

# 基于非靶向代谢组学分析牛肉干法成熟过程代谢产物的变化

刘 梦, 张顺亮, 臧明伍\*, 赵 冰, 朱 宁, 李 素, 吴倩蓉, 刘博文, 赵 燕, 乔晓玲, 王守伟\*  
(中国肉类食品综合研究中心, 北京 100068)

**摘要:** 以不同成熟时间的牛上脑肉为研究对象, 借助超高效液相色谱-质谱技术, 基于非靶向代谢组学方法分析干法成熟过程中牛肉代谢产物的变化情况, 并对代谢产物进行多元统计分析和代谢通路分析。结果表明, 牛肉干法成熟过程中有41种代谢物被鉴定为差异代谢物, 包括氨基酸类物质21种、脂肪酸类物质16种、核苷酸类物质2种以及其他代谢物2种。通过对差异代谢物的种类和相对含量进行分析, 发现随着成熟时间的延长, 差异代谢物的种类和相对含量显著增加。通过对差异代谢物的代谢途径进行分析, 筛选出5条关键代谢通路, 分别为嘌呤代谢, 脂肪酸降解, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢, 三羧酸循环, 这些代谢途径对成熟牛肉风味和营养物质的形成具有促进作用。

**关键词:** 干法成熟; 牛肉; 代谢组学; 差异代谢物; 代谢通路

## Non-Targeted Metabolomics Analysis of Metabolite Changes in Beef during Dry Aging

LIU Meng, ZHANG Shunliang, ZANG Mingwu\*, ZHAO Bing, ZHU Ning, LI Su, WU Qianrong,  
LIU Bowen, ZHAO Yan, QIAO Xiaoling, WANG Shouwei\*  
(China Meat Research Center, Beijing 100068, China)

**Abstract:** The study aimed to investigate the dynamic changes of metabolites in beef high rib with different dry-aging periods by non-targeted metabolomics based on ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). Multivariate statistical analysis and metabolic pathway analysis were performed on the metabolites. The results showed that 41 differential metabolites were identified in dry-aged beef, including 21 amino acids, 16 fatty acids, 2 nucleotides and 2 other metabolites. The types and relative contents of differential metabolites increased significantly with prolonged aging time. Five key metabolic pathways were identified, including purine metabolism; fatty acid degradation; alanine, aspartate and glutamate metabolism; arginine and proline metabolism; and the tricarboxylic acid (TCA) cycle, which could promote the formation of flavor and nutrients in dry-aged beef.

**Keywords:** dry aging; beef; metabolomics; differential metabolites; metabolic pathways

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220629-328

中图分类号: TS251.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)10-0249-08

引文格式:

刘梦, 张顺亮, 臧明伍, 等. 基于非靶向代谢组学分析牛肉干法成熟过程代谢产物的变化[J]. 食品科学, 2023, 44(10): 249-256. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220629-328. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Meng, ZHANG Shunliang, ZANG Mingwu, et al. Non-targeted metabolomics analysis of metabolite changes in beef during dry aging[J]. Food Science, 2023, 44(10): 249-256. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220629-328. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-06-29

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2021YFD2100501-5)

第一作者简介: 刘梦(1990—)(ORCID: 0000-0002-3981-8286), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为肉制品加工与质量安全控制。

E-mail: 526604813@qq.com

\*通信作者简介: 臧明伍(1981—)(ORCID: 0000-0002-1302-316X), 男, 教授级高级工程师, 博士, 研究方向为肉品科学与食品安全。E-mail: zangmw@126.com

王守伟(1961—)(ORCID: 0000-0002-6390-4803), 男, 教授级高级工程师, 硕士, 研究方向为食品安全与食品加工。E-mail: cmrcwsw@126.com

干法成熟是生产高品质牛肉的方法之一。成熟过程中,牛肉的质地、风味等品质会发生明显的变化<sup>[1]</sup>,但同时牛肉表面也会发生失水、氧化以及微生物附着等现象,在食用前需将表面部分剔除,因此成熟牛肉的成本较高,在日本及欧美等发达国家和地区较为流行。近年来,随着国人消费水平的提高,成熟牛肉因其独特的口感和风味深受高端消费者的青睐,国内高端西餐厅也开始采用干法成熟技术生产高品质牛肉,以满足消费者对高品质生活的需求。

近年来,许多学者在成熟牛肉的质构和风味方面开展了大量研究。质构方面,有研究表明干法成熟可显著降低肉的剪切力<sup>[2-4]</sup>,同时可以提升牛肉的多汁性,并且与成熟时间和成熟温度有关<sup>[5-6]</sup>;风味方面,有研究表明干法成熟牛肉具有浓厚的牛肉味、烧烤味、鲜味和较浓的油炸味<sup>[7-9]</sup>。目前,针对干法成熟牛肉的报道集中在牛肉的品质和风味物质检测等方面,而肉中氨基酸、脂肪酸等代谢产物的变化直接影响了肉的品质,但针对干法成熟过程中牛肉代谢产物变化的研究较少。

代谢组学是研究生物样品中小分子代谢产物,如有机酸、脂肪酸、氨基酸、糖等物质在生物系统中变化的一种方法<sup>[10]</sup>,已被广泛运用在食品研究中<sup>[11-15]</sup>。目前,运用代谢组学方法探究干法成熟过程牛肉代谢产物的变化研究较少。常用的代谢组学分析技术有气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)、核磁共振光谱等<sup>[16-17]</sup>。通常LC-MS用于分析小分子质量的非挥发性化合物,如有机酸、氨基酸、核苷酸和某些酯类等<sup>[18-19]</sup>。

本实验以不同成熟时间的牛上脑肉为研究对象,借助超高效液相色谱-质谱(ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)技术,基于非靶向代谢组学分析干法成熟过程中牛肉代谢产物,通过主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)等多元统计分析进行差异代谢物筛选,并对差异代谢物进行关键代谢通路分析,探究干法成熟过程中牛肉代谢产物的变化,以期为牛肉干法成熟技术的开发与应用提供一定的理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

