

普关坤翁, 张锐, 王琪, 等. 碱性氨基酸种类及浓度对牦牛肉肌原纤维蛋白氧化与凝胶特性的构象调控机制 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(9): 51–62. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030008

PUGUAN Kunweng, ZHANG Rui, WANG Qi, et al. Conformational Regulatory Mechanism of Types and Concentrations of Basic Amino Acids on Oxidation and Gel Properties of Yak Meat Myofibrillar Proteins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(9): 51–62. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030008

· 研究与探讨 ·

碱性氨基酸种类及浓度对牦牛肉肌原纤维蛋白氧化与凝胶特性的构象调控机制

普关坤翁¹, 张锐², 王琪¹, 毛云¹, 磨佳佳¹, 王琨¹, 王立娜¹, 王琳琳^{1,*}

(1. 西南民族大学药学与食品学院, 四川成都 610041;

2. 肉类加工四川省重点实验室, 四川成都 610081)

摘要: 本研究旨在揭示不同浓度的碱性氨基酸 (L-精氨酸/L-Arg、L-赖氨酸/L-Lys、L-组氨酸/L-His) 对牦牛肉肌原纤维蛋白 (Myofibrillar protein, MP) 氧化调控及凝胶网络构建的分子作用机制。通过向牦牛肉 MP 体系添加不同浓度 (0.08%, 0.15%, 0.30%, 0.60%, w/v) 的碱性氨基酸, 系统测定并分析了牦牛肉 MP 的结构 (溶解度、浊度、表面疏水性、二级结构、三级结构) 与氧化特性 (羰基含量、总巯基含量、活性巯基含量) 指标, 以及凝胶特性 (保水性、蒸煮损失、白度、强度、流变特性) 的变化。结果表明, 碱性氨基酸通过中和电荷降低分子间排斥、诱导 MP 构象展开暴露疏水基团与活性巯基、并调控二级结构 (L-Lys/L-Arg 促 α -螺旋向 β -折叠转化, L-His 维持二者同步增加), 显著改善了牦牛肉 MP 的凝胶性能 (所有氨基酸均提升保水性、降低蒸煮损失), 但其效果及潜在影响具有浓度和类型依赖性。在有益效应方面: L-Lys 和 L-Arg 表现突出, 能更有效提升 MP 溶解度 (0.60% L-Arg 组达 86.38%, 较空白组提高约 25%)、降低浊度 (抑制不良聚集), 这些结构优化与活性巯基暴露促进的二硫键交联协同作用, 形成了更均匀致密的凝胶网络, 具体表现为 0.30% 浓度下保水性显著提升约 25% (L-Lys/L-Arg 组) 及蒸煮损失大幅降低 (0.30% L-Lys 组降低 58%), 并在高温 (≥ 70 °C) 显著增强储能模量 G' (L-Lys $\geq 0.30\%$, L-Arg 0.60%); L-His 的改善作用相对温和, 主要通过维持 α -螺旋与 β -折叠同步增加, 在 0.60% 浓度下提升凝胶强度 4.2%。L-Lys 和 L-Arg 会导致凝胶白度随浓度增加而降低; 高浓度氨基酸 (尤其 0.60% L-Arg) 诱导的 MP 过度展开及自身氧化加剧了蛋白质氧化损伤 (羰基含量最高达 5.54 nmol/mg)。综上所述, L-Arg 和 L-Lys 在通过电荷作用与结构转化优化溶解性、抑制聚集及促进交联方面更具优势, 是改善高肌红蛋白、低脂牦牛肉 MP 凝胶的有效策略, 但需注意浓度控制以平衡氧化风险; L-His 则提供了一种作用较温和的选择。实际应用中可根据产品需求选择适配氨基酸类型, 为开发低钠低磷牦牛肉制品提供理论依据。

关键词: 牦牛肉, 碱性氨基酸, 食盐替代物, 构象调控, 品质特性

中图分类号: TS251.5⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2026)09-0051-12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030008

本文网刊:



Conformational Regulatory Mechanism of Types and Concentrations of Basic Amino Acids on Oxidation and Gel Properties of Yak Meat Myofibrillar Proteins

PUGUAN Kunweng¹, ZHANG Rui², WANG Qi¹, MAO Yun¹, MO Jiajia¹, WANG Kun¹, WANG Lina¹, WANG Linlin^{1,*}

(1. College of Pharmacy and Food, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. Meat Processing Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610081, China)

收稿日期: 2025-03-05

基金项目: 西南民族大学中央高校基本科研业务专项资金优秀学生培养工程项目 (ZYN2025242); 肉类加工四川省重点实验室开放基金项目资助 (No.24-R-06)。

作者简介: 普关坤翁 (2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品加工与安全, E-mail: 19272863850@163.com。

* 通信作者: 王琳琳 (1988-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 畜产品加工, E-mail: jiayouwl123@163.com。

Abstract: This study aimed to elucidate the molecular mechanisms by which basic amino acids (L-arginine/L-Arg, L-lysine/L-Lys, L-histidine/L-His) regulated oxidation resistance and gel network formation in yak meat myofibrillar protein (MP). Different concentrations (0.08%, 0.15%, 0.30%, 0.60%, w/v) of each amino acid were added to the MP system. Changes in structural properties (solubility, turbidity, surface hydrophobicity, secondary and tertiary structures) and oxidation indicators (carbonyl content, total and active sulfhydryl content) of MP, as well as gel properties (water-holding capacity, cooking loss, whiteness, strength, rheological behavior), were systematically analyzed. Results demonstrated that basic amino acids synergistically improved gel performance by neutralizing charges to reduce intermolecular repulsion, inducing conformational unfolding to expose hydrophobic groups and active sulfhydryls, and regulating secondary structures (L-Lys/L-Arg promoted α -helix to β -sheet conversion, while L-His maintained concurrent increases in both), but their effects exhibited concentration and type dependencies. In beneficial aspects, L-Lys and L-Arg significantly enhanced solubility (86.38% for 0.60% L-Arg, ~25% higher than control) and reduced turbidity (suppressing aggregation). These structural optimizations combined with disulfide crosslinking from exposed active sulfhydryls formed uniform gel networks, specifically increasing water-holding capacity by ~25% (L-Lys/L-Arg groups at 0.30%) and reducing cooking loss (58% reduction for 0.30% L-Lys), while significantly enhancing storage modulus G' at high temperatures (≥ 70 °C, L-Lys $\geq 0.30\%$, L-Arg 0.60%). L-His acted mildly, mainly increasing gel strength by 4.2% at 0.60% concentration via stabilizing α -helix/ β -sheet coexistence. L-Lys and L-Arg reduced gel whiteness with increasing concentration. High concentrations (especially 0.60% L-Arg) intensified protein oxidation damage (peak carbonyl content: 5.54 nmol/mg) due to excessive unfolding and self-oxidation. In summary, L-Arg and L-Lys showed advantages in optimizing solubility, inhibiting aggregation, and promoting crosslinking through charge interactions and structural transformation, serving as effective strategies for improving gels of high-myoglobin, low-fat yak meat MP, yet requiring concentration control to balance oxidation risks. L-His provides a milder alternative. Practical applications can select amino acid types based on product requirements, offering a theoretical basis for developing low-sodium, low-phosphorus yak meat products.

Key words: yak meat; basic amino acids; salt substitutes; conformational regulation; quality characteristics

牦牛起源于中国, 主要生活在青海、西藏、四川、甘肃、云南等青藏高原严寒地区。在青藏高原极端生境与生物地理隔离机制的共同作用下, 牦牛演化出了不同于普通牛肉的肉质性状。从生物进化角度分析, 高原低压缺氧环境诱导的冷适应代谢特征, 促使牦牛肉肌红蛋白复合体构象发生适应性改变, 这种适应性改变不仅形成了牦牛肉地域标志性的风味前体物质, 更赋予其独特的质构特性。其同时还具有丰富的蛋白质, 脂肪含量低, 胡萝卜素以及铁、锌、钙等矿物元素含量较高的优势^[1]。在牦牛肉制品加工中, 为了充分发挥其品质优势并满足贮藏与风味需求, 适量的钠盐与磷酸盐常作为关键添加剂被协同使用: 钠盐可减少微生物滋生^[2], 延长贮藏时间并提升风味口感。磷酸盐则能通过调节离子强度改善 MP 的保水性和凝胶特性, 优化制品质构, 降低肉制品的酸败速度^[3]。然而, 过量使用面临双重挑战: 钠盐摄入超标 ($>3\%$) 会增加高血压、心血管疾病等健康风险^[4]; 磷酸盐过量 ($>0.5\%$) 不仅导致金属味、橡胶质地等不良感官特性^[5], 还可能与膳食中钙、铁等矿物质结合, 影响营养素吸收^[6]。因此, 需要寻找安全有效的物质, 以完全或部分替代钠盐和磷酸盐在肉制品中所起的作用。

近年来, 国内外学者在低钠低磷肉制品研究方面取得了一定进展。在钠盐替代物研究中, 钾盐是常见方向, 其在一定程度上能够调节钠钾平衡, 但添加量过多会影响肉品品质^[7]; 从天然物质中提取咸味物质的研究也有所开展, 如乌贼骨、牡蛎壳提取物虽有

