

doi: 10.12452/j.fxcxb.26070702

基于非靶向代谢组学的通辽牛肉特征代谢谱及来源判别分析

张娟¹, 刘楠², 王琳琳², 刘钊^{1,3}, 阳晓婷¹, 陈爱亮¹, 赵燕¹,
孙丽荣^{2*}, 刘洋儿^{1*}

(1. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 农产品质量安全全国重点实验室, 北京 100081; 2. 通辽市农畜产品质量安全中心, 内蒙古 通辽 028000; 3. 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071000)

摘要: 为解析不同来源牛肉代谢组成差异并挖掘通辽牛肉特征代谢谱, 本研究以通辽、山西和美国来源牛肉为对象, 采用非靶向代谢组学技术结合多元统计分析, 系统比较了不同来源牛肉的代谢轮廓差异, 并评估了特征代谢物在不同来源牛肉判别中的应用潜力。结果表明, 不同来源牛肉代谢谱具有显著差异, 共筛选出49种差异代谢物。与山西和美国来源的牛肉相比, 通辽牛肉中多种游离氨基酸、二肽及酰基肉碱类物质相对丰度较低, 而D-葡萄糖-6-磷酸、核糖-5-磷酸、肌苷、鸟苷及维生素B族相关代谢物表现出特征性变化, 表明其氨基酸和二肽代谢、脂肪酸代谢、糖代谢分流、嘌呤及核苷酸代谢等过程具有来源相关特征。基于特征代谢物构建的主成分分析分类模型 (principal component analysis class model, PCA-class) 中, 受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线的曲线下面积 (area under the curve, AUC) 值均大于0.9, 验证集分类准确率超过95%, 证实所筛选的特征代谢物具有稳健的判别能力。综上, 通辽牛肉的特征代谢谱主要表现为氨基酸及二肽、酰基肉碱类相关代谢物积累较低, 并伴随核苷酸相关代谢物的特征性变化。本研究为通辽牛肉差异化评价及地理标志农产品资源的保护和开发提供了代谢组学依据。

关键词: 通辽牛肉; 非靶向代谢组学; 特征代谢物; PCA-Class; 判别分析

中图分类号: O657.7; TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-13

Characteristic Metabolic Profiling and Source Discrimination of Tongliao Beef Based on Untargeted Metabolomics

ZHANG Juan¹, LIU Nan², WANG Lin-lin², LIU Chuan^{1,3}, YANG Xiao-ting¹, CHEN Ai-liang¹,
ZHAO Yan¹, SUN Li-rong², LIU Yang-er¹

(1. State Key Laboratory for Quality and Safety of Agro-Products, Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Tongliao Agricultural and Livestock Product Quality and Safety Center, Tongliao 028000, China; 3. College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

Abstract: To elucidate differences in the metabolic composition of beef from different sources and to identify the characteristic metabolic profile of Tongliao beef, this study analyzed beef samples from Tongliao, Shanxi, and the United States using untargeted metabolomics combined with multivariate statistical analysis. Metabolic profile differences among beef samples from the three origins were systematically compared, and the potential of characteristic metabolites for origin discrimination was evaluated. The results showed significant differences in metabolic profiles among the three groups, with 49 differential metabolites identified. Compared with beef from Shanxi and the United States, Tongliao beef exhibited lower relative abundances of multiple free amino acids, dipeptides, and acylcarnitines, whereas D-glucose 6-phosphate, ribose 5-phosphate, inosine, guanosine, and vitamin B-related metabolites showed characteristic changes. These findings indicate origin-depen-

收稿日期: 2026-07-07; 修回日期: 2026-07-31

基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目 (2022YFXM0019)

* 通讯作者: 刘洋儿, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品真实性与溯源, E-mail: liuyanger@caas.cn;

孙丽荣, 硕士, 研究员, 研究方向: 农产品质量安全检测与品质评价, E-mail: 13904751007@163.com

网络首发日期: XXXX-XX-XX

dent differences in amino acid and peptide metabolism, fatty acid metabolism, glucose metabolic partitioning, and purine and nucleotide metabolism. In the principal component analysis class model (PCA-class) constructed using the characteristic metabolites, the area under the curve (AUC) values of the receiver operating characteristic (ROC) curve exceeded 0.9, and the classification accuracy for the validation set was greater than 95%, confirming the robust discriminatory capacity of the characteristic metabolites. In conclusion, the characteristic metabolic profile of Tongliao beef was primarily characterized by lower relative abundances of amino acids, dipeptides, and acylcarnitine-related metabolites, together with characteristic changes in nucleotide-related metabolites. This study provides metabolomic evidence for the differentiated evaluation of Tongliao beef origin and for the protection and development of geographical indication agricultural products.

Key words: Tongliao beef; untargeted metabolomics; characteristic metabolites; PCA-Class; classification analysis

牛肉因富含优质蛋白、维生素和矿物质,在居民膳食中占据重要地位。随着生活水平提升和消费结构升级,消费者对牛肉品质的需求已从基础营养指标延伸至风味、嫩度、多汁性等感官品质,且对特定产地的偏好也日趋明显^[1-3]。我国是全球重要的牛肉生产和消费国,溯源与品质评价已成为畜牧和农产品科学领域的研究热点。通辽市地处“黄金养牛带”,依托天然草场与玉米带资源,形成放牧与谷物饲喂结合的养殖模式,牛肉以肉质细嫩、脂肪分布均匀著称;山西省肉牛产业分布于太行山区和晋南盆地,温带大陆性气候与豆科轮作资源赋予牛肉紧实度高、矿物质丰富的特点;美国作为牛肉出口大国,以标准化谷饲为主,产品风味稳定,占据我国进口市场重要份额。三地在养殖模式、生态环境和品种背景上差异显著,为产地比较研究提供了理想模型。

传统牛肉品质评价多依赖感官评分和理化指标(如剪切力、pH值、肌肉脂肪含量)^[4-5],难以从分子层面解析品质形成的调控机制。近年来,代谢组学技术因能系统性揭示小分子代谢物的动态变化,成为探索农产品品质特征分子基础的核心工具。其中,非靶向代谢组学通过无偏向性检测样本中全谱代谢物,结合多元统计分析,可有效挖掘与品质性状相关的生物标志物及代谢通路,为肉类科学提供全新的研究视角。Jeong等^[6]采用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)代谢组学发现乳酸和肌酸可作为育肥周期指示因子。李亚博等^[7]通过非靶向代谢组学发现多条代谢通路参与不同月龄牛肉风味调控。王忠波等^[8]采用非靶向代谢组学发现脂肪酸类代谢物在固原黄牛风味形成过程中发挥关键作用。Maritha等^[9]采用代谢组学与化学计量学相结合的方法鉴定出15种可用于肉类清真食品鉴别的潜在代谢标志物。然而,针对中国特定产地(如通辽)与其他产地牛肉的系统性代谢组学比较研究尚属空白,产地相关特征代谢谱及判别标志物仍有待明确。

基于此,本研究以通辽、山西及美国来源的牛肉为研究对象,采用UHPLC-Q-TOF/MS技术,结合主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)、(Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis, OPLS-DA)、层次聚类分析(Hierarchical cluster analysis, HCA)等多元统计方法,系统比较三地牛肉的代谢物组成谱,筛选差异代谢物并注释相关代谢通路。研究旨在揭示不同来源牛肉的代谢物差异特征,为牛肉来源溯源、品质差异化评价及基于代谢物标志物的品质控制提供科学依据。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

本研究选取通辽、山西和美国来源的牛肉样品各30份。通辽牛肉样品来源于通辽市某肉牛生产企业,牛品种为科尔沁牛;山西牛肉样品来源于山西省某肉牛生产企业,牛品种为西门塔尔牛;美国牛肉样品由江苏省某进口牛肉企业提供,产品标签标示原产国为美国,牛品种为安格斯牛。三组样品对应牛只均为24-27月龄的成年健康牛。所有牛按照商业屠宰方法进行屠宰。所有样品均取自腱子肉,每份约2 kg,真空包装后冷链运输至实验室,并立即于-20℃下冷冻,待测。

