.* Determination of primary structure of amberjack myosin heavy chain and its relationship with structural stability of various fish myosin rods[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2000, 23(4): 283-294.
- [24] 吴忠, 刘俊荣, 田元勇. 虾夷扇贝闭壳肌和外套膜肌原纤维蛋白的特性分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(11): 1640-1649.
- Wu Z, Liu J R, Tian Y Y. Characteristics of the adductor and mantle myofibrils from *Patinopecten yessoensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(11): 1640-1649(in Chinese).
- [25] Hooper S L, Hobbs K H, Thuma J B. Invertebrate muscles: thin and thick filament structure; molecular basis of contraction and its regulation, catch and asynchronous muscle[J]. *Progress in Neurobiology*, 2008, 86(2): 72-127.

Seasonal variation of myofibrillar protein thermal stability of scallop (*Patinopecten yessoensis*)

ZHANG Qing, TIAN Yuanyong, JIANG Minghui, LIU Junrong*

(College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: To explore the seasonal variation of commercial farmed scallop *Patinopecten yessoensis*, primary characteristics, ATP-related compounds and ATPase of scallop in spring (April), summer (July), autumn (October) and winter (January) were analyzed. The thermal stability changes of striated muscle and smooth muscle were analyzed by Mf-Ca²⁺ATPase to explore the seasonal changes of thermal stability of adductor muscle. The results showed that *P. yessoensis* was the fullest in spring. The condition index of gonad was as high as 6.96%, and only 1.79%-2.95% in other seasons. There was no significant seasonal difference in protein, fat and ATP contents in adductor muscle. The adductor muscle was rich in protein which accounted for 75%-80% of the dry basis. The fat content was very low, only 0.63%-1.00%. It was worth noting that the total sugar content of the adductor muscle in spring and summer was significantly higher than that in autumn and winter, 11.14% and 13.84%, respectively, and the lowest in winter is only 2.67%. ATP content in striated muscle was higher than that in smooth muscle in all seasons, 4.3-5.0 μmol/g, and 1.2-1.6 μmol/g, respectively. There was no significant difference in ATP and related compounds between striated muscle and smooth muscle in different seasons. In addition, striated muscle has similar thermal stability to smooth muscle. The Mf-Ca²⁺ATPase of striated muscle and smooth muscle did not change significantly after 30 min heating at 30 °C and 35 °C. It decreased at 40 °C, and changed obviously at 45 °C. The protein was almost completely inactivated within 10 min heating at 50 °C. Mf in adductor muscle had the fastest inactivation in spring, while the inactivation rate of striated muscle was slightly higher than that of smooth muscle, yet with little difference in winter, autumn and summer. Because of difference of thermal degeneration rates in Mf, it was presumed that there were two types of myosins with different stability in adductor muscle of *P. yessoensis*, which needs further analysis and elucidation.

Key words: *Patinopecten yessoensis*; myofibrillar protein; thermal stability; seasonal variation

Corresponding author: LIU Junrong. E-mail: ljunrong@dlou.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0901001); National Natural Science Foundation of China (31671790)