牛上脑肉 河北福成五丰食品股份有限公司; 甲醇、乙腈、乙酸铵、甲酸、乙酸(均为色谱纯) 德国CNW公司。

### 1.2 仪器与设备

牛肉干法成熟设备 中国肉类食品综合研究中心自主研发; Sorvall LYNX 6000离心机、UHPLC Orbitrap Q Exactive-HX UPLC-MS仪 美国Thermo Fisher Scientific公司; JXFSTPRP-24L 全自动样品快速研磨仪 上海净信实业发展有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品制备

将经冷却排酸的冷冻牛上脑肉在4℃冷库中解冻至中心温度达到0℃后,将其分割成大小约为25 cm×15 cm×15 cm均匀的肉块。放入干法成熟设备中进行成熟,成熟条件为4℃、相对湿度85%,成熟时间为21 d。具体实验条件见表1。取样时将牛肉表面剔除,选取牛肉内部作为待测样品,每个时间点取6个平行样品进行测定。

表1 实验条件

成熟时间/d	温度/℃	相对湿度/%
0	4	85
7	4	85
14	4	85
21	4	85

#### 1.3.2 样品水分含量测定

GB 5009.3—2016参照《食品中水分的测定》中“第一法 直接干燥法”对成熟过程中牛肉水分含量进行测定。

#### 1.3.3 样品前处理

精确称取50 mg组织样本到1.5 mL EP管中,加入1 000 μL甲醇-乙腈-水(2:2:1, V/V)溶液;加入2个小钢珠,在-80℃冰箱中放置2 min后,放入研磨机中研磨(60 Hz, 2 min);冰水浴中超声提取10 min; -20℃静置30 min; 4℃、13 000 r/min离心15 min,取上清液,使用0.22 μm的有机相针孔过滤器过滤后,转移到进样小瓶,进行LC-MS分析。质控样本(quality control, QC)由所有样本的提取液等体积混合制备而成,每个QC的体积与样本相同。

#### 1.3.4 代谢组学数据采集

LC条件: ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);柱温30℃;流速0.3 mL/min;进样量5 μL。正离子模式流动相: A为水(含20 mmol/L乙酸铵), B为乙腈(含0.1%甲酸)。正离子模式洗脱程序: 0~2 min, 95%~70% A, 5%~30% B; 2~21 min, 70%~5% A, 30%~95% B; 5% A, 95% B, 保持3 min, 然后降至95% A, 5% B, 保持5 min。负离子模式流动相: A为水(含0.05%

乙酸), B为甲醇(含0.05%乙酸)。负离子模式洗脱程序: 0~1 min, 98%~50% A、2%~50% B; 1~10 min, 50%~20% A、50%~80% B; 10~14 min, 20%~2% A、80%~98% B; 2% A、98% B, 保持2 min, 然后降至98% A、2% B, 保持2 min。

MS条件: 采用Full MS-dd-MS<sup>2</sup>扫描模式(70~1 050 Da), 在正离子和负离子条件下采集数据; 碰撞能量20/30/40 eV; 鞘气流量40 arb; 辅助气体流量15 arb; 喷雾电压3.4 kV; 毛细管温度350 °C; 辅助气体加热温度450 °C; Full MS分辨率为120 000; dd-MS<sup>2</sup>分辨率为15 000。

#### 1.4 数据处理

通过Compound Discoverer 3.2软件对原始图谱进行峰匹配与峰面积提取。使用SIMCA V16.0软件进行PCA和OPLS-DA, 通过变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP)值结合Student *t*检验筛选差异代谢物。通过MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>)检索差异代谢物所在的代谢通路, 并通过富集分析, 筛选关键代谢通路。

## 2 结果与分析

### 2.1 干法成熟过程牛肉水分含量测定

表2 不同成熟时间牛肉的水分含量

Table 2 Moisture contents of beef at different aging times

成熟时间/d	0	7	14	21
水分质量分数/%	68.16±0.13 <sup>a</sup>	61.34±0.27 <sup>b</sup>	56.55±0.11 <sup>c</sup>	52.78±0.20 <sup>d</sup>

注: 同列不同字母表示差异显著( $P \leq 0.05$ )。

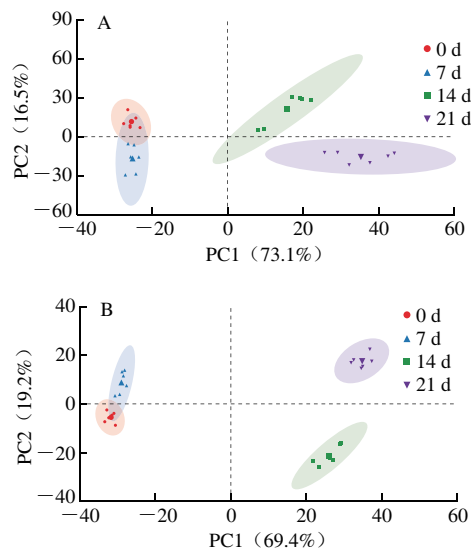
由表2可知, 随着成熟时间的延长, 牛肉水分含量显著下降( $P \leq 0.05$ )。样品的水分含量可能会对代谢产物的测定结果造成影响, 因此, 以成熟0 d样品的水分含量为基准, 将成熟7、14 d和21 d的样品测得的代谢产物结果分别乘以相应的换算系数(0.90、0.83和0.77)以消除水分含量对代谢产物测定结果的影响。后续分析结果均是在消除水分含量的影响下进行的分析。