咸味替代效果^[8], 但在工艺成本和全面替代钠盐功能方面仍存在不足。在磷酸盐替代物研究中, 淀粉、植物蛋白和亲水胶体等越来越受到关注。淀粉可提高保水性和粘结性, 但添加过多会影响口感^[9]; 大豆蛋白能形成保水保油凝胶, 但易引发过敏反应^[10]; 亲水胶体虽可改变凝胶特性, 但在高盐环境下保水能力受限^[11]。因此, 找到适合肉制品的钠盐和磷酸盐替代物具有较好的研究价值, 值得进行更加深入和系统的研究。Guo 等^[12] 研究发现 L-Lys 和 L-His 通过提高肌球蛋白活性巯基含量, 促进分子内二硫键重构与静电斥力增强, 从而显著提升肌球蛋白溶解度。Lei 等^[13] 对 L-Arg 加入到肌动球蛋白所产生的影响进行研究, 发现 0.1%~0.3% 添加量的 L-Arg 可以提高肌动球蛋白的凝胶强度和凝胶保水性, 而且可以促使凝胶三维网状结构构建。Guo 等^[14] 分别向猪肉 MP 中加入 0.1% 的 L-Lys 和 L-His, 研究发现这两种添加物均能使 MP 在油水界面展开, 使界面张力降低, 从而促进低离子条件下的 MP 乳液的稳定性。以上研究结果表明碱性氨基酸可通过多重机制, 同时替代钠盐的离子调节功能和磷酸盐的保水、凝胶强化作用, 为低钠低磷牦牛肉制品加工提供科学依据。尽管碱性氨基酸在猪、禽等肉类中的应用已取得进展, 但牦牛肉 MP 因高肌红蛋白含量比普通牛肉高 30%~50%、低脂特性脂肪含量低于 5%, 其氧化与凝胶机制具有独特性, 目前针对氨基酸种类及浓度对牦牛肉 MP 的系统性研究仍相对匮乏。

本研究以牦牛肉 MP 为研究对象, 选取 L-Lys、

L-Arg、L-His 三种碱性氨基酸, 分别设置 0.08%、0.15%、0.30%、0.60%(w/v) 不同添加量, 深入研究其对牦牛肉 MP 品质特性的影响。通过提取牦牛肉 MP, 制备氨基酸-MP 混合体系和凝胶体系, 测定分析添加不同种类氨基酸对 MP 氧化特性及凝胶特性的影响, 明确氨基酸种类和含量在降低 MP 氧化及改善凝胶特性方面的潜在机制, 以期为牦牛肉加工过程中合理使用碱性氨基酸改善肉品品质提供参考数据, 助力牦牛肉制品加工企业优化生产工艺, 提升产品质量。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牦牛肉 购自成都市武侯区开文牛羊肉商店; L-Lys、L-Arg、L-His(99%, 食品级) 河南万邦化工科技有限公司; 马铃薯淀粉(食品级) 东莞东美食品有限公司; 鸡精(食品级) 中盐长江盐化有限公司。

V-1000 紫外分光光度计 翱艺仪器上海有限公司; T-25-D 匀浆机 德国伊卡股份有限公司; 5810R 冷冻离心机 德国艾蓬多夫股份有限公司; F-4700 荧光分光光度计 日本株式会社日立高新技术科学那珂事业所; Centrifuge 5804 R 高速冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司; ASD Field Spec Pro FR 傅里叶红外光谱仪 美国 Boulder 公司; TA.XT.Plus 型质构分析仪 英国 Stable Micro System 公司; DISCOVERY HR-1 旋转流变仪 美国 TA 仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 MP 的提取与浓度测定 MP 提取: 参照栗俊广等^[15]的方法, 并略作修改。取新鲜牦牛肉去脂剔筋后绞碎, 按 1:4(w/v) 加入预冷溶液 A(0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1 mol/L EGTA, pH7.0), 匀浆均质后 3000×g 离心 15 min, 取沉淀重复一次; 第二次获得的沉淀以 1:4(w/v) 加入溶液 B(0.1 mol/L NaCl, pH7.0), 同条件离心两次, 最终获得 MP 沉淀。

MP 浓度的测定: 将 MP 溶解于 0.6 mol/L NaCl、50 mmol/L, pH7.0 磷酸盐缓冲液(Phosphate-Buffered Saline, PBS)中。以牛血清蛋白(BSA, 10 mg/mL, 溶解于相同缓冲液)为标品, 配制梯度浓度。加入双缩脲试剂后室温静置 30 min, 于 540 nm 处测定吸光度值。用 BSA 制作标准曲线, 以 BSA 浓度(mg/mL)为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 根据牛血清蛋白线性回归方程 $y(\text{吸光度})=0.0426x(\text{BSA 浓度, mg/mL})+0.0028$, $R^2=0.999$ 计算 MP 溶液浓度。

1.2.2 MP-氨基酸混合液的制备 将提取并测定浓度后的 MP 溶液, 用 50 mmol/L PBS 稀释至浓度 20 mg/mL, 作为标准化 MP 溶液。分别考察三种碱性氨基酸 L-Lys、L-Arg、L-His 在添加浓度 0.08%、0.15%、0.30% 及 0.60% (w/v) 下对 MP 的影响。具体制备过程: 独立地向标准化 MP 溶液中加入单一

的氨基酸至上述特定浓度(即每种氨基酸的每个浓度点均为独立操作和独立样品), 最终形成 L-Lys 组、L-Arg 组、L-His 组共 12 个氨基酸处理体系(每种氨基酸包含 4 个浓度: 0.08%、0.15%、0.30%、0.60% w/v); 同时设置仅含标准化 MP 溶液的空白对照组。所有样品(空白对照及各氨基酸处理组)经充分搅拌溶解后, 于 4 °C 保存备用, 作为基准母液, 保存时间不超过 3 d。后续实验中所需的测试样品, 均由其对应的基准母液在测试前稀释获得。

1.2.3 MP 凝胶的制备 氨基酸-MP 凝胶制备: 参照付渊^[1]的方法并适当修改, 将 MP-氨基酸混合液浓度调至 15 mg/mL, 未添加氨基酸组作空白对照。将溶液分装于 50 mL 圆底离心管中, 置于恒温水浴中以 2 °C/min 的升温速率从 20 °C 程序升温至 80 °C, 并在 80 °C 下维持恒温 30 min。随后取出离心管, 立即置于冰水浴中冷却 20 min, 冰浴 20 min 后 4 °C 静置 12 h。

1.2.4 指标测定方法

1.2.4.1 蛋白溶解度 溶解度参照梅甜恬等^[6]的方法进行测定。首先, 将 MP-氨基酸混合液用 50 mmol/L PBS 稀释至 2.5 mg/mL 蛋白浓度, 涡旋混匀后室温静置 30 min。将此预处理样品以 8000×g 离心 15 min(4 °C), 分离后取离心上清液(可溶性蛋白部分)用于后续检测。采用双缩脲法测定该上清液中的可溶性蛋白浓度(测定条件同 1.2.1 中 MP 浓度的测定)。同时, 同批次预处理样品(未离心)按相同双缩脲法测定其理论总蛋白浓度(代表体系中全部蛋白含量)。蛋白溶解度按下式计算:

$$\text{溶解度}(\%) = \frac{\text{离心上清液可溶性蛋白浓度}}{\text{样品理论总蛋白浓度}} \times 100$$

1.2.4.2 浊度 浊度参考郭秀云^[16]的方法, 将 MP-氨基酸混合液用 PBS 稀释至 2.0 mg/mL 蛋白浓度, 以同批次制备的未添加氨基酸的 MP 溶液(空白对照组)作为基准对照。涡旋振荡混匀 10 s, 于 25 °C 避光静置 30 min。随后于 340 nm 波长下测定其吸光度 A_{340} , 以该吸光度值表征体系浊度。其原理是: MP 溶液中蛋白质的聚集或沉淀会导致溶液浑浊度升高, 340 nm 处的吸光度与浑浊程度呈正相关。

1.2.4.3 表面疏水性的测定 参照 Chin 等^[17]的方法, 并作适当修改。MP 调至 4.0 mg/mL, 取 1.5 mL 加 0.3 mL 溴酚蓝(1 mg/mL), 涡旋 10 min 后 8000×g 离心 12 min, 上清液稀释 10 倍测 595 nm 吸光度。以添加 1.5 mL 的磷酸盐缓冲溶液和 0.3 mL 的溴酚蓝溶液, 经上述离心、稀释, 作为空白组。

$$\text{溴酚蓝}(\mu\text{g}) = 200 \times \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}}$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 表示样品组在 595 nm 处测定样液的吸光值; $A_{\text{空白}}$ 表示空白组在 595 nm 处测定的吸光值。

1.2.4.4 羰基含量的测定 参照 Oliver 等^[18] 的试验方法并略作修改。用 PBS 将 MP 调至 6.0 mg/mL, 取 4 mL 样液加 4 mL 2 mol/L HCl(含 10 mmol/L DNPH), 暗处反应 60 min。取与样品组相同的 MP 溶液, 加入等体积 2 mol/L HCl(不含 DNPH), 其余操作均与样品组一致, 以该空白组的吸光度值作为背景值, 从样品组的吸光度中扣除。加 4 mL 20% 三氯乙酸, 10000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 沉淀用乙酸乙酯-乙醇混合液洗 3 次, 盐酸胍溶解后测 370 nm 吸光值。计算公式为:

$$\text{羰基含量(nmol/mg)} = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{22000 \times \text{蛋白溶液浓度}} \times 10^6$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 表示 DNPH 处理样品吸光度; $A_{\text{空白}}$ 表示未加 DNPH 样品吸光度。

1.2.4.5 总巯基含量和活性巯基含量的测定 总巯基含量的测定参照 Ellman 法^[19] 测定, 将 MP 浓度调整至 1 mg/mL, 取 1.0 mL 的样品, 依次加入 9 mL 溶液 A(0.01 mol/L EGTA, 8 mol/L 尿素和 0.1 mol/L K_2HPO_4 , pH6.0)、100 μ L Ellman 试剂(10 mmol/L DTNB 和 0.01 mol/L KH_2PO_4 , pH6.0), 使用涡旋仪漩涡振荡 60 s, 使溶液混匀, 在室温、避光的条件下静置 0.5 h, 于 412 nm 下测定吸光值。

活性巯基含量的测定采用不含尿素的溶液 A, 其余与总巯基测定的方法相同。

$$\text{总巯基含量(nmol/mg)} = \frac{A_{412}}{13600 \times \text{蛋白浓度}} \times \text{稀释倍数} \times 10^6$$

