



宰后不同时间滩羊肉抗氧化活性的变化及可能机制

侯成立¹, 黄彩燕¹, 郑晓春¹, 刘维华², 杨奇²✉, 张德权¹✉

¹中国农业科学院农产品加工研究所/农业农村部农产品加工重点实验室, 北京 100193; ²宁夏回族自治区兽药饲料监察所, 银川 750011

摘要:【目的】探究宰后不同时间滩羊肉抗氧化活性的变化, 并从游离氨基酸、蛋白质组角度阐释其机制, 为生鲜羊肉的品质保持提供数据支持。【方法】选取 6 只 6 月龄健康舍饲滩羊公羊 (18.30 ± 1.41) kg, 在宰后 0.5、3、6、12 和 48 h 取背最长肌, 测定铁离子还原/抗氧化能力 (ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)、2, 2-联氮基双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (2, 2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate), ABTS) 自由基清除能力、2, 2-二苯代苦味酰基苯肼 (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除能力、氧自由基吸收能力 (oxygen-radical absorbance capacity, ORAC)、*N,N*-二甲基-对苯二胺 (*N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine, DMPD) 总抗氧化能力、游离氨基酸含量和蛋白质组变化。【结果】宰后 48 h 内, 滩羊肉中 FRAP 总抗氧化能力呈先下降后上升趋势, ABTS 自由基清除能力呈先升高后趋于稳定趋势, DPPH、DMPD 自由基清除能力和 ORAC 整体均呈现上升趋势; 宰后 48 h 滩羊肉中 FRAP 总抗氧化能力、ABTS、DPPH、DMPD 自由基清除能力和 ORAC 显著高于宰后 0.5 h 和 3 h 水平 ($P < 0.05$); 宰后不同时间点滩羊肉中游离氨基酸总含量差异不显著 ($P > 0.05$), 但胱氨酸、亮氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、精氨酸的含量在不同时间点存在显著性差异 ($P < 0.05$), 且总体呈现增加的趋势。与 FRAP 呈显著正相关关系的游离氨基酸有 7 个, 包括邻磷酸丝氨酸 ($r=0.489$, $P < 0.01$)、亮氨酸 ($r=0.566$, $P < 0.01$)、酪氨酸 ($r=0.596$, $P < 0.01$)、异亮氨酸 ($r=0.374$, $P < 0.05$)、苯丙氨酸 ($r=0.499$, $P < 0.01$)、赖氨酸 ($r=0.375$, $P < 0.05$) 和精氨酸 ($r=0.376$, $P < 0.05$); 其中, 亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、精氨酸与 FRAP、ABTS、DPPH、ORAC、DMPD 均呈现显著正相关关系 ($P < 0.05$)。蛋白质组鉴定筛选出宰后不同时间滩羊肉中差异蛋白 20 个, 与 FRAP 显著相关的差异蛋白有 12 个 ($P < 0.05$), 钙蛋白酶抑制蛋白和未知蛋白 2 与 FRAP、ABTS、DPPH、ORAC、DMPD 均呈现显著负相关关系 ($P < 0.05$), 而糖原蛋白 1 和蛋白激酶结构域蛋白与 FRAP、ABTS、DPPH、ORAC、DMPD 均呈现显著正相关关系 ($P < 0.05$)。【结论】滩羊肉抗氧化能力的升高与宰后肌肉中亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、精氨酸等游离氨基酸的释放有关。宰后初期肌肉中钙蛋白酶抑制蛋白、未知蛋白 2 等蛋白表达量的下降和糖原蛋白 1、蛋白激酶结构域蛋白等蛋白表达量的上升与宰后滩羊肉抗氧化能力的变化显著相关。

关键词: 宰后; 抗氧化活性; 游离氨基酸; 蛋白质组; 羊肉

Changes of Antioxidant Activity and Its Possible Mechanism in Tan Sheep Meat in Different Postmortem Time

HOU ChengLi¹, HUANG CaiYan¹, ZHENG XiaoChun¹, LIU WeiHua², YANG Qi²✉, ZHANG DeQuan¹✉

¹Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100193; ²Ningxia Veterinary Drugs and Fodder Inspection Institute, Yinchuan 750011

Abstract: 【Objective】The aim of this study was to explore the changes of antioxidant activity of Tan sheep meat at different time points after slaughter, and to explain its mechanism from the perspective of free amino acids and proteome, so as to provide the data