甲酸 色谱纯,北京迪马科技有限公司;乙酸铵 色谱纯,美国Sigma-Aldrich公司;乙腈 质谱纯,德国Merck KGaA公司;水 色谱纯,香港屈臣氏公司。

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Agilent 6546 LC/Q-TOF 质谱 配有双通道安捷伦喷射流电喷雾离子源 (Dual Agilent Jet Stream Electrospray Ionization, Dual AJS ESI), 美国 Agilent 公司; 低温高速离心机, 德国 Sigma 公司; 涡旋振荡器, 德国 IKA 公司; 超声仪、电子天平, 美国 Mettler Toledo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 样品前处理采用本研究室开发的样品前处理方法。具体提取步骤如下: 称取 150 mg 样品于 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 甲醇/水 (1/1, *v/v*), 超声 10 min, 涡旋 5 min, $14500 \times g$ 离心 20 min, 上层清液过 0.22 μm PTFE 滤膜后装瓶用于代谢组学的分析。

质量控制 (Quality Control, QC) 样品是从每个样品取等量提取液, 充分混匀, 制成混合样品。在数据采集过程中, 为防止长时间进样过程中仪器状态改变而带来的误差, 所有样品进行随机排列, 且每 5 针实验样品插入一针 QC 样品, 用于监测仪器状态和数据的稳定性与重现性。

1.2.2 UHPLC-Q-TOF/MS 分析方法 样品处理后, 立即将其放入多功能自动进样器 Multisampler 中, 使用 1290 Infinity II 液相色谱仪串联 6546 LC/Q-TOF 四极杆飞行时间质谱进行分析。

色谱条件: ZORBAX Eclipse C18 柱 (1.8 μm , 3.0 mm $\times$ 150 mm, Agilent) 色谱柱, 流速 0.3 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 0.2 μL 。正离子模式: 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和 0.1% 甲酸甲醇溶液 (B), 梯度洗脱程序为: 0~7 min, 10% B; 7~11 min, 90% B; 停止时间 11 min, 后运行时间 5 min。负离子模式: 流动相为 0.1% 乙酸铵水溶液 (A) 和 0.1% 乙酸铵甲醇溶液 (B), 梯度洗脱程序为: 0~7 min, 10% B; 7~11 min, 90% B; 停止时间 11 min, 后运行时间 5 min。

质谱条件: 离子源 Dual AJS ESI, 鞘气温度为 340 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气流速为 12, 气体温度为 320 $^{\circ}\text{C}$, 气体流速为 8 L/min, 雾化器为 35 psi, 毛细管电压为 3500 V (+)、3000 V (-), 喷嘴电压 0 V (+)、1000 V (-)。MS1 采集参数: 质量范围为 m/z 50~1700 Da, 扫描速率为 5。迭代 Auto MS/MS 采集参数: 质量范围为 m/z 50~1700 Da, 扫描速率为 3, 分离宽度为 Medium (~4 amu), 碰撞能量为 20.00, 40.00, 迭代进样针数 5。数据存储模式为 Centroid。在分析过程中将嘌呤 (m/z 121.050873) 和 HP-921 (六 (1H, 1H, 3H-四氟丙氧基) 磷嗪, m/z 922.009798) 用作正离子模式采集时的参比离子, 将 TFANH4 (m/z 112.985587) 和 HP-921 (六 (1H, 1H, 3H-四氟丙氧基) 磷嗪, m/z 1033.988109) 用作负离子模式采集时的参比离子。

1.3 数据处理

原始数据转化为 abf 格式, 使用 MS-DIAL (ver. 4.9.221218) 软件完成峰识别、峰对齐、保留时间校正和提取峰面积等系列操作, 获得代谢组数据阵。以 $S/N < 3$ 、组内缺失值 $> 50\%$ 进行数据清洗。然后应用 SPSS 27.0 (IBM Corp., New York, USA)、SIMCA 14.1 (Umetrics, Umea, Sweden) 等软件进行单变量统计分析和多变量统计分析, 包括差异倍数分析 (Fold change, FC)、单变量统计检验 ($P < 0.05$)、无监督 PCA、有监督 OPLS-DA、HCA 等。OPLS-DA 模型 7 折交叉验证, 分别以 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 评价模型对自变量、分组变量的解释能力及预测能力, 并通过 200 次随机置换检验评价模型的过拟合风险。

将筛选获得的差异代谢物数据导入 MetaboAnalyst 6.0 在线平台的富集分析 (Enrichment Analysis) 模块, 进行化学分类及富集分析。以所选代谢物集库 (HMDB、PubChem、KEGG、ChEBI 和 METLIN 等) 中可匹配的化合物作为参考背景, 采用超几何检验评价各化学类别在差异代谢物中的富集程度。富集倍数表示某化学类别实际匹配的差异代谢物数量与随机情况下期望匹配数量的比值。采用 Benjamini-Hochberg 方法对 P 值进行多重检验校正, 以错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 作为显著富集标准。

2 结果与讨论

2.1 实验质量控制

图 1a, b 为 QC 样品分别在正负离子模式下的总离子流图 (Total Ion Chromatography, TIC) 重叠图谱。各 QC 样品的色谱峰分布趋势基本一致, 主要色谱峰的保留时间稳定, 说明仪器检测过程具有良好

的稳定性和重复性。经归一化处理后,对代谢组数据进行PCA分析。图1c显示, QC样品聚集紧密并位于样品分布中心,进一步表明样品前处理和分析过程具有良好的稳定性和重复性。TIC图谱和PCA分析共同表明本研究的代谢组学数据质量可靠,为后续筛选特征差异代谢物、解析品质形成机制及建立判别模型提供基础。

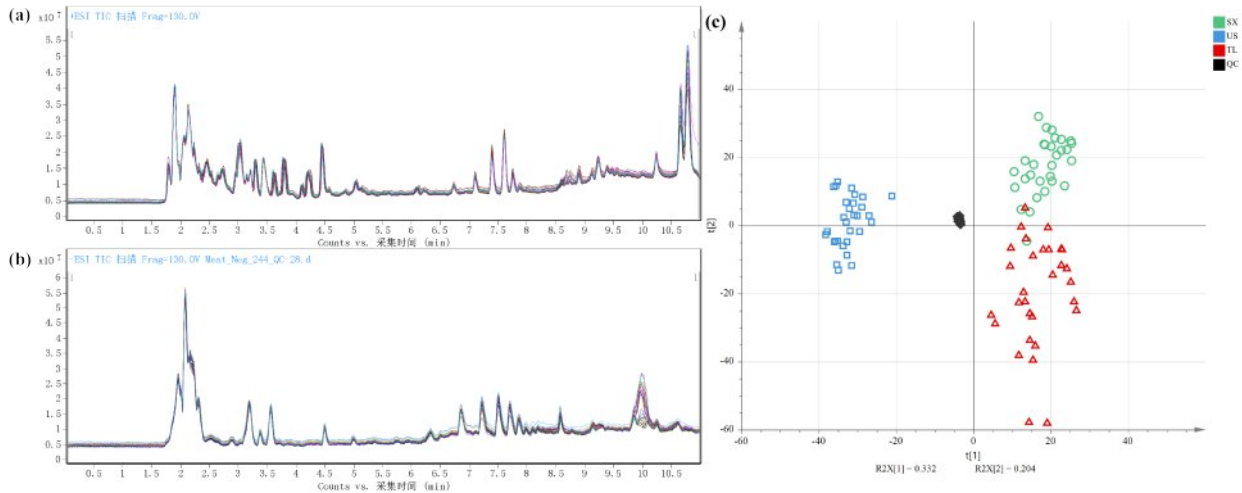


图1 数据质量评估结果图

Fig. 1 Results of data quality assessment

(a): Overlaid TIC of 21 QC sample injections in positive ion mode. (b): Overlaid TIC of 21 QC sample injections in negative ion mode.