1.2.4.6 蛋白质构象的测定 二级结构(基于傅里叶红外光谱)的测定参照 Guo 等^[20] 的方法并稍作修改。将 MP 的浓度调至 10 mg/mL, 冷冻干燥 24 h 后研磨成粉。用傅里叶红外光谱仪在 500~4000 cm^{-1} 扫描, 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描 32 次。

蛋白质二级结构的表征通过傅里叶红外光谱酰胺 I 带(1600~1700 cm^{-1})的解析实现。原始光谱经基线校正后, 采用二阶导数分析识别子峰位置, 并辅以高斯-洛伦兹混合函数对酰胺 I 带进行去卷积及非线性最小二乘拟合。通过子峰面积积分计算 α -螺旋(1650~1660 cm^{-1})、 β -折叠(1620~1640 cm^{-1} , 1670~1690 cm^{-1})、 β -转角(1660~1680 cm^{-1})及无规卷曲(1640~1650 cm^{-1})的相对含量, 以半峰宽校正峰重叠效应。

三级结构(基于荧光光谱), 参照 Jiang 等^[21] 的试验方法并稍作修改。将 MP 样品用 PBS 缓冲液稀释到 0.5 mg/mL。参数设置: 激发波长为 295 nm, 光谱范围为 300~400 nm, 扫描速度为 1500 nm/min, 发射和激发狭缝均为 2.5 nm。通过荧光强度峰值和峰位偏移表征色氨酸微环境变化, 反映蛋白质解折叠程度。

1.2.4.7 SDS-PAGE 电泳检测 参照刘旺等^[22] 方法, 并适当修改。对混合 MP 溶液体系进行 SDS-PAGE

电泳, 分离胶、浓缩胶的浓度为 10%、4%。MP 的浓度调成 2 mg/mL, 上样量为 10 μ L。浓缩胶的电压为 90 V, 到分离胶后, 采用 120 V。然后将胶取出, 放在摇床染色 40 min 后, 将染色液更换为脱色液, 再脱色 12 h。

1.2.4.8 凝胶保水性和凝胶蒸煮损失的测定 保水性的测定: 采用 Ma 等^[23] 的方法并适当修改, 称量离心管的质量 M_0 , 向离心管中加入适量凝胶称量总质量 M_1 , 然后在 4 $^{\circ}C$ 的条件下以 9000 r/min 的转速离心 12 min, 离心完吸除多余的水分, 称量总质量 M_2 。计算公式:

$$\text{保水性(\%)} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

蒸煮损失的测定: 称量小烧杯的质量 M_3 , 煮前 MP 凝胶样品加烧杯的质量 M_4 , 煮后吸完多余水分, 称量 MP 凝胶样品加烧杯的总质量 M_5 。计算公式:

$$\text{蒸煮损失(\%)} = \frac{M_4 - M_5}{M_4 - M_3} \times 100$$

1.2.4.9 凝胶白度和凝胶强度的测定 用色差仪测定样品的 L^* 、 a^* 、 b^* , 根据公式计算。

$$W = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2}$$

凝胶强度的测定参照 Chen 等^[24] 的方法并适当修改。质构仪设置参数条件: 选用 GMIA 模式, 探头为 P/0.5, 测前、测中、测后速率分别为 1.5、1.0、1.0 mm/s, 间隔时间 5 s, 触发力 5 g, 触发类型 Strain, 样品压缩比 40%, 凝胶强度单位为 g。

1.2.4.10 凝胶流变性的测定 参考李可等^[25] 的方法并适当修改, 采用温度扫描模式。参数设置为: 频率 0.1 Hz, 起始温度为 25 $^{\circ}C$, 终止温度为 85 $^{\circ}C$, 升温速率为 2 $^{\circ}C/min$, 应变 0.5%, 夹缝间距 0.2 mm。测定 G'和损耗模量(G'')。

1.3 数据处理

实验数据经三次生物学重复测定, 以均值 \pm SD 形式呈现。统计分析采用 SPSS 20.0 完成单因素方差分析, 通过 Duncan's 多重范围检验进行事后比较, 显著性水平 $P < 0.05$ 。作图采用 Origin 2018 软件。

2 结果与分析

2.1 MP 溶液理化性质分析

2.1.1 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 溶解度、浊度的影响 一般来说, MP 溶解度越高, 肉制品的品质特性越好。L-Lys、L-Arg、L-His 对牦牛肉 MP 溶解度的影响如图 1(a)所示, 三种氨基酸的添加均能提高 MP 的溶解度, 可能的原因是三种氨基酸均为碱性氨基酸, 使体系中的 pH 高于肌球蛋白等电点的环境, 使得其获得净负电荷, 促使肌球蛋白和水的相互作用, 从而增加了溶解度^[26]。总体上看, L-Arg 组随着添加量的增多溶解性呈现出递增的趋势, L-Lys 组和 L-His 组随着添加量的增多溶解性呈现出先增后减的

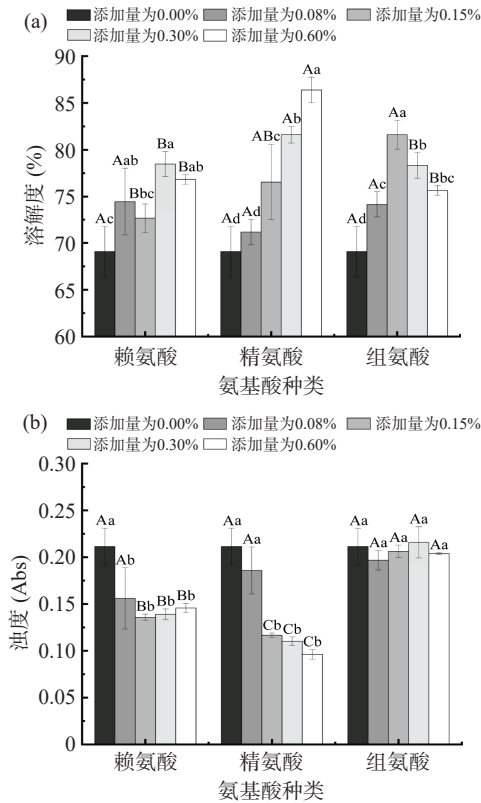


图 1 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 溶解度和浊度的影响

Fig.1 Effect of L-Lys, L-Arg, L-His on solubility and turbidity of MP

注: (a) 为 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 溶解度的影响, (b) 为 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 浊度的影响。不同小写字母表示同一种氨基酸不同浓度差异显著 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示同一浓度不同氨基酸差异显著 ($P < 0.05$), 图 2~图 4、图 9~图 10 同。

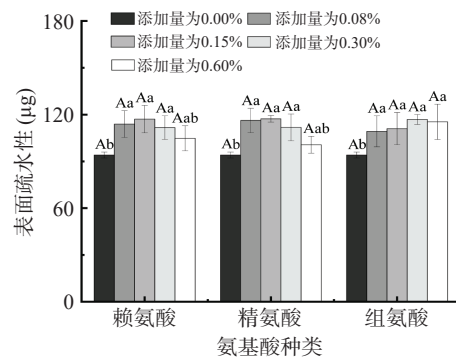
趋势(L-Lys 组在 0.15% 后略有下降, $P > 0.05$)。可能的原因是, L-His 组高浓度时 α -螺旋与 β -折叠同步增加, 区别于另两种氨基酸的 α 向 β 转化。低浓度时 α -螺旋适度增加促使亲水基团暴露、溶解度提升; 高浓度时 α -螺旋过度保留或疏水区域聚集, 引发蛋白质分子间疏水相互作用增强并形成聚集体, 导致溶解度下降^[27]。所有试验组中, 0.60% L-Arg 组的溶解度最大为 86.38%, 远高于空白组的溶解度 69.08%。综上所述, L-Arg 组提升 MP 溶解度的效果最佳, L-His 组在低浓度 ($< 0.15\%$) 下效果优于 L-Lys 组, 而在高浓度 ($> 0.30\%$) 下 L-Lys 组效果更优。其中以 0.60% 的 L-Arg 组溶解度最高。

浊度的高低可以反映物质颗粒的大小, 可以反映蛋白质分子的聚集程度。L-Lys、L-Arg、L-His 对牦牛肉 MP 浊度的影响如图 1(b) 所示。总体上看, L-His 组所有试验组与空白组均无显著差异 ($P > 0.05$); L-Lys 组各试验组均显著低于空白组 ($P < 0.05$); L-Arg 组在 0.08% 时与空白组无显著差异 ($P > 0.05$), 添加量 $\geq 0.15\%$ 时显著低于空白组 ($P < 0.05$), 此结果与朱潘虹^[28] 结果相似, 产生的原因可能是 L-Lys 正电荷直接中和 MP 负电荷, 降低了 MP 之间的聚集。L-Arg 组中, 空白组和 0.08% L-

Arg 组的浊度无显著差异 ($P > 0.05$), 这可能是由于低浓度 L-Arg 对体系 pH 和电荷环境的改变较弱, 在 0.60 mol/L NaCl 条件下不足以显著破坏肌球蛋白的单体稳定状态^[8]。随着 L-Arg 添加量增加 ($\geq 0.15\%$), 浊度显著降低 ($P < 0.05$), 这归因于高浓度 L-Arg 提升了体系碱性(通过胍基作用), 增强了蛋白质分子间的静电斥力, 从而有效抑制了蛋白聚集。当添加量为 0.15%、0.30%、0.60% 时, L-Lys 组显著高于 L-Arg 组 ($P < 0.05$), 显著低于 L-His 组 ($P < 0.05$)。综上所述, L-Lys 组和 L-Arg 组均能降低 MP 的浊度, 其中以 0.60% 的 L-Arg 的浊度最低。L-His 组不会对 MP 浊度产生明显影响。