### 2.2 牛肉干法成熟过程代谢产物的多元统计分析

#### 2.2.1 牛肉干法成熟过程代谢产物的PCA

如图1所示, 正离子和负离子模式下PC1和PC2累计贡献率分别为89.6%和88.6%, 表明PCA得分图包含了样品的大部分信息。得分图中各样品越分散表明代谢产物相差越明显。正离子和负离子模式下, 成熟7、14 d和21 d的样品可明显区分开, 而成熟0 d和7 d的样品在得分图上有部分重合, 说明成熟7~21 d时牛肉的代谢产物变化较明显, 而成熟0~7 d时代谢产物虽存在一定的差异, 但也有部分相似, 这可能是由于成熟时间的不

同造成的。随着成熟时间的延长, 内源酶水解蛋白质、脂肪等物质产生的水解产物如肽类、氨基酸、脂肪酸等物质种类和相对含量不断增加, 同时代谢产物进一步进行其他反应, 使代谢产物的种类和含量发生动态变化, 因而成熟时间越长, 代谢产物差异越大。这与Kim<sup>[6]</sup>、Dashdorj<sup>[20]</sup>、Koutsidis<sup>[21]</sup>等的研究结果一致。



A.正离子模式; B.负离子模式; 图2、3同。

图1 不同成熟时间牛肉代谢产物的PCA得分图

Fig. 1 PCA score plots of beef metabolites at different aging times

#### 2.2.2 牛肉干法成熟过程代谢产物的OPLS-DA结果

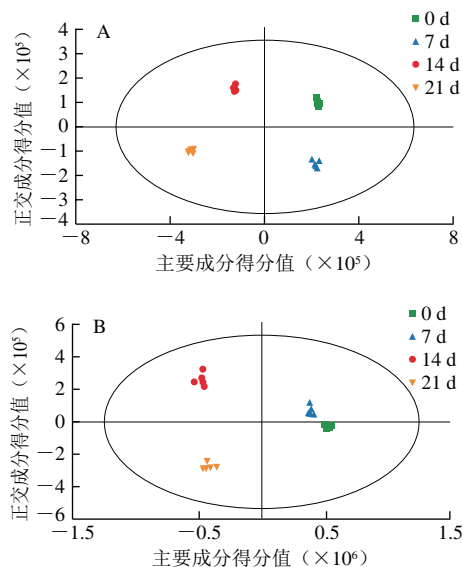


图2 不同成熟时间牛肉代谢产物的OPLS-DA得分图

Fig. 2 OPLS-DA score plots of beef metabolites at different aging times

牛肉干法成熟过程中共检测到126种代谢产物, 为准确识别牛肉成熟过程中的差异代谢产物, 进一步使用OPLS-DA模型对样品进行分析。OPLS-DA是多元统计

分析方法中的一种常用的回归建模方法,通过偏最小二乘法及线性判别,剔除代谢产物中与分类变量不相关的正交变量,实现数据可视化<sup>[22]</sup>。 $R^2$ 代表模型对变量 $Y$ 的解释性, $Q^2$ 表示模型的可预测性,当 $R^2$ 值越接近1,表明模型的真实性和越好;原模型 $Q^2$ 值越接近1,表明模型的预测效果越好<sup>[22]</sup>。由图2可知,所有样品均处于95%置信区间内,且不同成熟时间的样品能够明显区分开。正离子模式下模型 $R^2=0.943$ 、 $Q^2=0.904$ ,负离子模式下模型 $R^2=0.967$ 、 $Q^2=0.918$ ,说明本模型可以很好地解释成熟过程中牛肉代谢产物的差异。

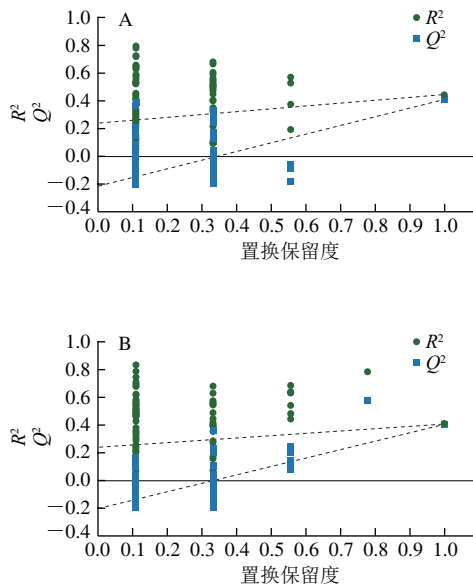


图3 不同成熟时间牛肉代谢产物的置换检验图

Fig. 3 Permutation test plots of beef metabolites at different aging times

为避免模型出现过度拟合,对模型进行了200次置换检验,结果如图3所示。正离子模式下置换检验模型 $R^2=0.239$ 、 $Q^2=-0.216$ ,负离子模式下模型 $R^2=0.23$ 、 $Q^2=-0.202$ ,置换检验随机模型的 $Q^2$ 值均小于原模型的 $Q^2$ 值,且 $Q^2$ 回归线的截距为负,说明原模型不存在过拟合现象<sup>[22]</sup>。

### 2.3 牛肉干法成熟过程中差异代谢物的筛选与分析

#### 2.3.1 牛肉干法成熟过程差异代谢物的筛选

基于OPLS-DA模型分析结果,将VIP值大于1.2且 $P$ 值小于0.05的代谢产物作为牛肉干法成熟过程中的差异代谢物,结果如表3所示。

由表3可知,牛肉干法成熟过程中共筛选出41种差异代谢物,分别为氨基酸类代谢物21种、脂肪酸类代谢物16种、核苷酸类代谢物2种以及其他代谢物2种。其中,氨基酸类物质具有呈味特性,如 $L$ -天冬氨酸、酪氨酸、 $L$ -谷氨酸、 $L$ -丙氨酸、苯丙氨酸等呈鲜味, $L$ -丝氨