(c): PCA score plot (SX: Shanxi beef; US: US beef; TL: Tongliao beef; QC: quality control samples) (a): 正离子模式下质控样品的TIC重叠图谱; (b): 负离子模式下质控样品的TIC重叠图谱; (c): PCA得分图 (SX代表山西牛肉; US代表美国牛肉; TL代表通辽牛肉; QC代表质控样品,下同)

2.2 不同牛肉代谢轮廓差异分析

为分析不同来源牛肉样品代谢谱的整体差异,本研究对代谢组数据进行了PCA和HCA。图2a显示三组样品在主成分空间中呈现明显分离趋势,并分别形成相对独立的聚类区域,说明不同来源牛肉具有特征性代谢组成。其中,通辽牛肉与山西牛肉距离较近,而美国牛肉与二者距离较远。从主成分贡献率来看,PC1、PC2和PC3的解释率分别为34.6%、21.1%和5.5%,前三个主成分累计解释率达到61.3%。之后的单个主成分贡献率明显下降,表明主要代谢差异已集中体现在前3个主成分中(图2b)。HCA结果显示,组内样品相似性较高,组间差异明显(图2c)。PCA和HCA分析共同表明,不同来源牛肉具有稳定且可区分的代谢指纹特征,为后续差异代谢物筛选和判别模型构建提供了依据。

2.3 差异代谢化合物筛选

为探究三组样品间的代谢差异,并筛选具有判别贡献的差异代谢物,本研究在PCA和HCA分析基础上,首先采用OPLS-DA模型对不同来源牛肉样品进行两两比较分析。结果如图所示,三组两两比较均呈现明显的组间分离,说明不同来源牛肉之间存在代谢差异。三组两两比较的OPLS-DA得分图(图3a, c, e)均显示出清晰的组间分离,且置换检验(图3b, d, f)中 Q^2 截距均小于0,表明模型具有较高解释能力和可靠预测性能。与PCA相比OPLS-DA能够进一步放大大组间差异并削弱组内无关变异,因此更适用于筛选不同来源牛肉之间的差异代谢物。

其次,本研究以点大小映射变量投影重要性指标(variable importance in projections, VIP)、显著性水平和FC作为筛选条件,绘制火山图。该火山图以对数化倍数变化($\log_2 FC$)表示变量丰度差异, $|\log_2 FC| > 1$ 为显著变化阈值;以负对数化P值($-\log_{10} P$)衡量差异可靠性, $P < 0.05$ 对应 $-\log_{10} P > 1.3$;VIP > 1.0表示变量对OPLS-DA模型判别力的关键贡献。如图4显示,三地牛肉之间存在显著差异离子特征,共筛选出57个,其中正、负离子模式下分别为28种和29种。依据标准化化合物名称和数据库编号对不同离子模式及加合离子形式下重复检出的特征进行合并后,共对应49种非重复差异代谢物。该结果表明,不同来源牛肉具有特征性代谢指纹,筛选出的差异代谢物可作为产地判别及品质特征解析的候选标志物。

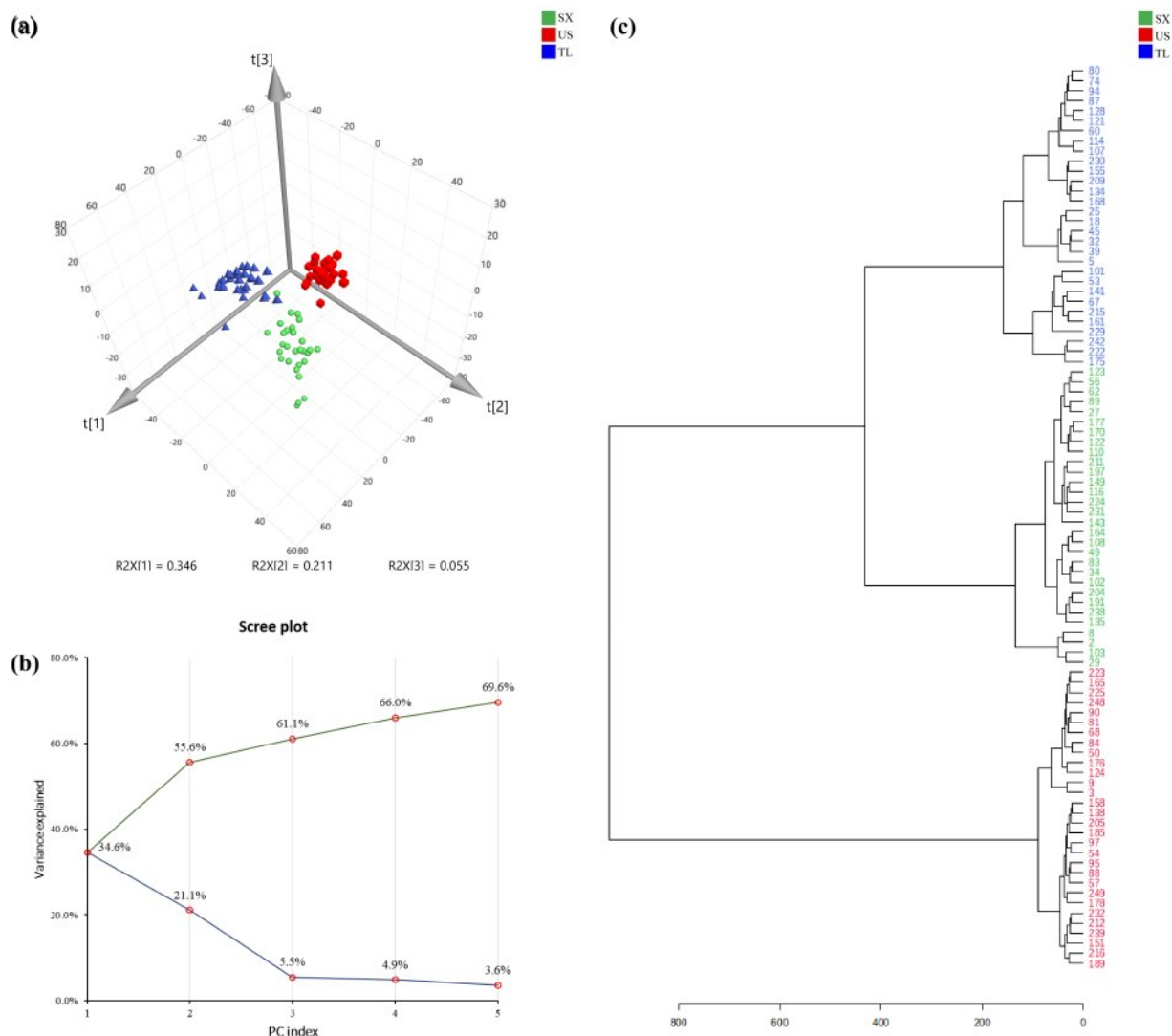


图2 不同来源牛肉代谢轮廓差异分析图

Fig. 2 Differential analysis of metabolic profiles of beef from different sources.

(a): 3D PCA score plot. (b): PCA scree plot. (c): Hierarchical clustering heatmap. Abbreviations as in Fig. 1. (a): 三维PCA得分图; (b): PCA主成分碎石图; (c): 层次聚类图。缩写含义同图1

2.4 差异代谢物化学分类统计与富集特征

为明确不同来源牛肉代谢组成差异,本研究对筛选获得的差异代谢物进行化学分类统计及富集分析。如图5a所示,羧酸及其衍生物占比最高,约占31%;其次为脂肪酰类,约占17%;咪唑并嘧啶类约占12%;有机含氧化合物约占10%;嘌呤核苷类约占8%。此外,吡啶及其衍生物、吡啶及其衍生物、有机氮化合物、羟基酸及其衍生物、甘油酯类、多肽类、有机硫酸及其衍生物、苯及其取代衍生物等类别也有一定分布,但占比较低。化学类别富集分析结果显示,经多重检验校正后,羧酸及其衍生物、咪唑并嘧啶类和嘌呤核苷类均达到高度显著富集水平($FDR < 0.001$),脂肪酰类达到显著富集水平($FDR < 0.05$) (图5b)。

综上,不同来源牛肉样品的代谢差异主要集中在羧酸及其衍生物、脂肪酰类、嘌呤核苷类、有机含氧化合物及含氮/含硫衍生物等类别。这些差异可能与产地相关的饲养环境、日粮结构、脂质沉积、宰后成熟和风味物质形成过程密切相关。该结果表明,代谢组学能够从小分子水平揭示不同产地牛肉的组成差异,为产地溯源、品质特征形成机制研究提供理论依据。