2.1.2 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 表面疏水性的影响

表面疏水性增强反映肌球蛋白构象展开程度升高, 其本质是内部疏水基团暴露。本实验中, 碱性氨基酸通过改变电荷相互作用(如 L-Arg 胍基中和负电荷)或氢键网络(如 L-His 咪唑基形成新氢键), 促使肌球蛋白结构展开。暴露的疏水基团在后续热诱导凝胶过程中, 可通过疏水相互作用驱动蛋白质分子交联, 进而影响凝胶持水能力与网络稳定性^[28]。表面疏水性的升高表明更多疏水基团参与凝胶网络的形成, 进而对 MP 的凝胶性和保水性产生影响, 适度的疏水相互作用可增强凝胶网络稳定性, 提升保水能力; 但过度暴露可能导致蛋白聚集过度, 反而破坏凝胶结构^[29]。L-Lys、L-Arg、L-His 对牦牛肉中 MP 表面疏水性的影响如图 2 所示, L-Lys 和 L-Arg 组中, 添加量为 0.08%、0.15%、0.30% 的试验组的 MP 表面疏水性均显著高于空白组 ($P < 0.05$), L-His 组中, 所有试验组均显著高于空白组 ($P < 0.05$)。这三种氨基酸加入到 MP 中, 它们会和 MP 中的氨基酸残基发生相互作用, 促使 MP 结构展开, 暴露出疏水基团^[3]。综上所述, 三种氨基酸均可以增加 MP 表面疏水性, 其中 0.15% L-Arg 组表面疏水性表现出最高值趋势, 但各组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

图 2 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 表面疏水性的影响
Fig.2 Effect of L-Lys, L-Arg, L-His on hydrophobicity of MP surface

2.2 MP 氧化特性分析

2.2.1 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 羰基含量的影响

羰基是评定蛋白质氧化的重要指标。L-Lys、L-

Arg、L-His 对牦牛肉中 MP 巯基含量的影响如图 3 所示, L-Lys、L-Arg、L-His 的添加均使牦牛肉 MP 巯基含量总体升高。这一现象主要源于双重机制协同作用: 首先, 三种氨基酸的游离侧链(胍基、咪唑基、L-Lys 的 ϵ -氨基)作为氧化底物生成活性羰基化合物^[30], 共价修饰 MP 的赖氨酸/精氨酸残基^[31]; 其次, 氨基酸改变体系 pH 及电荷分布, 诱导 MP 构象展开, 促使内部氧化敏感位点暴露(图 2 表面疏水性上升)。牦牛肉 MP 富含的内源肌红蛋白铁离子进一步放大氧化应激, 构成体系特殊性^[32]。值得注意的是, 0.15% L-Arg 组因胍基螯合铁离子抑制氧化^[33]、pH 提升稳定巯基活性, 以及诱导适度构象展开(避免敏感位点过度暴露), 巯基含量与空白组无显著差异 ($P>0.05$); 而添加量 $\geq 0.30\%$ 时, L-Arg 自身氧化加剧、MP 过度展开及铁离子协同作用导致巯基显著上升(0.60% 组达峰值 5.54 nmol/mg)。L-Lys 组则呈现浓度依赖波动性: 0.08% 组通过 ϵ -氨基螯合 Fe^{2+} 抑制氧化; 0.15%~0.30% 组因 α -螺旋向 β -折叠构象转变加速巯基氧化和分子交联^[33]; 0.60% 组因电荷中和与空间位阻饱和和阻断自由基链式反应, 巯基含量回落^[34]。研究表明, 牦牛肉制品开发需同步调控外源氨基酸的浓度阈值(如 L-Arg 的 0.15% 临界点)与内源肌红蛋白铁的促氧化作用, 为低钠低磷加工提供理论依据。

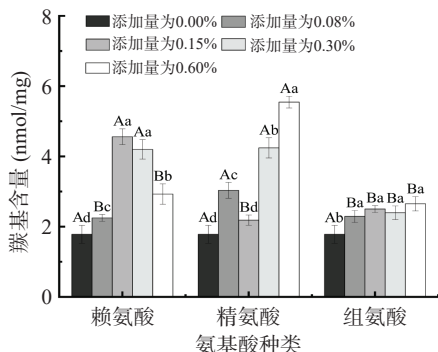


图 3 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 羰基含量影响
Fig.3 Effect of L-Lys, L-Arg, L-His on carbonyl content of MP

2.2.2 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 总巯基含量和活性巯基含量的影响 巯基是蛋白质的一个重要基团, 活性巯基和总巯基的含量可以反映蛋白质中二硫键的含量和蛋白构象的变化^[35]。L-Lys、L-Arg、L-His 对牦牛肉中 MP 总巯基的影响如图 4(a)所示。总体来看, 所有试验组的 MP 总巯基含量和空白组均无显著差别($P>0.05$), 此结果与李诗义^[35]结果相似, 这三种氨基酸以及 pH 均不会对 MP 的总巯基含量造成影响, 即不会对二硫键的形成或断裂造成影响。且各组内及组间均没有显著性差异($P>0.05$)。

L-Lys、L-Arg、L-His 对牦牛肉中 MP 活性巯基的影响如图 4(b)所示。所有试验组的活性巯基含量均高于空白组, 其中 L-Lys 组和 L-Arg 组显著更高

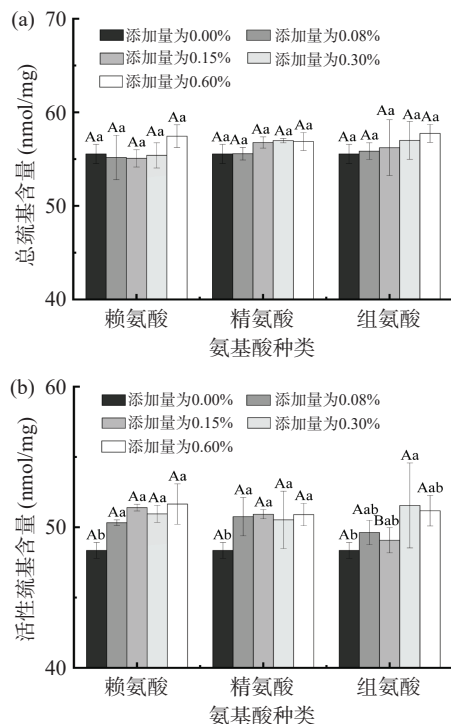


图 4 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 总巯基和活性巯基的影响
Fig.4 Effect of L-Lys, L-Arg, L-His on MP total thiols and active thiols

注: (a)为 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 总巯基的影响, (b)为 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 活性巯基的影响。

($P<0.05$), 这源于碱性氨基酸正电荷基团对 MP 表面负电荷的中和作用, 通过削弱静电排斥诱导可控性构象展开(图 2)。L-Lys 的 ϵ -氨基与 L-Arg 的胍基凭借高电荷密度显著弛豫三级结构, 使疏水核心包埋的巯基暴露于极性环境。在牦牛肉 MP 高肌红蛋白特性背景下, 该暴露兼具双重功能, 既表征构象变化程度, 更为后续氧化交联提供关键位点。而 L-His 因咪唑基的缓冲特性^[36], 仅在 $\geq 0.30\%$ 时微弱提升巯基活性。值得注意的是, L-His 组仅 0.30% 添加量时活性巯基显著高于空白组($P<0.05$), 但组内变异相对较大, 可能与牦牛肉肌红蛋白含量个体差异及 L-His 的临界缓冲特性相关。且 0.15% 浓度下 L-Lys/L-Arg 组的巯基含量显著高于 L-His 组($P<0.05$)。若追求高效巯基暴露及凝胶增强, 建议优先选择 0.15% L-Lys 或 L-Arg; 若需温和调控以避免牦牛肉体系的过度氧化, 可将 L-His 浓度提升至 0.30% 以上, 其诱导的 α -螺旋与 β -折叠同步增加(图 6)可能通过构象保护机制减弱巯基转化效率, 或与肌红蛋白铁相互作用差异相关。

综上可知, 三种氨基酸不会引起 MP 总巯基含量的变化, 但是会使活性巯基含量上升。

2.3 MP 分子构象变化分析

2.3.1 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 二级结构的影响

不同蛋白质的二级结构也不同, 在测定的傅里叶红外光谱图中峰的位置不同, 吸收的强弱不同, 因此可以根据傅里叶红外光谱图对 MP 的二级结构进行分

析^[37]。图 5 为傅里叶红外光谱的分析结果, 图 6 为基于图 5 的光谱数据绘制而成的 L-Lys、L-Arg、L-His 对牦牛肉中 MP 二级结构分析结果。L-Lys 组 α -螺旋含量随添加量增加呈稳定递减趋势, L3、L4 组显著低于空白组 ($P < 0.05$), 但 L1、L2 组无显著差异(推测 L-Lys 浓度未达到阈值), 其 ϵ -氨基通过强碱性提升体系 pH、中和 MP 负电荷, 削弱 α -螺旋分子内斥力并促进向 β -折叠转化; L-Arg 组(除最低浓度 A1 组) α -螺旋含量亦随浓度升高降低 ($P < 0.05$), 高浓度胍基作用机制与 L-Lys 相似, 而低浓度 A1 组因胍基共振稳定性及金属螯合作用, 对局部结构有暂时稳定效应; L-His 组(除 0.08% 浓度) α -螺旋含量高于空白组, H3 组 α -螺旋含量显著高于空白组 ($P < 0.05$), 0.60% 组和 0.15% 组与空白组无显著差异, H1 组因浓度不足未产生显著影响。随着浓度升高, 咪唑基引发的静电排斥增强分子内氢键, 稳定了 α -螺旋结