酸、羟脯氨酸、 $L$ -丙氨酸等呈甜味, $L$ -组氨酸呈苦味,这些呈味氨基酸有助于成熟牛肉滋味的形成;筛选出的差异代谢物中还包括必需氨基酸和必需脂肪酸,如 $L$ -甲硫氨酸、苯丙氨酸、 $L$ -亮氨酸、花生四烯酸、亚油酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸等都是人体必需的营养物质,说明成熟有助于氨基酸、脂肪酸等小分子营养物质的生成;同时,氨基酸、脂肪酸、核苷酸等代谢产物也是重要的风味前体物质,可参与滋味形成、脂质降解或美拉德反应,对后续加工过程中成熟牛肉风味的形成有促进作用<sup>[23-24]</sup>。

表3 成熟过程中牛肉的差异代谢物

Table 3 Differential metabolites in beef during the dry-aging process

序号	保留时间/min	$m/z$	差异代谢物	离子模式	VIP值	$P$ 值	类别
1	0.779	176.048	$N$ -乙酰- $L$ -天冬氨酸	+	1.231	0.047	氨基酸类
2	0.783	274.096	精氨酸琥珀酸	+	1.673	0.000	
3	0.785	88.032	脱氢丙氨酸	+	1.393	0.000	
4	0.787	162.069	$N$ -乙酰- $L$ -谷氨酸	+	1.699	0.000	
5	0.793	134.038	$L$ -天冬氨酸	+	1.303	0.000	
6	0.802	198.080	$N$ -甲基- $L$ -组氨酸	+	1.240	0.037	
7	0.804	227.107	肌肽	+	1.510	0.045	
8	0.805	106.043	$D$ -丝氨酸	+	1.421	0.000	
9	0.887	150.051	$L$ -甲硫氨酸	+	1.415	0.000	
10	0.975	182.074	酪氨酸	+	1.245	0.000	
11	1.017	217.090	羟脯氨酸	-	1.554	0.000	
12	1.304	268.081	肌苷	+	1.221	0.013	
13	1.057	146.053	$L$ -谷氨酸	-	1.342	0.000	
14	1.110	132.090	$L$ -鸟氨酸	-	1.310	0.000	
15	1.113	154.069	$L$ -组氨酸	-	1.210	0.006	
16	1.125	104.043	$L$ -丝氨酸	-	1.544	0.000	
17	1.125	130.069	肌氨酸	-	1.406	0.026	
18	1.134	114.063	$L$ -脯氨酸	-	1.290	0.000	
19	1.140	164.079	苯丙氨酸	-	1.298	0.000	
20	1.941	130.095	$L$ -亮氨酸	-	1.264	0.040	
21	1.955	88.048	$L$ -丙氨酸	-	1.488	0.046	
22	1.024	115.011	延胡索酸	-	1.639	0.041	
23	1.030	87.016	丙酮酸	-	1.529	0.036	
24	1.166	329.240	油酸	-	1.530	0.000	
25	1.413	271.235	棕榈酸	-	1.613	0.000	
26	1.431	145.058	$\alpha$ -酮戊二酸	-	1.489	0.004	
27	1.475	303.240	花生四烯酸	-	1.269	0.047	
28	1.567	305.255	顺-8,11,14-二十碳三烯酸	-	1.378	0.004	
29	1.715	301.224	二十碳五烯酸	-	1.382	0.000	
30	1.763	299.266	硬脂酸	-	1.409	0.000	
31	1.847	327.240	二十二碳六烯酸	-	1.354	0.000	
32	1.863	227.209	肉豆蔻酸	-	1.731	0.000	
33	1.909	253.224	棕榈油酸	-	1.956	0.026	
34	1.927	311.303	花生酸	-	1.317	0.000	
35	1.963	241.224	十五烷酸	-	1.495	0.000	
36	2.002	279.240	亚油酸	-	1.318	0.000	
37	2.122	267.240	反-10-十七碳烯酸	-	1.221	0.000	
38	1.011	347.047	肌苷酸	-	1.245	0.000	
39	2.408	347.063	单磷酸腺苷	-	1.276	0.002	
40	0.867	61.032	尿素	+	1.495	0.017	核苷酸类
41	1.020	101.032	琥珀酸半醛	-	1.231	0.007	

2.3.2 牛肉干法成熟过程差异代谢物变化分析

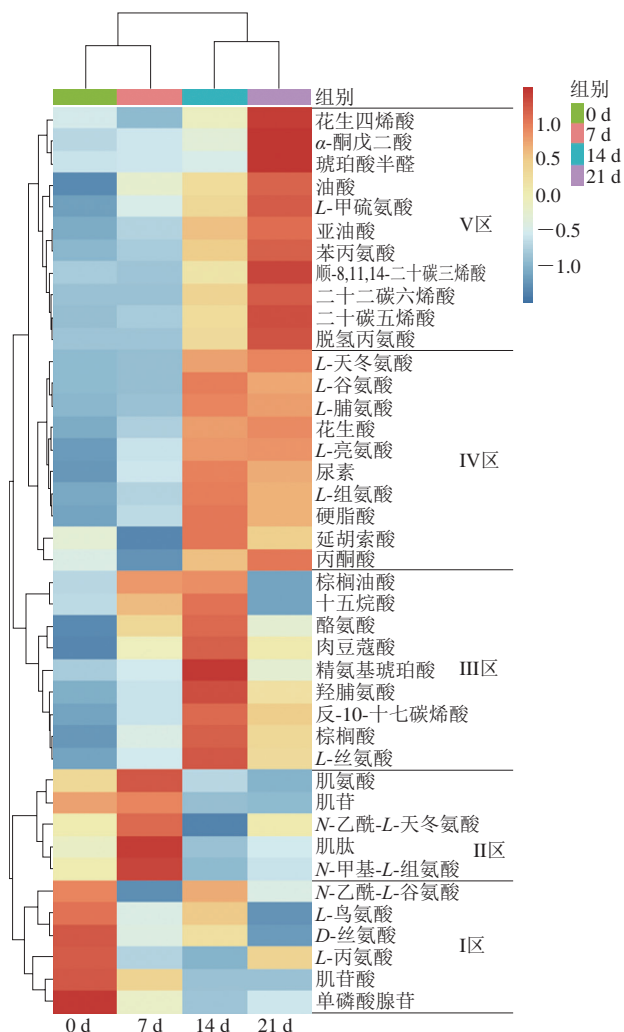


图4 成熟过程中牛肉差异代谢物相对含量变化热图和聚类图  
Fig. 4 Cluster heatmap of differential metabolites in beef during the dry-aging process