2.5 通辽牛肉特征代谢谱分析

2.5.1 氨基酸及二肽类代谢物

游离氨基酸和小肽是宰后肌肉蛋白质降解产物,也是肉品滋味和热加工风味形成的重要前体^[10-11]。本研究发现,通辽牛肉中多种游离氨基酸和二肽的相对丰度低于山西

牛肉和美国牛肉, 主要包括色氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、焦谷氨酸以及 Ala-Ile、Ala-Val、Asp-Phe、Gly-Leu 和 Val-Phe 等 (表 1)。上述结果表明, 通辽牛肉中蛋白质降解相关小分子代谢物积累水平较低, 提示其宰后蛋白水解程度、氨基酸周转状态及呈味前体组成具有产地相关特征。不同氨基酸可参与鲜味、甜味、苦味等滋味的形成, 并可在热加工过程中参与美拉德反应和 Strecker 降解反应, 生成多种风味相关化合物^[10-12]。因此, 氨基酸及二肽类代谢物的低丰度特征是通辽牛肉区别于山西牛肉和美国牛肉的代谢表现之一, 可为其成熟特性和风味前体差异解析提供依据。

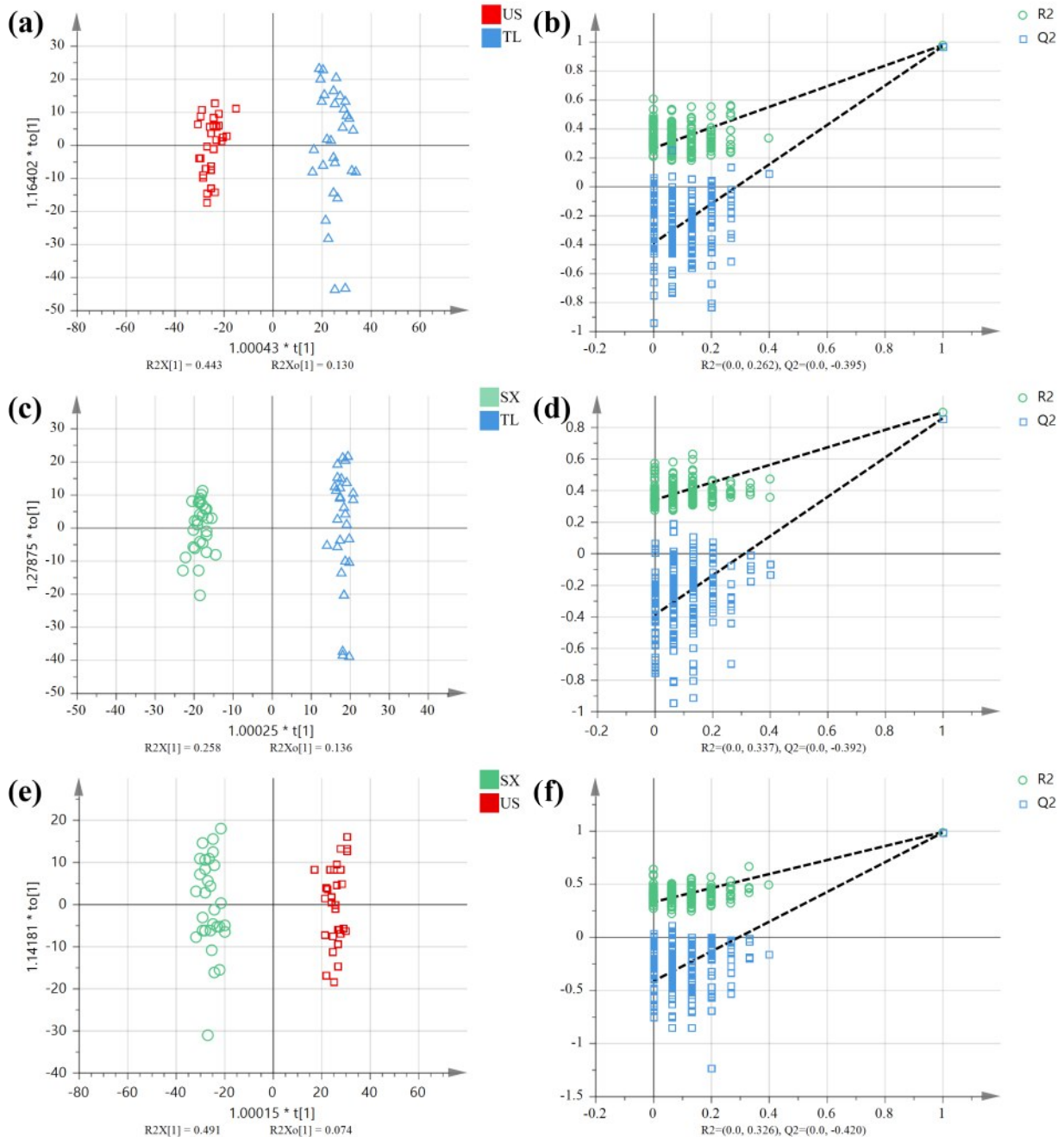


图3 OPLS-DA 模型

Fig. 3 OPLS-DA model

(a, c, e): OPLS-DA score plots, Abbreviations as in Fig. 1. (b, d, f): Permutation test result. (a, c, e): OPLS-DA得分图, 缩写含义同图1; (b, d, f): 置换检验结果图

2.5.2 脂肪酸氧化相关代谢物 酰基肉碱是脂肪酸进入线粒体并参与 β -氧化过程的重要中间代谢物, 其丰度变化可反映脂肪酸转运及氧化代谢状态^[13-14]。本研究显示, 通辽牛肉中已酰肉碱、癸酰左旋肉

碱、月桂酰肉碱、棕榈酰肉碱和油酰-L-肉碱的相对丰度低于美国牛肉和山西牛肉（表1），说明其脂肪酸氧化相关代谢物积累水平较低，脂质能量代谢状态与其他1来源牛肉存在差异。脂肪酸氧化及脂质降解产物与肉品香气形成和氧化状态密切相关^[14-16]，因此酰基肉碱类物质的降低可能是通辽牛肉特征代谢谱中与脂质代谢相关的重要组成部分。需要注意的是，该结果主要反映脂肪酸氧化相关代谢差异，不能直接等同于肌肉脂肪含量或脂肪沉积能力的变化。

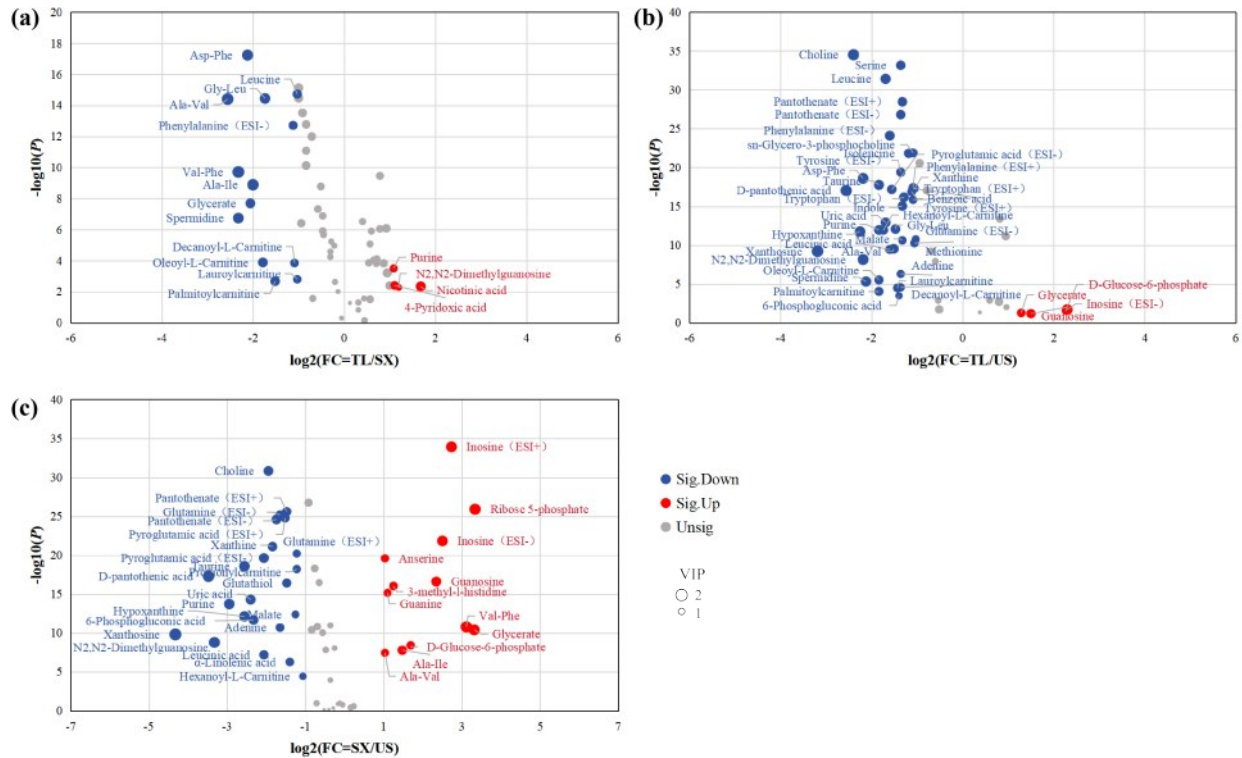


图4 不同来源牛肉样品两两比较的差异离子特征火山图

Fig. 4 Volcano plots of differential ion features in pairwise comparisons among beef samples from different sources