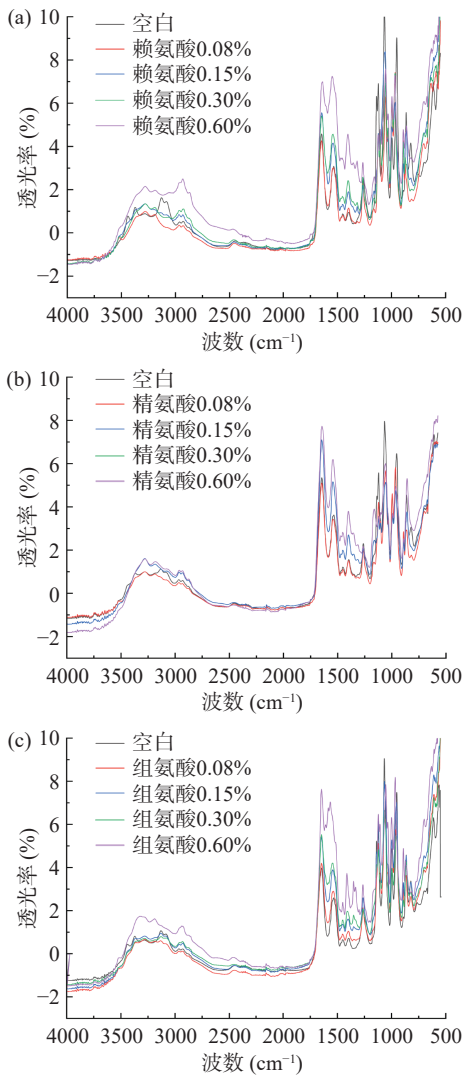


图 5 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 傅里叶红外图谱的影响

Fig.5 Effect of L-Lys, L-Arg, L-His on Fourier transform infrared spectra of MP

注: (a) 为 L-Lys 对 MP 傅里叶红外图谱的影响, (b) 为 L-Arg 对 MP 傅里叶红外图谱的影响, (c) 为 L-His 对 MP 傅里叶红外图谱的影响。

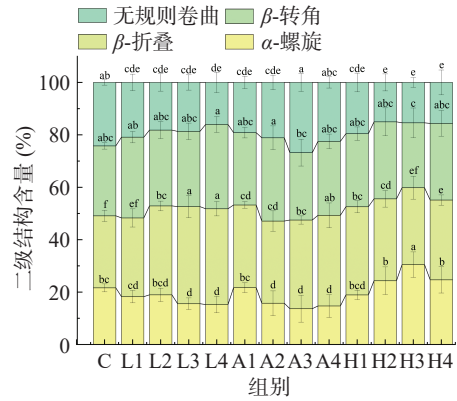


图 6 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 二级结构的影响

Fig.6 Effect of L-Lys, L-Arg, L-His on the secondary structure of MP

注: 图中 C、L1、L2、L3、L4、A1、A2、A3、A4、H1、H2、H3、H4 分别对应空白组、0.08% L-Lys 组、0.15% L-Lys 组、0.30% L-Lys 组、0.60% L-Lys 组、0.08% L-Arg、0.15% L-Arg、0.30% L-Arg、0.60% L-Arg、0.08% L-His、0.15% L-His、0.30% L-His、0.60% L-His, 图 8 同。

构^[38], 在高浓度下(H4 组), 过量 His 使体系 pH 趋近其等电点, 导致部分咪唑基去质子化, 正电荷量减少, 显著削弱静电排斥对 α -螺旋的稳定作用^[36]。

三种氨基酸均提高 β -折叠含量, 其中 L-Lys(除最低浓度 L1 组)和 L-Arg 组呈浓度依赖性递增 ($P < 0.05$), 这与静电排斥诱导 α -螺旋向 β -折叠转化相关^[26], L1 组因浓度不足未产生显著影响。L-His 组因咪唑基的 pH 缓冲作用, 高浓度时 α -螺旋与 β -折叠同步增加, 表现出独特的构象调控模式^[38]。在 β -转角和无规则卷曲层面, 除 0.30% L-Arg 组、0.30% L-His 组外, 其余试验组 β -转角率略高于空白组, 可能通过提升蛋白链柔性促进分子间交联; L-Lys 组和 L-His 组的无规则卷曲均小于空白组, 表明其诱导蛋白构象向有序结构 β -折叠、 α -螺旋转化, 而 L-Arg 组仅在 0.30% 时因过度展开出现局部无序聚集。

综上, L-Lys 和 L-Arg 通过 α -螺旋向 β -折叠单向转化优化凝胶网络, L-His 通过双向调控提供差异化稳定机制, 其中 0.30% L-Arg 组凭借最高 β -折叠含量实现品质协同优化。牦牛肉脂肪含量 $< 5\%$ 的特性使其凝胶构建高度依赖蛋白间相互作用, β -折叠的分子间氢键网络可弥补缺乏脂肪支撑的结构脆弱性^[32], 显著增强保水能力^[39], 为低脂牦牛肉制品开发提供了结构依据。

2.3.2 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 三级结构的影响

MP 荧光光谱的变化可以反映 MP 构象的变化。L-Lys、L-Arg、L-His 对牦牛肉中 MP 三级结构的影响如图 7 所示。三种氨基酸的添加均能使 MP 的荧光强度降低, 而且随着添加量的增加呈现递减的趋势, 并且荧光强度的峰值点均发生了红移, 此结果与李诗义^[35]的结果相似。推测原因可能是这三种氨基酸可以使色氨酸残基暴露在更加极性的微环境中^[40]。L-Arg 组 MP 的荧光强度下降幅度大于 L-His 组, 小

于 L-Lys 组。表明 L-Lys 三级结构展开程度更大, L-Arg 次之, L-His 最小。其中 0.60% L-Lys 组 MP 三级结构展开的程度最大。

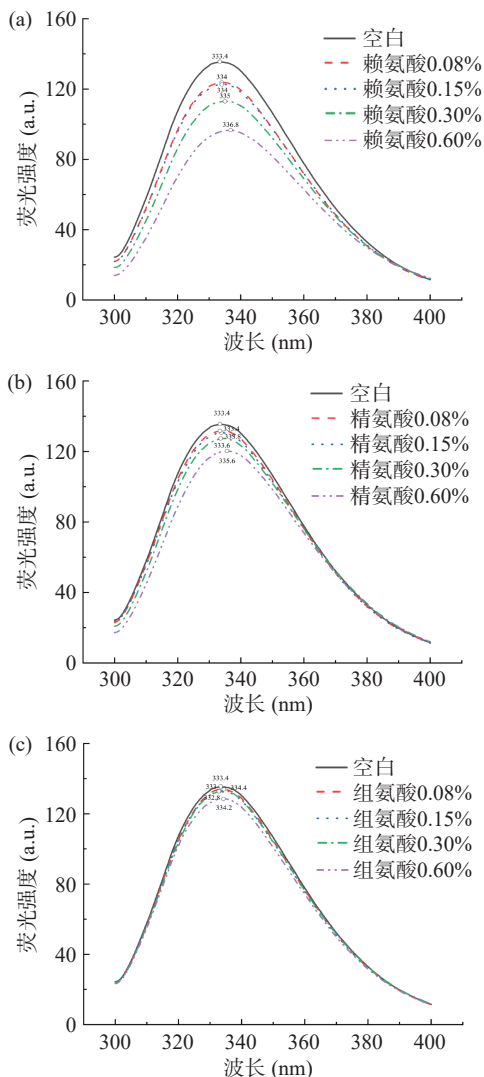


图 7 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 三级结构的影响

Fig.7 Effect of L-Lys, L-Arg, L-His on MP tertiary structure 注: (a)为 L-Lys 对 MP 三级结构的影响, (b)为 L-Arg 对 MP 三级结构的影响, (c)为 L-His 对 MP 三级结构的影响。

2.3.3 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP SDS-PAGE 电泳图谱的影响 SDS-PAGE 可直观反映肌纤维蛋白的分子质量分布及相互作用变化。如图 8 所示, 所有试验组与空白组均呈现肌球蛋白重链、肌动蛋白、肌球蛋白轻链和肌钙蛋白的特征条带, 未出现新条带或条带缺失, 表明三种碱性氨基酸未导致 MP 发生显著降解或亚基解离, 与刘旺等^[22]的研究结果一致, 验证了 MP 提取的完整性及实验体系的可靠性。

进一步对比条带强度发现, 试验组的肌球蛋白重链、肌动蛋白、肌球蛋白轻链及肌钙蛋白条带均显著深于空白组, 且呈现一定的浓度依赖性差异。L-Lys 和 L-Arg 组条带深度随浓度升高逐渐加深, 其中 0.60%L-Arg 组(溶解度最优)和 0.30%L-Lys 组(活性巯基最高)信号最强, 推测高浓度碱性氨基酸通过提升蛋白水溶性、暴露活性基团(如 ε-氨基、胍

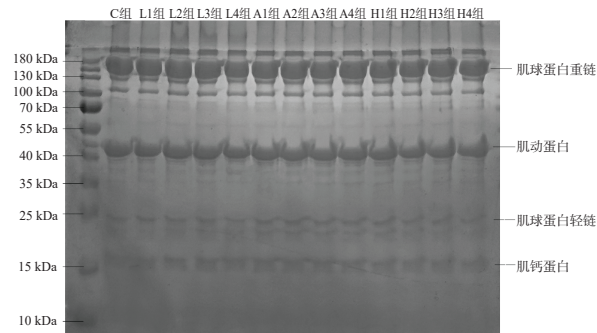


图 8 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP SDS-PAGE 电泳图谱的影响

Fig.8 Effect of L-Lys, L-Arg, L-His on MP SDS-PAGE electrophoresis

基), 增强了蛋白与 SDS 的结合效率, 与二者在溶解度(图 1a)和巯基活性(图 4)的优势一致。L-His 组条带强度整体高于空白组但无浓度依赖性, 可能与其诱导 α-螺旋与 β-折叠同步增加的构象特性相关, 适度的结构展开促进了分子间弱相互作用, 但未破坏蛋白完整性^[38]。