如图4所示，红色越深代表该代谢物相对含量越高，蓝色越深代表该代谢物相对含量越低。干法成熟0 d和7 d的牛肉中差异代谢物数量相对较少，但随着成熟时间的延长，差异代谢物数量增加。从聚类分析结果可以看出，成熟0 d和7 d的差异代谢物聚为一类，主要由图中I区和II区的代谢物主导；成熟14 d和21 d的差异代谢物聚为一类，主要由III区、IV区和V区的代谢物主导。

成熟0 d的牛肉主要受I区代谢物影响。由图4可知，I区有6种代谢物，分别为2种核苷酸类代谢物和4种氨基酸类代谢物。在成熟过程中共筛选出2种核苷酸类差异代谢物：单磷酸腺苷（adenosine monophosphate, AMP）和肌苷酸（inosinic acid, IMP），均在成熟0 d时相对含量最高。IMP是衡量肉鲜味的重要指标之一<sup>[25-26]</sup>，有研究表明IMP是肉味形成的必要条件<sup>[27]</sup>。AMP可在AMP脱氨酶

的作用下生成IMP，AMP和IMP的相对含量在成熟7 d时下降，而成熟7 d时肌苷含量增加，表明在成熟0~7 d的过程中AMP生成了IMP，同时IMP被降解生成肌苷，而在成熟14 d时，IMP未被检测到，说明IMP对成熟牛肉鲜味形成的促进作用主要体现在成熟前期（成熟0~7 d）。I区中氨基酸类代谢物为N-乙酰-L-谷氨酸、L-鸟氨酸、D-丝氨酸和L-丙氨酸。D-丝氨酸是一种重要的神经递质，在脂肪和脂肪酸的代谢中发挥重要作用；L-丙氨酸呈鲜味，可促进成熟前期牛肉鲜味的形成。由图4可知，N-乙酰-L-谷氨酸、L-鸟氨酸和D-丝氨酸的相对含量呈下降-上升-下降的变化趋势，L-丙氨酸的相对含量呈下降-上升的变化趋势，相对含量的波动变化可能是由于在成熟过程中氨基酸类物质发生代谢与合成的动态过程导致。如L-鸟氨酸可与CO<sub>2</sub>和氨结合生成瓜氨酸，瓜氨酸与氨结合生成精氨酸，精氨酸在精氨酸水解酶作用下水解生成尿素和鸟氨酸，实现了鸟氨酸的代谢与生成的动态变化。

成熟7 d的牛肉主要受II区代谢物影响。由图4可知，II区有5种代谢物，均为氨基酸类代谢物，且这5种代谢物在成熟0 d的牛肉中相对含量也较高。其中，肌氨酸在肌肉中以磷酸肌酸的形式存在，可促进ATP的合成，并可与L-丙氨酸参与氨基酸代谢，对成熟后期牛肉的品质形成具有促进作用。

成熟14 d的牛肉主要受III区代谢物影响。由图4可知，III区有9种代谢物，分别为5种脂肪酸类代谢物和4种氨基酸类代谢物。脂肪酸类代谢物主要由脂肪经脂肪水解酶作用水解而成<sup>[20]</sup>，其中棕榈油酸为单不饱和脂肪酸，对多种血糖代谢关键酶有重要影响。脂肪酸是加工过程中肉制品风味形成的重要前体物质<sup>[28]</sup>，在后续加工过程中会被氧化，生成挥发性脂肪氧化物，如醛类、酮类等物质，这些物质还可进一步参与美拉德反应产生挥发性杂环化合物，可使成熟牛肉的风味更加浓郁。II区中氨基酸类代谢物有酪氨酸、精氨基琥珀酸、羟脯氨酸和L-丝氨酸。其中，酪氨酸呈鲜味，羟脯氨酸和L-丝氨酸呈甜味，对成熟牛肉滋味的形成有促进作用；精氨基琥珀酸是尿素循环的中间产物，可经精氨酸基琥珀酸裂解酶作用裂解成精氨酸和延胡索酸。

成熟21 d的牛肉主要受V区代谢物影响。由图4可知，V区有11种代谢物，分别为7种脂肪酸类代谢物、3种氨基酸类代谢物和琥珀酸半醛。与成熟14 d的牛肉相比，成熟21 d的牛肉中脂肪酸种类和相对含量显著增加，说明随着成熟的进行，脂肪水解程度加剧。V区中脂肪酸类代谢物多为不饱和脂肪酸，在后续加工过程中易被氧化生成挥发性风味物质，有助于成熟牛肉风味的形成。其中，油酸是n-9不饱和脂肪酸，是人体良好的营养物质来源<sup>[29]</sup>；花生四烯酸、亚油酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸是人体不能合成的必需脂肪酸，具有降低血

脂、促进大脑发育等作用；二十碳五烯酸还可提升肉的甜味和鲜味，对酸味和苦味具有一定的掩蔽作用<sup>[30]</sup>。 $\alpha$ -酮戊二酸是三羧酸循环的重要中间产物之一，也是重要的有机合成中间体，参与氨基酸、蛋白质及脂肪代谢等重要生理过程。V区中还有3种氨基酸类代谢物：*L*-甲硫氨酸、苯丙氨酸和脱氢丙氨酸。*L*-甲硫氨酸和苯丙氨酸是人体必需氨基酸，同时苯丙氨酸也是鲜味氨基酸之一，说明随着成熟的进行，小分子营养物质不断生成，成熟牛肉的风味物质不断增加，成熟牛肉品质越好。