(a) Comparison between TL and SX; (b) comparison between TL and US; (c) comparison between SX and US. Each point represents an ion feature obtained through peak detection and alignment. The same compound detected in different ionization modes or as different adduct forms may correspond to multiple ion-feature points. Abbreviations as in Fig. 1 (a) TL与SX比较; (b) TL与US比较; (c) SX与US比较。图中每个点表示一个经峰提取和对齐获得的离子特征；同一化合物在不同离子模式或以不同加合离子形式检出时，可对应多个离子特征点。缩写含义同图1

2.5.3 糖代谢与能量代谢相关代谢物 糖代谢和能量代谢是宰后肌肉代谢变化的重要组成部分，与肌肉能量供应、氧化还原平衡和核苷酸代谢密切相关。磷酸戊糖途径可提供NADPH和核糖-5-磷酸，参与还原力维持和核苷酸合成^[17-18]。本研究结果显示，与美国牛肉相比，通辽牛肉中D-葡萄糖-6-磷酸和核糖-5-磷酸相对丰度较高（表1）。D-葡萄糖-6-磷酸是糖酵解和磷酸戊糖途径的重要分支节点，核糖-5-磷酸则是核苷酸合成和补救合成的重要前体。二者升高提示通辽牛肉中糖磷酸代谢物积累增加，并可能与糖代谢分流及核苷酸前体供应变化有关。通辽牛肉中苹果酸相对丰度低于美国牛肉（表1）。苹果酸是三羧酸循环相关中间代谢物^[19]，其变化提示通辽牛肉能量代谢状态与美国牛肉存在差异。综合来看，糖磷酸及能量代谢相关物质的差异性变化，提示通辽牛肉在糖代谢分配和能量代谢相关状态方面与山西和美国来源牛肉存在差异。

2.5.4 嘌呤及核苷酸代谢相关代谢物 嘌呤及核苷酸代谢与肉品滋味形成和宰后能量代谢密切相关。宰后ATP降解可形成IMP、肌苷、次黄嘌呤、黄嘌呤和尿酸等代谢物，其中IMP和GMP等核苷酸与鲜味形成有关，部分嘌呤降解产物则可能影响滋味变化^[12, 20]。本研究结果显示，与美国牛肉相比，通辽牛肉中腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿酸和黄嘌呤核苷等嘌呤降解相关代谢物相对丰度较低，而肌苷和鸟苷相对丰度较高（表1）。这一结果表明，通辽牛肉中核苷酸降解与补救合成相关代谢状态可能与美国牛肉存在差异。肌苷和鸟苷的积累可能为鲜味相关核苷酸代谢提供前体基础，而尿酸等终产物降低则提示嘌呤进一步降解程度相对较低。此外，N²，N²-二甲基鸟苷等修饰核苷在不同来源牛肉之间也

存在差异,提示核酸降解或修饰核苷代谢状态可能参与产地差异形成^[21]。因此,嘌呤及核苷酸代谢相关物质可作为通辽牛肉滋味前体特征和判别的重要候选代谢物。

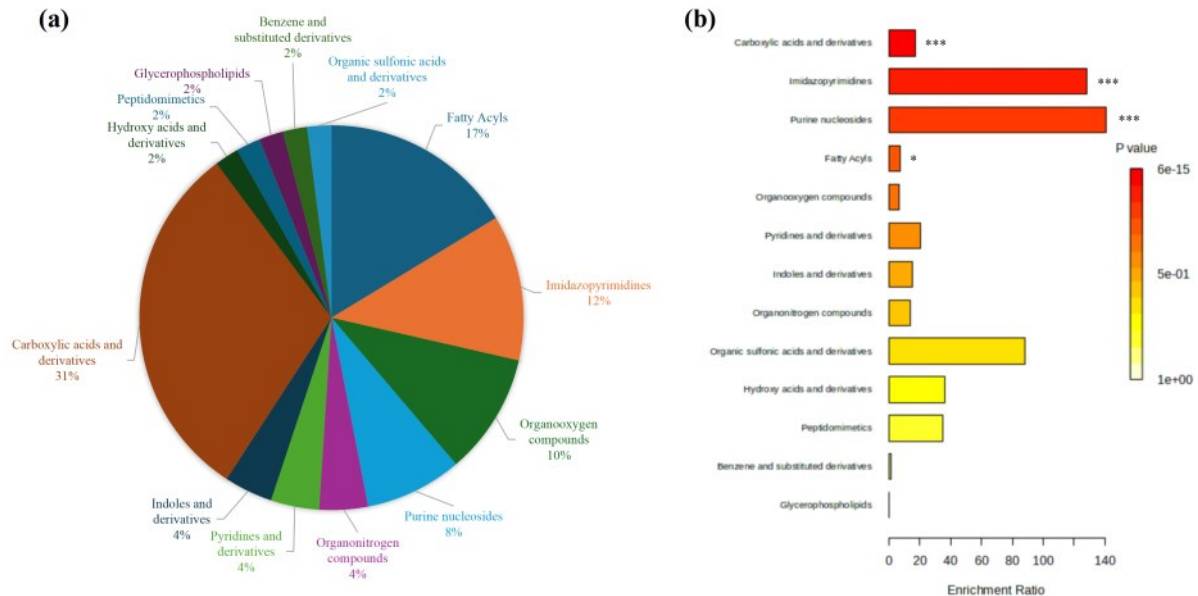


图5 不同来源牛肉差异代谢物的化学分类统计与富集分析

Fig. 5 Chemical taxonomy and enrichment analysis of differential metabolites in beef from different sources
(a) Chemical class composition of differential metabolites; (b) over-representation analysis of chemical classes performed using the MetaboAnalyst online platform. Enrichment significance was evaluated using the hypergeometric test, followed by Benjamini - Hochberg correction for multiple comparisons. *** indicates FDR < 0.001, and * indicates FDR < 0.05. (a) 差异代谢物的化学类别构成; (b) 基于 MetaboAnalyst 在线平台进行的化学类别过度代表分析。富集显著性采用超几何检验评价,并通过 Benjamini - Hochberg 方法进行多重检验校正。***表示 FDR < 0.001, *表示 FDR < 0.05。

2.5.5 维生素B族及其他特征代谢物 维生素B族代谢物参与氨基酸代谢、脂肪酸代谢、能量代谢和氧化还原调控。本研究结果显示,通辽牛肉中4-吡哆酸在与山西牛肉比较中相对丰度较高(表1)。4-吡哆酸是维生素B6代谢的终产物,可反映维生素B6相关代谢状态^[22-23]。与美国牛肉相比,通辽牛肉中泛酸盐和D-泛酸相对丰度较低。泛酸是辅酶A合成的重要前体,参与脂肪酸氧化和能量代谢过程^[24-25],其降低与前述酰基肉碱类物质减少所反映的脂肪酸氧化相关代谢变化具有一定一致性。与山西牛肉相比,通辽牛肉中烟酸相对丰度较高(表1)。烟酸是NAD⁺和NADP⁺的重要前体,参与氧化还原反应和能量代谢调控^[26]。本研究中烟酸相关代谢物的差异性变化,提示通辽牛肉在氧化还原辅酶相关代谢状态方面与山西和美国来源牛肉可能存在差异。

此外,亚精胺、牛磺酸、苯甲酸和吡啶等代谢物在通辽牛肉中也表现出差异(表1)。亚精胺与多胺代谢和蛋白稳态有关^[27-29],牛磺酸与膜稳定和胆汁酸结合等过程相关^[30],苯甲酸和吡啶则可能与芳香族氨基酸代谢及微生物相关代谢有关。这些代谢物的变化进一步丰富了通辽牛肉特征代谢谱的组成。