条带强度变化与功能特性存在机制关联: 表面疏水性升高(图 2)表明蛋白构象展开、疏水基团暴露, 与肌球蛋白重链条带加深一致, 反映碱性氨基酸通过破坏三级结构(图 7)增加 SDS 结合位点。

综上, SDS-PAGE 通过条带强度差异, 揭示碱性氨基酸通过非降解性构象调控改善 MP 溶解与交联能力, 为其作为盐替代物提供了分子层面的证据。

2.4 MP 凝胶特性分析

2.4.1 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 凝胶保水性和蒸煮损失的影响 保水性是反映 MP 凝胶性能的重要指标。L-Lys、L-Arg、L-His 对牦牛肉中 MP 凝胶保水性的影响如图 9(a)所示。总体来看, 所有试验组的保水性均显著高于空白组($P < 0.05$), 加入 L-Lys 和 L-Arg 的凝胶保水性增加的原因可能是其可以改变肌球蛋白的粒径和结构, 改善了蛋白凝胶的微观结构^[40], 二者通过静电中和作用降低 MP 分子间聚集(图 1b), 促使蛋白构象展开并暴露疏水基团(图 2), 同时诱导 α-螺旋向 β-折叠转化(图 6)以形成更均匀的凝胶网络, 且高浓度时(如 0.30%), L-Lys 的 ε-氨基和 L-Arg 的胍基还可通过增强活性巯基暴露(图 4)促进分子间交联来进一步优化持水能力, 从而提高了 MP 凝胶的保水性; 而 L-His 组的保水性提升与其咪唑基的 pH 缓冲功能相关, 低浓度时通过提高 MP 溶解度(图 1a)增加可溶性蛋白含量, 在热诱导下形成细小聚集物并构建蜂窝状三维结构^[38], 高浓度时(0.60%)其诱导 α-螺旋与 β-折叠同步增加的构象特性(图 6)则可能通过保留部分有序结构增强凝胶稳定性以提升保水效果, 且 L-His 组中, 添加量为 0.08% 的试验组显著高于空白组($P < 0.05$), 显著低于 0.60% 的试验组($P < 0.05$), 揭示 L-His 对 MP 凝胶保水性的浓度依赖性效应。综上可知, 三种氨基酸均能

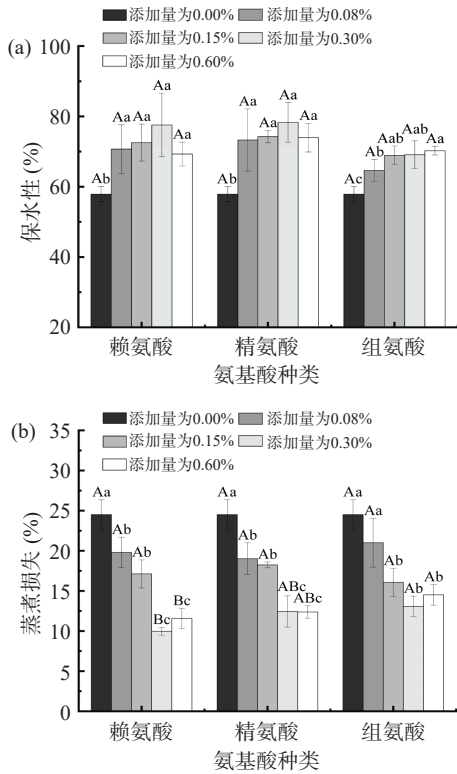


图 9 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 凝胶保水性和凝胶蒸煮损失的影响

Fig.9 Effect of L-Lys, L-Arg, L-His on water retention and cooking loss of MP gel

注: (a)为 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 凝胶保水性的影响, (b)为 L-Lys、L-Arg、L-His 对凝胶蒸煮损失的影响。

增加凝胶保水性, 表明三种氨基酸能够提升 MP 的凝胶性能。其中 0.30% 的 L-Lys 组和 L-Arg 组的凝胶保水性最佳。

L-Lys、L-Arg、L-His 对牦牛肉中 MP 凝胶蒸煮损失的影响如图 9(b)所示。总体来看, 所有试验组的 MP 凝胶蒸煮损失均低于空白组, 与 Wang 等^[41]结果相似, 他们通过向乳清蛋白中加入 L-Lys、L-Arg、L-His, 发现这三种氨基酸均能使乳清蛋白形成均匀、致密的凝胶, 改善凝胶的保水性, 推测 MP 和乳清蛋白的机理可能相同。除了 0.08% L-His 组与空白组差异不显著 ($P>0.05$), 其余各试验组均显著低于空白组 ($P<0.05$)。综上可知, 三种氨基酸均能降低 MP 凝胶的蒸煮损失, 表明三种氨基酸能够提升 MP 的凝胶性能。其中 0.30% L-Lys 组的凝胶蒸煮损失最低。

2.4.2 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 凝胶白度和凝胶强度的影响 凝胶的白度是重要的感官品质指标。L-Lys、L-Arg、L-His 对牦牛肉中 MP 凝胶白度值的影响如图 10(a)所示。总体来看, L-Lys 和 L-Arg 组的 MP 凝胶白度值均显著低于空白组 ($P<0.05$), 而且随着添加量的增加呈现递减的趋势, 原因可能是 L-Lys 和 L-Arg 自身为白色晶体, 二者分子结构中的 ϵ -氨基和胍基均为强极性基团, 可能通过增强界面光吸收、降低散射效率等方式改变蛋白凝胶网络对光的

反射路径, 导致凝胶白度随添加量增加而递减^[42]。这种颜色影响与官能团的极性效应共同作用, 使得高浓度组的白度降幅更为显著; L-His 组中, 仅有添加量为 0.08% 的试验组显著低于空白组 ($P<0.05$), 其余各组均无显著影响 ($P>0.05$)。低浓度 L-His (0.08%) 通过咪唑基轻微电离诱导 MP 局部展开, 致色氨酸暴露及局部聚集, 显著降低白度; 高浓度 ($\geq 0.15\%$) 时, 其诱导的 α -螺旋与 β -折叠增加促进分子均一分布, 且咪唑基缓冲饱和, 使白度恢复至空白水平。综上可知, L-Lys 和 L-Arg 可以降低 MP 凝胶的白度值, 且添加量为 0.60% 时下降幅度最大, L-His (除 0.08%) 不会对 MP 凝胶的白度值产生影响。

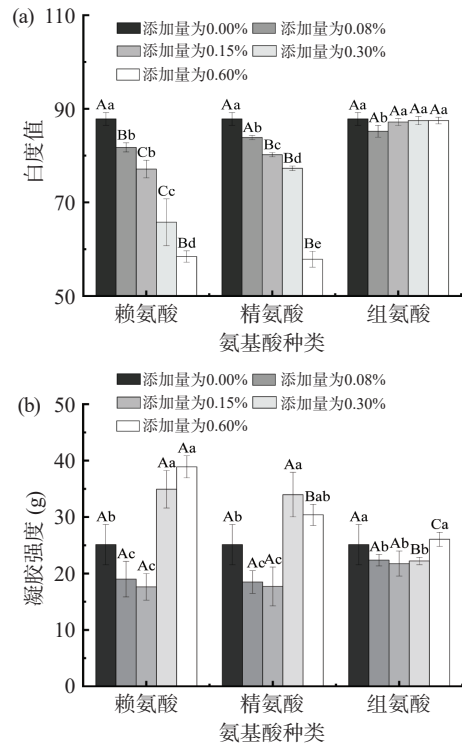


图 10 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 凝胶白度和凝胶强度的影响

Fig.10 Effect of L-Lys, L-Arg, L-His on whiteness and strength of MP gel

注: (a)为 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 凝胶白度值的影响; (b)为 L-Lys、L-Arg、L-His 对凝胶强度的影响。

如图 10(b)所示, 当 L-Lys、L-Arg、L-His 添加量为 0.08% 和 0.15% 时, 三组试验的 MP 凝胶强度均低于空白组, 其中 L-Lys 和 L-Arg 组显著降低 ($P<0.05$)。此结果与 Fu 等^[40]结果相似。而当添加量提升至 0.30% (L-Lys、L-Arg) 时, 凝胶强度显著高于空白组 ($P<0.05$); 0.60% L-His 组的凝胶强度较空白组有所提升, 但未达到显著水平 ($P>0.05$)。此结果与 Qin 等^[43]结果相似, 这种浓度依赖性效应的产生机制主要与氨基酸的电荷特性和诱导的构象变化有关, 在低浓度 ($\leq 0.15\%$) 条件下, L-Lys 和 L-Arg (可能也包括 L-His) 的强极性基团 (如 ϵ -氨基、胍基) 显著增加 MP 表面负电荷, 静电排斥效应占主导地位, 阻碍了蛋白-蛋白相互作用及有效交联网络的形成^[44],

这种电荷排斥的不利影响被放大,导致凝胶强度下降。而在高浓度($\geq 0.30\%$)条件下,氨基酸诱导 MP 构象展开(图 7),暴露出活性巯基(图 4)与疏水基团(图 2),这促进了二硫键交联和疏水相互作用,形成更致密的凝胶网络,同时 β -折叠含量的增加(图 6)也提升了网络稳定性^[26]。此时,构象调控与分子间交联形成的作用克服了电荷排斥效应,使凝胶强度显著提升;不过 L-His 的作用相对温和,需达到 0.60% 的高浓度才能有效提升凝胶强度。综上所述,三种氨基酸在 0.08%、0.15% 时均降低 MP 凝胶强度,在 0.60% 时均提高 MP 凝胶强度;在 0.30% 时,L-Lys 和 L-Arg 提高 MP 凝胶强度,而 L-His 组则未表现出提升。