由图4可知，IV区代谢物对成熟后期（成熟14~21 d）的牛肉均有较明显的影响。IV区中有10种代谢物，分别为5种氨基酸类代谢物、4种脂肪酸类代谢物和尿素。氨基酸类代谢物中，*L*-天冬氨酸和*L*-谷氨酸呈鲜味，*L*-脯氨酸呈甜味，*L*-组氨酸呈苦味；同时*L*-脯氨酸在加工过程中可通过Strecker降解形成吡咯等含氮杂环化合物，促进成熟牛肉风味的形成；*L*-亮氨酸是人体必需氨基酸，具有调节血糖的作用。脂肪酸类代谢物中，丙酮酸可由丝氨酸、丙氨酸等氨基酸代谢生成，经氧化生成乙酰辅酶A，与延胡索酸共同参与三羧酸循环，进一步促进成熟牛肉风味和营养物质的形成。而尿素则是蛋白质代谢分解的主要含氮终产物。

由图4可知，不同成熟时间的牛肉检测到的差异性代谢物不同，主要为氨基酸类代谢物、脂肪酸类代谢物和核苷酸类代谢物，且大部分风味前体物质及营养物质在成熟后期（成熟14~21 d）相对含量显著增加（ $P \leq 0.05$ ）。氨基酸类代谢物主要来源于蛋白质降解，成熟前期蛋白质在内源蛋白酶的作用下降解，随着成熟时间的延长，牛肉表面霉菌、酵母等微生物的增长也可导致氨基酸类代谢物增加<sup>[20,28,31]</sup>；脂肪酸类代谢物主要来源于脂肪水解，随着成熟时间的延长，脂肪水解程度加剧。成熟前期（成熟0~7 d）主要为核苷酸类代谢物和氨基酸类代谢物。其中，核苷酸类代谢物AMP和IMP只在成熟前期被检测到。而*L*-丙氨酸、*L*-鸟氨酸、肌氨酸等氨基酸类物质在成熟前期含量最高，在整个成熟过程中含量呈动态变化，这些物质不仅可以促进成熟前期牛肉品质的形成，还可作为底物参与到后期的代谢过程中。成熟后期（成熟14~21 d）较成熟前期差异性代谢物的种类和相对含量显著增加（ $P \leq 0.05$ ）。其中，脂肪酸类代谢物集中在成熟后期被检测到，尤其是多不饱和脂肪酸，如花生四烯酸、亚油酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸等在成熟14 d时被检测到，在成熟21 d时相对含量显著增加（ $P \leq 0.05$ ），在成熟过程中，蛋白质降解与脂肪水解同步进行，但由于牛肉中脂肪含量相对较少，因此成熟前期产生的脂肪酸含量较少，随着成熟的进行，脂肪水解加剧，脂肪酸含量增加，导致大部分脂肪酸类物质集中在成熟后期被检出；氨基酸类代谢物在成熟过程中不断被检出，且随着成熟时间的延长，氨基酸种类

和相对含量增加，但也有部分氨基酸在成熟过程中呈动态变化，这可能是因为成熟过程中，氨基酸类物质作为关键代谢物进行着代谢与合成的动态过程导致。在成熟牛肉后续的加工中，脂肪酸类物质与氨基酸类物质可作为美拉德反应的重要底物，促进牛肉风味的形成；同时*L*-亮氨酸、*L*-甲硫氨酸、苯丙氨酸等必需氨基酸以及花生四烯酸、亚油酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸等必需脂肪酸的生成提升了成熟牛肉的营养价值，而且这些代谢物在成熟后期相对含量较高，因此，干法成熟时间越长，成熟牛肉品质越高。目前已有研究表明，干法成熟牛肉品质的形成主要集中在14~30 d，并且不同部位的牛肉其品质形成的最佳成熟时间不同<sup>[4]</sup>。而成熟时间不断延长，脂肪过氧化及微生物的增长会对成熟牛肉品质带来不良影响<sup>[4,32-33]</sup>。

#### 2.4 牛肉干法成熟过程中代谢通路分析

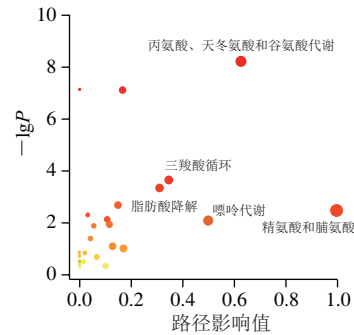


图5 牛肉成熟过程中差异代谢物通路富集分析

Fig. 5 Pathway enrichment analysis of differential metabolite pathways in beef during the dry-aging process

为探索牛肉干法成熟过程代谢物的代谢途径，对得到的差异代谢物的代谢途径进行分析。由图5可知，共获得37条代谢通路，以影响值大于0.2作为筛选依据<sup>[34]</sup>，得到5条关键代谢通路，分别为嘌呤代谢，脂肪酸降解，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，精氨酸和脯氨酸代谢，三羧酸循环。

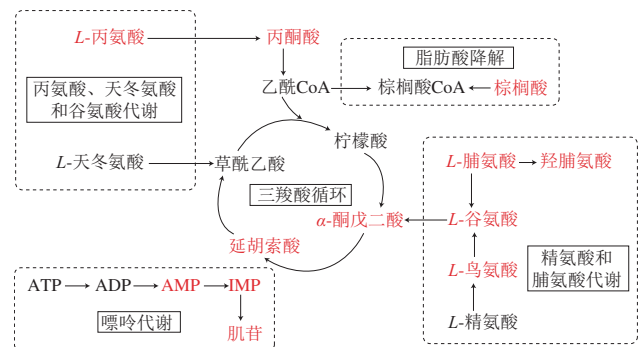


图6 牛肉成熟过程中差异代谢物途径分析

Fig. 6 Metabolic pathway analysis of differential metabolite in beef during the dry-aging process