不同来源牛肉代谢物组成的差异可能与当地养殖模式、日粮结构及动物营养代谢状态有关。通辽肉牛养殖通常具有天然草场放牧与谷物补饲相结合的特点,而美国肉牛生产多采用较为标准化的谷物育肥模式。不同饲料来源及能量、蛋白质和脂肪酸供给水平,可能影响宰前肌肉的营养代谢状态,并进一步影响宰后蛋白质降解、脂肪酸转运和能量代谢相关物质的积累。本研究中,通辽牛肉多种游离氨基酸、二肽及酰基肉碱类代谢物的相对丰度低于美国牛肉,可能与不同饲养体系下肌肉蛋白质周转、脂底物供给及脂肪酸氧化相关代谢状态存在差异有关;与此同时,D-葡萄糖-6-磷酸、核糖-5-磷酸以及部分嘌呤核苷类物质的差异,提示不同养殖条件下肌肉糖代谢分配和核苷酸代谢状态可能有所不同。需要指出的是,本研究各组样品在品种、供应来源、具体日粮、屠宰后成熟以及运输贮藏条件等方面未能完全统一,所观察到的代谢差异可能是地理环境、遗传背景、饲养管理及宰后处理条件共同作用的结果,尚不能完全归因于单一的产地效应。因此,本研究筛选的差异代谢物应视为候选产地相关代谢物,其形成机制和判别稳定性仍需通过控制饲养试验、靶向代谢组学及独立样本进一步验证。

综上，通辽牛肉的特征代谢谱主要表现为游离氨基酸和二肽低积累、酰基肉碱类物质相对丰度较低、糖磷酸代谢物和嘌呤核苷类代谢物发生变化，并伴随维生素B族、多胺、牛磺酸、苯甲酸和吡嗪等代谢物差异，涉及氨基酸和二肽代谢、脂肪酸代谢、糖代谢、核苷酸代谢及氧化还原调控等过程，构成通辽牛肉区别于山西牛肉和美国牛肉的主要代谢特征（图6）。

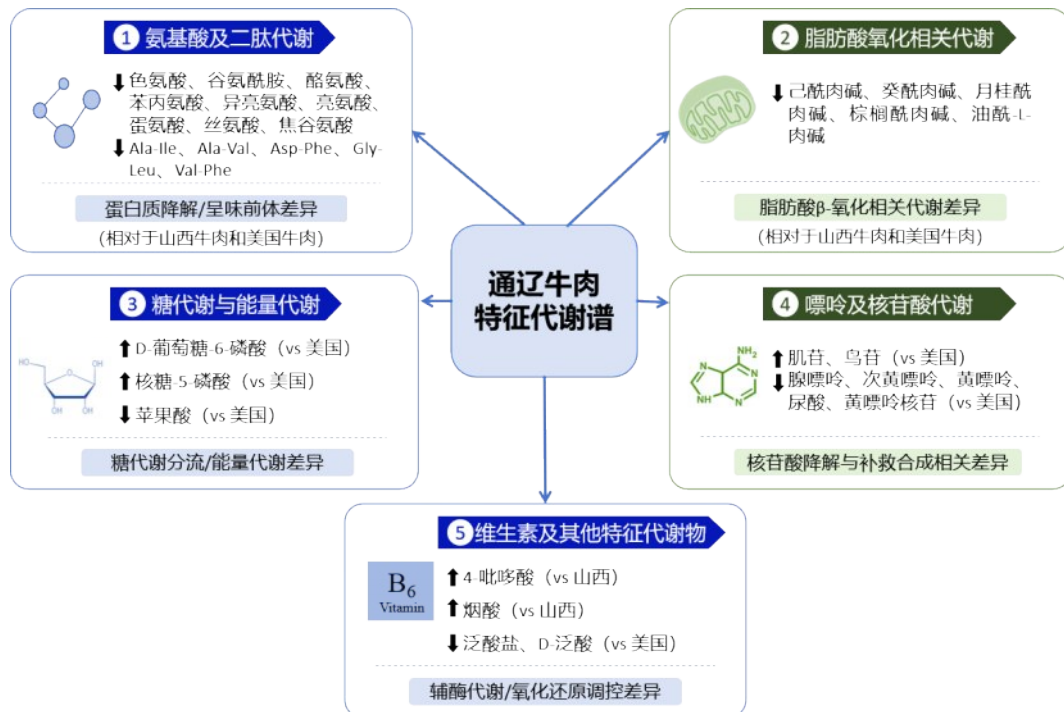
表1 通辽牛肉特征差异代谢物汇总
Table 1 Summary of characteristic differential metabolites in Tongliao beef

分类	代谢物英文名称	代谢物中文名称	加合离子类型	FC（通辽牛肉/山西牛肉）	FC（通辽牛肉/进口牛肉）	FC（山西牛肉/美国牛肉）	主要关联代谢通路
氨基酸及二肽代谢	Tryptophan	色氨酸	[M-H] ⁻	-	0.41	-	蛋白质降解、呈味前体
			[M+H] ⁺	-	0.47	-	
	Glutamine	谷氨酰胺	[M-H] ⁻	-	0.49	0.32	
			[M+H] ⁺	-	0.66	0.43	
	Tyrosine	酪氨酸	[M-H] ⁻	-	0.39	-	
			[M+H] ⁺	-	0.47	-	
	Phenylalanine	苯丙氨酸	[M-H] ⁻	0.46	0.33	-	
			[M+H] ⁺	0.56	0.47	-	
	Isoleucine	异亮氨酸	[M+H] ⁺	-	0.44	-	
	Leucine	亮氨酸	[M-H] ⁻	0.49	0.31	-	
	Methionine	蛋氨酸/甲硫氨酸	[M+H] ⁺	-	0.48	-	
	Serine	丝氨酸	[M-H] ⁻	-	0.39	-	
			[M+H] ⁺	-	0.34	0.24	
	Pyroglutamic acid	焦谷氨酸	[M+H] ⁺	-	0.52	0.35	
	Leucinic acid	亮氨酸羧基酸	[M-H] ⁻	-	0.33	0.24	
	3-methyl-l-histidine	3-甲基-L-组氨酸	[M-H] ⁻	-	-	2.39	
	Ala-Ile	丙氨酸-异亮氨酸	[M+H] ⁺	0.25	-	2.79	
	Ala-Val	丙氨酸-缬氨酸	[M+H] ⁺	0.17	0.35	2.05	
	Asp-Phe	天冬氨酸-苯丙氨酸	[M-H] ⁻	0.23	0.22	-	
	Gly-Leu	甘氨酸-亮氨酸	[M+H] ⁺	0.3	0.36	-	
脂肪酸氧化相关代谢	Val-Phe	缬氨酸-苯丙氨酸	[M+H] ⁺	0.2	-	8.69	脂肪酸β-氧化
	Anserine	鹅肌肽	[M-H] ⁻	-	-	2.05	
	Propionylcarnitine	丙酰肉碱（C3）	[M+H] ⁺	-	-	0.43	
	Hexanoyl-L-Carnitine	己酰肉碱（C6）	[M+H] ⁺	-	0.3	0.48	
	Decanoyl-L-Carnitine	癸酰肉碱（C10）	[M+H] ⁺	0.47	0.39	-	
	Lauroylcarnitine	月桂酰肉碱（C12）	[M+H] ⁺	0.49	0.37	-	
	Palmitoylcarnitine	棕榈酰肉碱（C16）	[M+H] ⁺	0.35	0.28	-	
糖代谢与能量代谢	Oleoyl-L-Carnitine	油酰-L-肉碱（C18:1）	[M+H] ⁺	0.29	0.28	-	糖代谢、三羧酸循环相关代谢
	D-Glucose-6-phosphate	D-葡萄糖 6-磷酸	[M-H] ⁻	-	4.79	3.24	
	Ribose 5-phosphate	核糖-5-磷酸	[M-H] ⁻	-	8.32	10.12	
	Malate	苹果酸	[M-H] ⁻	-	0.4	0.42	
	6-Phosphogluconic acid	6-磷酸葡萄糖酸	[M-H] ⁻	-	0.38	0.2	
嘌呤及核苷酸代谢	Glycerate	甘油酸	[M-H] ⁻	0.24	2.44	9.98	核苷酸代谢、滋味前体；嘌呤降解
	Purine	嘌呤	[M-H] ⁻	2.12	0.28	0.13	
	Inosine	肌苷	[M-H] ⁻	-	4.92	5.69	
			[M+H] ⁺	-	6.06	6.66	
	Guanosine	鸟苷	[M-H] ⁻	-	2.83	5.09	
	N2, N2-Dimethyl-guanosine	N ² , N ² -二甲基鸟苷	[M+H] ⁺	2.29	0.22	0.1	
	Adenine	腺嘌呤	[M-H] ⁻	-	0.39	0.32	
	Guanine	鸟嘌呤	[M+H] ⁺	-	-	2.15	
	Hypoxanthine	次黄嘌呤	[M+H] ⁺	-	0.21	0.17	
	Xanthine	黄嘌呤	[M+H] ⁺	-	0.48	0.28	
	Uric acid	尿酸	[M-H] ⁻	-	0.31	0.19	
	Xanthosine	黄嘌呤核苷	[M-H] ⁻	-	0.11	0.05	
维生素代谢	4-Pyridoxic acid	4-吡哆酸	[M-H] ⁻	2.15	-	-	辅酶代谢、氧化还原调控
	Nicotinic acid	烟酸	[M-H] ⁻	3.20	-	-	
	D-pantothenic acid	D-泛酸	[M-H] ⁻	-	0.39	0.30	