2.4.3 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 凝胶流变性的影响

粘弹流变性是 MP 凝胶的重要特征。本实验主要通过 G' 和 G'' 来对 MP 凝胶的流变性特征进行分析。L-Lys、L-Arg、L-His 对牦牛肉中 MP 凝胶 G' 的影响如图 11(a)、图 11(b) 所示。 G' 又叫弹性模量,主要反映 MP 凝胶的弹性。总体来看,0.30% L-Lys 组、0.60% L-Lys 组和 0.60% L-Arg 组总体没有较大变化,保持平缓;除了这三组以外,其余各组均在 49~54 °C 缓慢下降,在 55~60 °C 迅速上升,在 60 °C 附近达到顶点,在 60~70 °C 迅速下降,在 70~85 °C 又缓慢上升,与雷振^[45] 结果相似。当温度超过 55 °C, G' 迅速上升,这个阶段是凝胶形成阶段,MP 之间开始发生交联并形成较为疏松的网络结构;在 64 °C G' 开始迅速下降,这个阶段是凝胶的减弱阶段,肌球蛋白尾部展开,导致凝胶网络被破坏和肌球蛋白的分解;在 70 °C 以后,凝胶再次开始上升,这个阶段是凝胶的增强,MP 充分展开和变性,形成了稳定且不可逆的三维网状凝胶结构^[46]。在温度为 55~70 °C 之间,L-Lys 组和 L-Arg 组中,所有试验组的 G' 均明显低于空白组,且随着添加量的增多呈现递减的趋势。L-His 组中,所有试验组的 G' 均低于空白组,但各组之间没有明显差异。在 80~85 °C 时,0.60% L-His 组、0.30% 和 0.60% 的 L-Lys 组、0.08% 和 0.30% 的 L-Arg 组高于空白组。在降温过程中,添加量为 0.30%、0.60% 的 L-Lys 和 L-Arg 组的 G' 均高于空白组;添加量为 0.60% 的 L-His 组的 G' 略低于空白组,其余试验组均低于空白组。上述 G' 动态变化表明,碱性氨基酸对 MP 凝胶弹性的调控与温度、浓度密切相关:低温阶段(≤ 60 °C),低浓度氨基酸(尤其是强极性的 L-Lys、L-Arg)通过增加 MP 表面负电荷强化分子间静电排斥,抑制凝胶网络形成,导致 G' 低于空白组;高温阶段(≥ 70 °C),高浓度氨基酸(如 L-Lys、L-Arg $\geq 0.30\%$)诱导 MP 构象充分展开,通过巯基交联和疏水相互作用构建稳定网络,使 G' 显著高于空白组,且强极性氨基酸实现有效调控的浓度阈值低于弱极性 L-His,该规律与凝胶强度等静态指标的变化机制一致。

G'' 反映材料的黏性大小。L-Lys、L-Arg、L-His

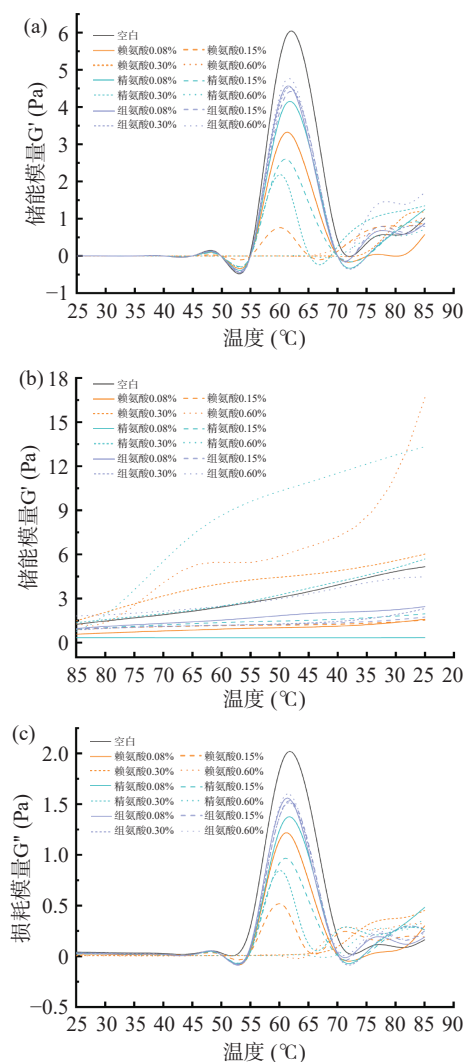


图 11 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 凝胶流变性的影响

Fig.11 Effect of L-Lys, L-Arg, L-His on rheological properties of MP gels

注:(a)为 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 凝胶 G' 的影响(升温过程),(b)为 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 凝胶 G' 的影响(降温过程),(c)为 L-Lys、L-Arg、L-His 对 MP 凝胶 G'' 的影响。

对牦牛肉中 MP 凝胶 G'' 的影响如图 11(c) 所示。总体来看,0.30% L-Lys 组、0.60% L-Lys 组和 0.60% L-Arg 组总体的趋势是先保持平缓,在 65 °C 附近开始上升;除了这三组以外,其余各组均是在 50~60 °C 上升,在 60 °C 附近达到顶点,在 60~70 °C 迅速下降,在 70~85 °C 又缓慢上升。在 50~70 °C 所有试验组的 G'' 均低于空白组;在 70~75 °C 时,0.08% L-Lys 组、0.08% L-Arg 组、0.15% L-Arg 组和 0.30% L-His 组的 G'' 低于空白组;在 75~80 °C 时,仅有 0.08% L-Lys 组低于空白组;在 80~85 °C 时,所有组的 G'' 均高于空白组。上述结果表明,MP 凝胶黏性(G'')的温度-浓度依赖性特征与氨基酸的电荷特性及构象调控能力密切相关:低浓度时电荷排斥主导低温阶段黏性抑制,高浓度时构象交联主导高温阶段黏性增强,揭示了碱性氨基酸通过动态调控蛋白相互作用优化凝胶网络的机制,为牦牛肉制品热加工中的温度工艺优化提供了流变学依据。

3 结论

本研究证实,在 0.30%~0.60%(w/v)添加量下, L-Lys、L-Arg 和 L-His 均能改善牦牛肉 MP 的氧化状态、结构与凝胶性能。L-Lys(0.30%) 在降低蒸煮损失(降幅达 58%)和增强高温($\geq 70\text{ }^{\circ}\text{C}$)凝胶响应性方面效果显著; L-Arg(0.60%)则在提升溶解度(最高 86.38%,较空白提高约 25%)、抑制浊度方面表现最优。L-His(0.60%)可提升凝胶强度(增幅 4.2%),其改善作用相对温和。然而,高浓度 L-Arg(0.60%)显著增加了蛋白质氧化损伤(羰基含量最高达 5.54 nmol/mg), L-Lys 和 L-Arg 还导致凝胶白度随浓度增加而降低。牦牛肉特有的高肌红蛋白含量加剧了氧化风险,而其低脂特性则使凝胶结构优化高度依赖 L-Lys/L-Arg 诱导的 β -折叠增加(如 0.30% L-Arg 组达 37.038%)及其促进的分子间交联。综合而言, L-Lys 和 L-Arg 在优化牦牛肉 MP 凝胶性能方面更具优势,但需严格控制浓度(推荐 0.30%)以平衡氧化风险; L-His 则提供了一种氧化风险较低但效果相对温和的替代选择。本研究为开发基于碱性氨基酸类型(L-Lys/L-Arg 优先)与浓度(0.30%~0.60%)适配的低钠低磷牦牛肉制品提供了理论依据。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] TIAN Jiachun, HAN Ling, YU Qunli, et al. Changes in tenderness and cathepsins activity during post mortem ageing of yak meat [J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2013, 93(3): 321–328.
- [2] DELGADO-PANDO G, FISCHER E, ALLEN P, et al. Salt content and minimum acceptable levels in whole-muscle cured meat products [J]. *Meat Science*, 2018, 139: 179–186.
- [3] 付渊. L-精氨酸、L-赖氨酸对鸡胸肉中肌球蛋白凝胶特性的影响[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016. [FU Yuan. Study on the influences of L-Lys/L-Arg on the gel properties of chicken breast myosin[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2016.]
- [4] LI Chuang, SHI Jiyong, ZHOU Chenguang, et al. Effects of sodium chloride substitutes on physicochemical properties of salted beef [J]. *Food Chemistry*, 2023, 20: 100885.
- [5] CHEN Li, BAO Pengqi, WANG Yan, et al. Improving quality attributes of refrigerated prepared pork chops by injecting L-Arginine and L-Lysine solution [J]. *LWT*, 2022, 153: 112423.
- [6] 梅甜恬, 唐洁, 夏杨毅, 等. 卤料提取物对氧化诱导鸭肉肌原纤维蛋白功能特性和结构的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(7): 116–122. [MEI Tiantian, TANG Jie, XIA Yangyi, et al. Effects of spice extracts on structural and functional properties of oxidation-induced duck myofibrillar protein [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(7): 116–122.]
- [7] 祝桂林, 彭莱. 低钠盐用食品添加剂氯化钾质量研究 [J]. *盐科学与化工*, 2017, 46(6): 7–9. [ZHU Guilin, PENG Lai. Study on the quality of potassium chloride as food additive for low sodium salt [J]. *Journal of Salt Science and Chemical Industry*, 2017, 46(6): 7–9.]
- [8] ZHANG Yawei, CHENG Qiaofen, YAO Yao, et al. A preliminary

study: Saltiness and sodium content of aqueous extracts from plants and marine animal shells [J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 238(4): 565–571.