如图6所示, 将关键代谢通路中主要参与的差异代谢物与代谢路径进行整合, 图中红色表示差异代谢物。主要参与的差异代谢物有13种, 分别为AMP、IMP、肌苷、棕榈酸、L-丙氨酸、丙酮酸、L-天冬氨酸、延胡索酸、L-谷氨酸、L-鸟氨酸、L-脯氨酸、羟脯氨酸和 $\alpha$ -酮戊二酸。牛肉干法成熟过程中, ATP在腺苷酸激酶的作用下生成AMP, AMP在AMP脱氨酶的作用下, 生成IMP, IMP在肌苷激酶的作用下进一步降解成肌苷。在成熟过程中, 牛肉中的脂肪在脂肪水解酶的作用下降解为脂肪酸, 在筛选出的脂肪酸降解关键代谢通路中, 棕榈酸在脂酰辅酶A合成酶的催化下生成棕榈酰辅酶A, 棕榈酰辅酶A在脂肪酸 $\beta$ 氧化酶的催化下, 可生成乙酰辅酶A进入三羧酸循环。同时成熟过程中筛选出了2条关键氨基酸代谢通路, 分别为丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢以及精氨酸和脯氨酸代谢, L-丙氨酸、丙酮酸、L-天冬氨酸和延胡索酸可在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径中生成, L-谷氨酸、L-鸟氨酸、L-脯氨酸、羟脯氨酸和 $\alpha$ -酮戊二酸可在精氨酸和脯氨酸代谢途径中生成, 最终进入三羧酸循环。三羧酸循环是糖类、脂类和蛋白质的最终代谢通路, 此循环有助于氨基酸、有机酸、糖类等物质的生成, 促进了成熟牛肉的风味形成及营养价值提升。

### 3 结论

借助UPLC技术, 基于非靶向代谢组学方法研究干法成熟过程中牛肉代谢产物的变化情况。通过多元统计分析, 鉴定出41种差异代谢物, 包括氨基酸类代谢物21种、脂肪酸类代谢物16种、核苷酸类代谢物2种及其他代谢物2种。对差异代谢物的种类和相对含量进行分析, 发现随着成熟时间的延长, 差异代谢物的种类和相对含量显著增加。其中, 核苷酸类代谢物只在成熟前期被检测到; 大部分风味前体物质及必需脂肪酸和必需氨基酸在成熟后期相对含量显著增加, 说明干法成熟有利于牛肉的风味形成及营养品质的提升。通过对差异代谢物的代谢途径进行分析, 筛选出5条关键代谢通路, 分别为嘌呤代谢, 脂肪酸降解, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢, 三羧酸循环, 这些代谢途径有利于氨基酸、有机酸、糖类物质的生成, 对成熟牛肉风味和营养物质的形成具有促进作用。

综上, 通过对干法成熟过程牛肉代谢产物的变化进行了分析, 明确了不同成熟时间牛肉中的差异代谢物, 并且构建了干法成熟过程差异代谢物的代谢途径, 为牛肉干法成熟技术的开发与应用提供一定的理论基础。

### 参考文献:

- [1] KEMP C M, SENSKY P L, BARDSLEY R G, et al. Tenderness-an enzymatic view[J]. Meat Science, 2010, 84(2): 248-256. DOI:10.1016/j.meatsci.2009.06.008.
- [2] JOSE C G, JACOB R H, GARDNER G E. Alternative cutting methods and dry aging reduce the shear force of hot boned beef striploin in Bosindicus cattle[J]. Meat Science, 2020, 163(5): 108036.1-108036.7. DOI:10.1016/j.meatsci.2019.108036.
- [3] KAHRAMAN H A, GÜRBÜZ U. Effects of three aging methods on the *Longissimus lumborum* muscle from Holstein-Friesian steers[J]. Medycyna Weterynaryjna, 2019, 75(1): 6182-6184. DOI:10.21521/mw.6182.
- [4] BA H V, PARK K M, DASHMAA D, et al. Effect of muscle type and vacuum chiller aging period on the chemical compositions, meat quality, sensory attributes and volatile compounds of Korean native cattle beef[J]. Animal Science Journal, 2014, 85(2): 164-173. DOI:10.1111/asj.12100.
- [5] OH J H, LEE H J, YOON J W, et al. Electrical resistance and mold distribution on beef surface as indicators of dry aging[J]. Journal of Food Process Engineering, 2019, 42(5): e13122. DOI:10.1111/jfpe.13122.
- [6] KIM Y H B, KEMP P, SAMUELSSON L M. Effects of dry-aging on meat quality attributes and metabolite profiles of beef loins[J]. Meat Science, 2016, 111: 168-176. DOI:10.1016/j.meatsci.2015.09.008.
- [7] LEE H J, CHOE J, KIM M, et al. Role of moisture evaporation in the taste attributes of dry- and wet-aged beef determined by chemical and electronic tongue analyses[J]. Meat Science, 2019, 151(5): 82-88. DOI:10.1016/j.meatsci.2019.02.001.
- [8] JEREMIAH L E, GIBSON L L. The effects of postmortem product handling and aging time on beef palatability[J]. Food Research International, 2003, 36(9/10): 929-941. DOI:10.1016/S0963-9969(03)00102-9.
- [9] WARREN K E, KASTNER C L. A comparison of dry-aged and vacuum-aged beef strip loin[J]. Journal of Muscle Foods, 1992, 3(2): 151-157. DOI:10.1111/j.1745-4573.1992.tb00471.x.
- [10] YANG P, HONG J W, RAFTERY D, et al. Metabolomic-based clinical studies and murine models for acute pancreatitis disease: a review[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2021, 1867(7): 166123. DOI:10.1016/j.bbadis.2021.166123.
- [11] DAGIA M, ANTIOCHIA R, SOBLEV A P, et al. Untargeted and targeted methodologies in the study of tea (*Camellia sinensis* L.)[J]. Food Research International, 2014, 63: 275-289. DOI:10.1016/j.foodres.2014.03.070.
- [12] 雷露, 吴天祥, 王川南. 基于UPLC-QTOF-MS代谢组学研究灰树花发酵的代谢差异[J]. 菌物学报, 2020, 39(10): 1920-1932. DOI:10.13346/j.mycosystema.200090.
- [13] 徐冰冰, 张九凯, 赵贵明, 等. 基于非靶标代谢组学的沙棘油真实性鉴别技术[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 246-253. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200327-393.
- [14] 李丹阳, 郑岩, 张文羿, 等. 嗜热链球菌S10发酵乳贮藏期间的代谢组学研究[J]. 中国食品学报, 2020, 20(11): 191-198. DOI:10.16429/j.1009-7848.2020.11.022.
- [15] 姜丽, 苏伟, 母应春, 等. 基于GC-TOF-MS代谢组学研究高度黑糯米酒后发酵阶段代谢差异[J]. 食品科学, 2020, 41(14): 88-94. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190725-333.
- [16] JAVADI N, ABAS F, HAMID A, et al. GC-MS-based metabolite profiling of *Cosmos caudatus* leaves possessing alpha-glucosidase inhibitory activity[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(6): 1130-1136. DOI:10.1111/1750-3841.12491.