(续表)

分类	代谢物英文名称	代谢物中文名称	加合离子类型	FC (通辽牛肉/山西牛肉)	FC (通辽牛肉/进口牛肉)	FC (山西牛肉/美国牛肉)	主要关联代谢通路
其他			[M+H] ⁺	-	0.4	0.36	-
			[2M-H] ⁻	-	0.17	0.09	
	Spermidine	亚精胺	[M+H] ⁺	0.2	0.23	-	
	Taurine	牛磺酸	[M-H] ⁻	-	0.28	0.17	
	Benzoic acid	苯甲酸	[M+H] ⁺	-	0.46	-	
	Indole	吲哚	[M-H] ⁻	-	0.4	-	
	Choline	胆碱	[M] ⁺	-	0.19	0.26	
	Glutathiol	氧化谷胱甘肽	[M-H] ⁻	-	-	0.36	
	sn-Glycero-3-phosphocholine	磷脂酰胆碱	[M] ⁺	-	0.47	-	
	α -Linolenic acid	α -亚麻酸	[M-H] ⁻	-	-	0.38	

同一代谢物在不同离子模式或不同加合离子形式下重复检出时,按同一种化合物计数;各离子形式的FC值分别列示。“-”代表两组比较无统计学显著性差异 ($P \geq 0.05$)



注: ↑表示通辽牛肉中相对丰度升高, ↓表示通辽牛肉中相对丰度降低; vs表示与相应比较组相比。

图6 通辽牛肉特征代谢物及相关代谢通路示意图

Fig. 6 Schematic diagram of characteristic metabolites and related metabolic pathways in Tongliao beef

2.6 分类判别模型验证

为验证筛选差异代谢物对不同来源牛肉样品的判别能力,本研究基于特征代谢物数据矩阵构建了PCA-Class分类模型。随机抽取70%的样本作为训练集,分别建立不同来源牛肉的PCA-Class鉴别模型;剩余30%的样本作为验证集,用于评价模型分类预测效果。训练集与验证集之间不存在样本重叠。

图7左侧为Coomans判别图,右侧为对应比较组的ROC曲线。Coomans判别图显示,三组两两比较中,不同来源牛肉样品总体分布于各自类别模型的判别区域,组间分离较清晰,说明该模型能够有效区分不同来源样品。ROC分析显示,各比较组曲线均明显高于随机分类参考线,AUC值均大于0.9,部分比较组接近或达到1,表明模型具有较强的判别性能。进一步对验证集进行分类预测,结果显示分类准确率超过95%(表2),说明实际类别与预测类别之间具有显著一致性,模型分类结果并非随机产生。

综合来看, PCA-Class 模型的 Coomans 判别图、ROC 曲线及验证集分类结果与前述 PCA、HCA、OPLS-DA 及火山图筛选结果一致, 进一步证明不同来源牛肉具有可区分的代谢指纹特征。筛选获得的特征代谢物不仅能够反映不同来源牛肉的代谢差异, 也具有较好的分类预测能力, 可为通辽牛肉判别和候选代谢标志物筛选提供依据。

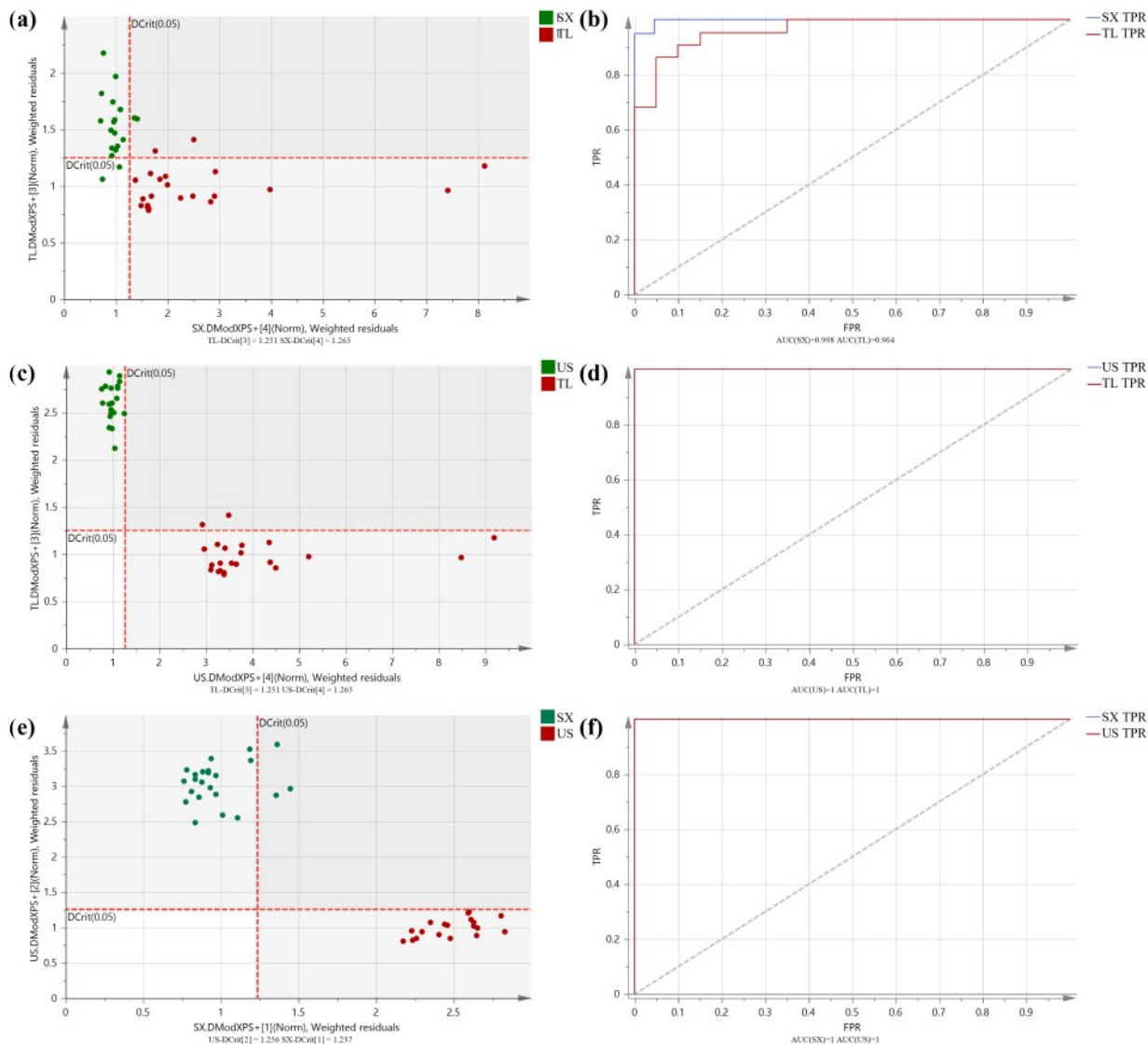


图 7 PCA-Class 分类模型及 ROC 曲线分析

Fig. 7 PCA-Class classification models and ROC curve analysis

(a), (c), and (e) Coomans' plots of pairwise comparisons among beef samples from different sources; (b), (d), and (f) ROC curves of the corresponding comparison groups. (a)、(c)、(e) 不同来源牛肉两两比较的 Coomans 判别图; (b)、(d)、(f) 对应比较组的 ROC 曲线。