- [9] PONSINGH R, BABU R N, RUBAN S W, et al. Effect of tapioca starch on physico-chemical and sensory characteristics of buffalo meat sausage [J]. *Journal of Food Technology*, 2011, 9(1): 32–35.
- [10] 刘孝沾, 吕广英, 李丹. 大豆蛋白在肉制品加工中应用 [J]. *肉类工业*, 2017(4): 54–56. [LIU Xiaozhan, LÜ Guangying, LI Dan. Application of the soybean protein in meat products [J]. *Meat Industry*, 2017(4): 54–56.]
- [11] LIU W M, McCLEMENTS D J, JIN Z Y, et al. Design of colloid structure to realize gel salt reduction: A review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2025, 65(12): 2281–2294.
- [12] GUO X Y, PENG Z Q, ZHANG Y W, et al. The solubility and conformational characteristics of porcine myosin as affected by the presence of L-lysine and L-histidine [J]. *Food Chemistry*, 2015, 170: 212–217.
- [13] LEI Zhen, FU Yuan, XU Peng, et al. Effects of L-arginine on the physicochemical and gel properties of chicken actomyosin [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92: 1258–1265.
- [14] GUO Xiuyun, GAO Feng, ZHANG Yawei, et al. Effect of L-histidine and L-lysine on the properties of oil-in-water emulsions stabilized by porcine myofibrillar proteins at low/high ionic strength [J]. *LWT*, 2021, 141: 110883.
- [15] 栗俊广, 陈宇豪, 王登顺, 等. 鹰嘴豆分离蛋白对减盐猪肉糜凝胶品质的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(1): 143–148. [LI Jinguang, CHEN Yuhao, WANG Dengshun, et al. Effects of chickpea protein isolate on gelation quality of pork meat batters with reduced salt concentrations [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(1): 143–148.]
- [16] 郭秀云. HL-低钠盐及其组分组氨酸和赖氨酸对猪肉肌球蛋白理化特性与热诱导凝胶特性的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016. [GUO Xiuyun. Effect of HL-salt substitute and its components histidine and lysine on the physico-chemical and heat-induced gel properties of pork myosin [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.]
- [17] CHIN K B, GO M Y, XIONG Y L. Konjac flour improved textural and water retention properties of transglutaminase-mediated, heat-induced porcine myofibrillar protein gel: Effect of salt level and transglutaminase incubation [J]. *Meat Science*, 2009, 81(3): 565–572.
- [18] OLIVER C N, AHN B W, MOERMAN E J, et al. Age-related changes in oxidized proteins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(12): 5488–5491.
- [19] SIES H, FITZPATRICK P F, NEWMAN A, et al. Archives of biochemistry and biophysics: 80th anniversary [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2022, 726: 109295.
- [20] GUO Xijuan, WANG Ruiqi. Changes in secondary structure of myofibrillar protein and its relationship with water dynamic changes during storage of battered and deep-fried pork slices [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2018, 27(6): 1667–1673.
- [21] JIANG Wenxin, HE Yufan, XIONG Shanbai, et al. Effect of mild ozone oxidation on structural changes of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myosin [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2017, 10(2): 370–378.
- [22] 刘旺, 冯美琴, 孙健, 等. 超高压条件下亚麻籽胶对猪肉肌原纤维蛋白凝胶特性的影响 [J]. *食品科学*, 2019, 40(7): 101–107. [LIU Wang, FENG Meiqin, SUN Jian, et al. Influence of ultra high pressure treatment on the effect of flaxseed gum on the properties of

- pork myofibrillar protein gel[J]. *Food Science*, 2019, 40(7): 101-107.]
- [23] MA Fei, CHEN Conggui, ZHENG Lei, et al. Effect of high pressure processing on the gel properties of salt-soluble meat protein containing CaCl_2 and κ -carrageenan[J]. *Meat Science*, 2013, 95(1): 22-26.
- [24] CHEN Xing, LI Yong, ZHOU Ruiyun, et al. L-histidine improves water retention of heat-induced gel of chicken breast myofibrillar proteins in low ionic strength solution[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2016, 51(5): 1195-1203.
- [25] 李可, 李燕, 康超娣, 等. 常压等离子体射流对鸡肉肌原纤维蛋白结构和流变特性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(19): 124-131. [LI Ke, LI Yan, KANG Chaodi, et al. Effect of atmospheric pressure plasma jet on structural and rheological properties of chicken myofibrillar protein[J]. *Food Science*, 2020, 41(19): 124-131.]
- [26] 曹云刚, 梁光灿, 张鑫, 等. 碱性氨基酸调控肌原纤维蛋白加工性能及肉品质研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(21): 341-348. [CAO Yungang, LIANG Guangcan, ZHANG Xin, et al. Basic amino acids regulate the functional properties of myofibrillar protein and the quality of meat products: A comprehensive review [J]. *Food Science*, 2022, 43(21): 341-348.]
- [27] 李锦锦, 唐善虎, 李思宁, 等. 真空冷冻干燥大蒜粉对 Fenton 氧化体系中牦牛肉肌原纤维蛋白乳化特性的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(20): 70-77. [LI Jinjin, TANG Shanhu, LI Sining, et al. Effect of freeze-dried garlic powder on emulsification properties of yak meat myofibrillar protein in the Fenton oxidation system[J]. *Food Science*, 2022, 43(20): 70-77.]
- [28] 朱潘红. 氨基酸增溶对罗非鱼肌球蛋白热诱导凝胶形成的影响及机理[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2018. [ZHU Panhong. Effect of amino acid on the formation and mechanism of heat-induced gel of tilapia myosin[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2018.]
- [29] 刘海梅, 夏文娟, 王静. 鲢肌球蛋白凝胶过程中化学键变化与动态流变特性的关系[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(5): 80-85. [LIU Haimei, XIA Wenjuan, WANG Jing. The relationship between chemical bonds and dynamical rheological behavior during myosin gel forming from silver carp[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(5): 80-85.]
- [30] DAVIES M J. Protein oxidation and peroxidation[J]. *The Biochemical Journal*, 2016, 473(7): 805-825.
- [31] STADTMAN E R, LEVINE R L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins[J]. *Amino Acids*, 2003, 25(3): 207-218.
- [32] CHEN Cheng, HAN Ling, YU Qunli, et al. Color stability and antioxidant capacity of yak meat as affected by feeding with pasture or grain[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2015, 95(2): 189-195.
- [33] BAO Pengqi, CHEN Li, HU Yue, et al. L-arginine and L-lysine retard aggregation and polar residue modifications of myofibrillar proteins: Their roles in solubility of myofibrillar proteins in frozen porcine *Longissimus lumborum*[J]. *Food Chemistry*, 2022, 393: 133347.
- [34] KRISTINSSON H G, HULTIN H O. Changes in conformation and subunit assembly of cod myosin at low and high pH and after subsequent refolding[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(24): 7187-7196.
- [35] 李诗义. L-精氨酸和 L-赖氨酸对鸡肉香肠保水与质构影响机制的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018. [LI Shiyi. Mechanism study of the effects of L-arginine and L-lysine on water holding capacity and texture of chicken sausage[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2018.]
- [36] CAO Yingying, XIA Tianlan, ZHOU Guanghong, et al. The mechanism of high pressure-induced gels of rabbit myosin[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2012, 16: 41-46.
- [37] 代振清. 超高压—精氨酸增溶处理对罗非鱼肌球蛋白结构和凝胶特性的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2016. [DAI Zhenqing. Effects of high pressure processing and L-arginine solubilization on conformational characteristics and gelation properties of tilapia myosin[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2016.]
- [38] GAO Ruichang, WANG Yanmin, MU Jianlou, et al. Effect of L-histidine on the heat-induced aggregation of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) myosin in low/high ionic strength solution[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 75: 174-181.
- [39] KOBAYASHI Y, MAYER S G, PARK J W. FT-IR and Raman spectroscopies determine structural changes of tilapia fish protein isolate and surimi under different comminution conditions[J]. *Food Chemistry*, 2017, 226: 156-164.
- [40] FU Yuan, ZHENG Yadong, LEI Zhen, et al. Gelling properties of myosin as affected by L-lysine and L-arginine by changing the main molecular forces and microstructure[J]. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20(sup1): S884-S898.
- [41] WANG Yaosong, ZHAO Jing, ZHANG Weiwei, et al. Modification of heat-induced whey protein gels by basic amino acids[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100: 105397.
- [42] 马文慧, 邝吉卫, 李保玲, 等. 氧化条件下精氨酸对肌原纤维蛋白结构及凝胶性能的调控[J]. *食品科学*, 2021, 42(24): 24-31. [MA Wenhui, KUANG Jiwei, LI Baoling, et al. Effect of L-arg concentration on structural and gelling properties of myofibrillar protein under oxidative conditions[J]. *Food Science*, 2021, 42(24): 24-31.]
- [43] QIN Hao, XU Peng, ZHOU Cunliu, et al. Effects of L-arginine on water holding capacity and texture of heat-induced gel of salt-soluble proteins from breast muscle[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 63(2): 912-918.
- [44] 徐幸莲, 周光宏, 黄鸿兵, 等. 蛋白质浓度、pH 值、离子强度对兔骨骼肌肌球蛋白热凝胶特性的影响[J]. *江苏农业学报*, 2004, 20(3): 159-163. [XU Xinglian, ZHOU Guanghong, HUANG Hongbing, et al. Effects of protein concentration, pH value and ionic strength on heat-induced gel properties of myosin from rabbit skeletal muscle[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2004, 20(3): 159-163.]
- [45] 雷振. L-精氨酸和 L-赖氨酸对鸡肉肌动球蛋白及其凝胶特性的影响[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016. [LEI Zhen. Effects of L-arginine and L-lysine on the gelling properties of actomyosin gels and its mechanism[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2016.]
- [46] 郭璐瑶. 畜禽混合肉肌原纤维蛋白凝胶特性及膳食纤维复合牛肉香肠的开发研究[D]. 长春: 吉林大学, 2024. [GUO Luyao. Characterization of myofibrillar protein gel of livestock and poultry mixed meat and development of dietary fiber composite beef sausage[D]. Changchun: Jilin University, 2024.]