- [17] WEHRENS R, WEINGART G, MATTIVI F. MetaMS: an opensource pipeline for GC-MS-based untargeted metabolomics[J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 966: 109-116. DOI:10.1016/j.jchromb.2014.02.051.
- [18] SUGIMOTO M, OBIYA S, KANEKO M, et al. Metabolomic profiling as a possible reverse engineering tool for estimating processing conditions of dry-cured hams[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(2): 402-410. DOI:10.1021/acs.jafc.6b03844.
- [19] STRUCK-LEWICKA W, KORDALEWSKA M, BUJAK R, et al. Urine metabolic fingerprinting using LC-MS and GC-MS reveals metabolite changes in prostate cancer: a pilot study[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 111: 351-361. DOI:10.1016/j.jpba.2014.12.026.
- [20] DASHDORJ D, TRIPATHI V K, CHO S, et al. Dry aging of beef: review[J]. *Journal of Animal Science and Technology*, 2016, 58: 20-31. DOI:10.1186/s40781-016-0101-9.
- [21] KOUTSIDIS G, ELMORE J S, ORUNA-CONCHA M J, et al. Water-soluble precursors of beef flavour. Part II: effect of post-mortem conditioning[J]. *Meat Science*, 2008, 79(2): 270-277. DOI:10.1016/j.meatsci.2007.09.010.
- [22] JOHAN A W, EWOU D J J, HUUB C J H, et al. Multivariate paired data analysis: multilevel PLS-DA versus OPLS-DA[J]. *Metabolomics*, 2010, 6(1): 119-128. DOI:10.1007/s11306-009-0185-z.
- [23] D'ESTE M, ALVARADO-MORALES M, ANGELIDAKI I. Amino acids production focusing on fermentation technologies: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1): 14-25. DOI:10.1016/j.biotechadv.2017.09.001.
- [24] 陈静茹, 王梁, 吕学泽, 等. 北京油鸡肉4℃贮藏过程中的品质及风味变化[J]. *肉类研究*, 2018, 32(8): 1-6. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-201808001.
- [25] ZHAN H, HAYAT K, CUI H, et al. Characterization of flavor active non-volatile compounds in chicken broth and correlated contributing constituent compounds in muscle through sensory evaluation and partial least square regression analysis[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 118: 108786. DOI:10.1016/j.lwt.2019.108786.
- [26] 罗燕, 谷新利, 赵宗胜, 等. 中草药添加剂对绵羊肌肉组织中鲜味物质含量的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(12): 99-103.
- [27] MACY R L, NAUMANN H D, BAILEY M E. Water-soluble flavor and odor precursors of meat. 3. Changes in nucleotides, total nucleosides and bases of beef pork and lamb during heating[J]. *Journal of Food Science*, 1970, 35: 78-80. DOI:10.1111/j.1365-2621.1970.tb12373.x.
- [28] RYU S, PARK M R, MABURUTSE B E, et al. Diversity and characteristics of the meat microbiological community on dry aged beef[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 28(1): 105-108. DOI:10.4014/jmb.1708.08065.
- [29] LEE D H, KULKARNI K P, KIM B O, et al. Comparative assessment of quality characteristics of Chungkookjang made from soybean seeds differing in oleic acid concentration[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 52: 529-536. DOI:10.1016/j.jff.2018.10.016.
- [30] 崔小燕, 苟钟勇, 蒋守群, 等. 鸡肉风味的形成机制与调控研究进展[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(2): 1-9. DOI:10.3969/j.issn.1006-267x.2019.02.002.
- [31] LEE H J, CHOE J H, KIM K T, et al. Analysis of low-marbled Hanwoo cow meat aged with different dry-aging methods[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2017, 30(12): 1733-1738. DOI:10.5713/ajas.17.0318.
- [32] KOVALÍK P J, MAČANGA T, KLEMPOVÁ P, et al. Effect of feeding of 5% prefermented cereal-based bioproduct enriched with gamma-linolenic acid on production indicators, chemical composition, fatty acid profile and lipid oxidation of broiler meat[J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2018, 17(2): 408-417. DOI:10.1080/1828051X.2017.1369861.
- [33] YANCEY E J, DIKEMAN M E, HACHMEISTER K A, et al. Flavor characterization of top-blade, top-sirloin, and tenderloin steaks as affected by pH, maturity, and marbling[J]. *Journal of Animal Science*, 2005, 83(11): 2618-2623. DOI:10.2527/2005.83112618x.
- [34] WEN B, JIN S R, CHEN Z Z, et al. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 640/641(11): 1372-1381. DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.05.401.