3 结 论

本研究以解析通辽牛肉特征代谢谱及建立判别模型为目标, 采用 UHPLC-Q-TOF/MS 非靶向代谢组学技术, 结合 PCA、HCA、OPLS-DA 及 PCA-Class 分类模型, 系统比较了通辽、山西和美国来源牛肉的小分子代谢组成差异。研究表明, 不同来源牛肉具有明确的代谢轮廓分离特征, 共筛选获得 49 种特征代谢物, 主要涉及氨基酸及肽类代谢、脂肪酸代谢、糖代谢分流、嘌呤及核苷酸代谢调控等过程。通辽牛肉中多种游离氨基酸、二肽及酰基肉碱类物质的相对丰度较低, 糖磷酸化中间产物和核苷相关代谢物呈现差异性变化, 提示其风味前体物质组成、能量代谢及核苷酸代谢相关状态与山西和美国来源牛肉可能存在差异。基于特征代谢物构建的 PCA-Class 模型 AUC 值均大于 0.9, 验证集分类准确率超过 95%, 证明所筛选代谢物具有可靠的判别能力。综上, 本研究从小分子代谢物层面揭示了通辽来

源的牛肉区别于山西和美国来源的牛肉的代谢基础,构建了“特征代谢物筛选—代谢通路解析—分类验证”的判别思路,可为通辽牛肉差异化评价、候选代谢标志物筛选及地理标志农产品资源开发提供科学依据。研究仍受样本规模、批次来源及饲养、屠宰加工和贮藏条件控制不足等因素限制,后续需结合多批次样本和靶向定量验证,进一步验证候选标志物的稳定性和适用性。

表2 PCA-Class模型对不同来源牛肉验证集样本的分类预测结果

Table 2 Classification prediction results of PCA-Class models for validation samples of beef from different sources

比较组	实际类别	样本数	正确率	判为山西牛肉	判为美国牛肉	判为通辽牛肉	未分类
通辽牛肉 vs 山西牛肉	山西牛肉	10	100%	10	—	0	0
	通辽牛肉	8	100%	0	—	8	0
	未分类	0	0	—	—	0	0
	总计	18	100%	10	—	8	0
Fisher概率				2.00×10 ⁻⁰⁵			
通辽牛肉 vs 美国牛肉	通辽牛肉	8	100%	—	0	8	0
	美国牛肉	10	100%	—	10	0	0
	未分类	0	—	—	0	0	0
	总计	18	100%	—	10	8	0
Fisher概率				2.30×10 ⁻⁰⁵			
山西牛肉 vs 美国牛肉	山西牛肉	7	100%	7	0	—	0
	美国牛肉	11	100%	0	11	—	0
	未分类	0	0	—	—	—	0
	合计	18	100%	7	11	—	0
Fisher概率				3.10×10 ⁻⁰⁵			

参考文献:

- [1] Benli H, Yildiz D G. *Anim Biosci*, **2023**, 36 (8): 1274–1284.
- [2] Garmyn A. *Foods*, **2020**, 9 (6): 708.
- [3] Miller R. *Foods*, **2020**, 9 (4): 428–428.
- [4] Veiseth-Kent E, Pedersen M E, Rønning S B, Rødbotten R. *Meat Science*, **2018**, 137: 114–122.
- [5] Keady S M, Waters S M, Hamill R M, Dunne P G, Keane M G, Richardson R I, Kenny D A, Moloney A P. *Meat Science*, **2017**, 125: 128–136.
- [6] Jeong J Y, Baek Y C, Ji S Y, Oh Y K, Cho S, Seo H W, Kim M, Lee H J. *J Anim Sci Technol*, **2020**, 62 (3): 321–333.
- [7] Li Y B, Jiang Q F, Chen Y F, Li D S, Zhao W, Tong J L, Gu Y L, Zhang J. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*. 李亚博, 蒋秋斐, 陈亚飞, 李德生, 赵薇, 佟丽佳, 顾亚玲, 张娟. *华北农学报*, **2024**, 39 (S1): 289–297.
- [8] Wang Z B, Liu S, He L X, Feng X, Yang M L, Wang S Z, Liu Y, Feng L, Ding X L, Ji G S, Yang R J, Zhang L P, Ma Y. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, (王中波, 刘爽, 贺丽霞, 冯雪, 杨梦丽, 汪书哲, 刘源, 冯兰, 丁晓玲, 冀国尚, 杨润军, 张路培, 马云. *畜牧兽医学报*), **2024**, 55 (04): 1565–1578.
- [9] Maritha V, Widyanti H P, Ida M, Mohamad R, Fang G, and Muchtaridi M. *International Journal of Food Properties*, **2023**, 26 (2): 3148–3159.
- [10] Dashdorj D, Amna T, Hwang I. *European Food Research and Technology*, **2015**, 241 (2): 157–171.
- [11] Wong K H, Aziz S A, Mohamed S. *International Journal of Food Science & Technology*, **2008**, 43 (9): 1512–1519.
- [12] Mottram D S. *Food Chemistry*, **1998**, 62 (4): 415–424.
- [13] Lee D, Kim H J, Ismail A, Kim S S, Yim D G, Jo C. *Anim Biosci*, **2023**, 36 (7): 1101–1119.
- [14] Kaneko G. *Foods*, **2021**, 10 (11): 2749.
- [15] Piccinin E, Cariello M, De Santis S, Ducheix S, Sabbà C, Ntambi J M, Moschetta A. *Nutrients*, **2019**, 11 (10).
- [16] Hoa V B, Cho S H, Seong P N, Kang S M, Kim Y S, Moon S S, Choi Y M, Kim J H, Seol K H. *J Food Sci Technol*, **2021**, 58 (10): 3972–3980.
- [17] Tara T, Markus R, Jing F, D. R J. *Nature Metabolism*, **2023**, 5 (8): 1275–1289.
- [18] Lin Z, Xueqiao W, Zhuying W, Miaomiao Y, Xinyu Z, Jiaru L, Chunling B, Guanghua S, Xuefei L, Lei Y, Guangpeng L. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2022**, 2022: 3497644–3497644.
- [19] Ling L, Supriya S, Jing F, O P J, E W K, D R J. *Nature chemical biology*, **2016**, 12 (5): 345–52.
- [20] Koutsidis G, Elmore J S, Oruna-Concha M J, Campo M M, Wood J D, Mottram D S. *Meat Science*, **2008**, 79 (1): 124–130.
- [21] Liu Y, Zhang X, Wang K, Li Q, Yan S, Shi H, Liu L, Liang S, Yang M, Su Z, Ge C, Jia J, Xu Z,

- Dou T. *Foods*, **2024**, 13 (13): 2008–2008.
- [22] Ueland P M, Ulvik A, Rios-Avila L, Midttun Ø, Gregory J F. *Annual Review of Nutrition*, **2015**, 35 (1): 33–70.
- [23] Lumeng L, Brashear R E, Li T K. *J Lab Clin Med*, **1974**, 84 (3): 334–43.
- [24] Leonardi R, Jackowski S. *EcoSal Plus*, **2007**, 2 (2) .
- [25] Zhang Y-M, Frank M W, Virga K G, Lee R E, Rock C O, Jackowski S. *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, 279 (49): 50969–50975.
- [26] Cantó C, Menzies Keir J, Auwerx J. *Cell Metabolism*, **2015**, 22 (1): 31–53.
- [27] Kamalakshi D, Archana S, Surajit C, Rupak M, Sougata S. *Cell death discovery*, **2016**, 2: 16074.
- [28] Thorsten H, Ehud C. *Genetics*, **2020**, 215 (4): 889–901.
- [29] Di Luca A, Elia G, Mullen A M, Hamill R M. *Proteome Sci*, **2013**, 11 (1): 9.
- [30] Hofmann A F, Hagey L R. *Journal of Lipid Research*, **2014**, 55 (8): 1553–1595.

(责任编辑:)