收稿日期: 2021-05-17; 接受日期: 2021-08-10

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划 (2018BBF02002)、国家肉羊产业技术体系 (CARS-38)

联系方式: 侯成立, E-mail: houchengli@caas.cn. 通信作者张德权, E-mail: dequan_zhang0118@126.com. 通信作者杨奇, E-mail: yangqmz@163.com

support for the quality maintenance of fresh mutton. 【Method】 Six 6-month-old healthy stall-feeding male lambs (18.30 ± 1.41 kg) were selected in this study. The *longissimus dorsi* of the lambs was collected at 0.5, 3, 6, 12 and 48 h after slaughter to determine the ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), free radical scavenging capacity of 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), oxygen-radical absorbance capacity (ORAC) of DPPH, total antioxidant capacity of *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine (DMPD), content of free amino acids and the changes of proteomic. 【Result】 The results showed that within 48 h postmortem, the FRAP total antioxidant capacity decreased first and then increased. While the free radical scavenging capacity of ABTS increased first and then tended to be stable. The free radical scavenging capacity and ORAC of DPPH and DMPD all showed an upward trend. Total antioxidant capacity of FRAP, free radical scavenging capacity and ORAC of ABTS, DPPH, DMPD of Tan sheep meat at 48 h after slaughter were all significantly higher than those at 0.5 and 3 h after slaughter ($P < 0.05$). No significant difference was found in total content of free amino acids ($P > 0.05$), but the contents of Cys, Leu, Tyr, Ile, Phe and Arg in Tan sheep meat were significantly different among different time points after slaughter ($P < 0.05$), and showed an increase trend. There were 7 free amino acids positively correlated with FRAP, including o-phosphoserine ($r = 0.489$, $P < 0.01$), leucine ($r = 0.566$, $P < 0.01$), tyrosine ($r = 0.596$, $P < 0.01$), isoleucine ($r = 0.374$, $P < 0.05$), phenylalanine ($r = 0.499$, $P < 0.01$), lysine ($r = 0.375$, $P < 0.05$) and arginine ($r = 0.376$, $P < 0.05$). Among them, Leu, Tyr, Phe and Arg were significantly positively correlated with FRAP, ABTS, DPPH, ORAC and DMPD ($P < 0.05$). Twenty differential proteins in Tan sheep meat at different time points after slaughter were screened and identified by proteomic. There were 12 differential proteins significantly correlated with FRAP ($P < 0.05$). Calpain inhibitor protein and unknown protein 2 were significantly negatively correlated with FRAP, ABTS, DPPH, ORAC and DMPD ($P < 0.05$). Glycogen protein 1 and protein kinase domain proteins were significantly positively correlated with FRAP, ABTS, DPPH, ORAC and DMPD ($P < 0.05$). 【Conclusion】 This research indicated that the total antioxidant capacity of Tan sheep meat increased within 48 h after slaughter, which was related to the release of free amino acids such as Leu, Tyr, Phe and Arg in the postmortem muscle. The decrease protein expression of calpain inhibitor protein and unknown protein 2, and the increased protein expression of glycogen protein 1 and protein kinase domain protein in muscle were significantly correlated with the changes of antioxidant capacity of Tan sheep meat after slaughter.

Key words: postmortem; antioxidant activity; free amino acids; proteome; lamb

0 引言

【研究意义】羊肉是三大畜肉之一, 是优质的蛋白质食品, 营养价值高, 可提供人体必需的氨基酸、脂肪酸、矿物质和维生素等。盐池滩羊是我国优良特色畜种、中国地理标志产品, 盐池滩羊肉肉质细嫩、无膻味、脂肪分布均匀、风味独特, 深受广大消费者喜爱, 是我国高端羊肉的代表品牌。近年来, 随着人们生活水平的提高, 消费者越来越多地关注肉品的新鲜度、安全性和功能性, 对高品质健康肉的需求越来越大^[1-2]。肉的抗氧化能力与肉品质密切相关, 研究宰后不同时间羊肉抗氧化活性变化对生鲜羊肉的品质调控具有重要意义。【前人研究进展】动物宰后会经历僵直、解僵成熟、腐败 3 个过程, 宰后不同贮藏时间对羊肉品质有重要影响^[3]。僵直前羊肉保水性高、营养物质流失少, 加工特性优于解僵后的羊肉^[4-5]; 僵直前和解僵初期煮制的羊肉风味物质含量丰富, 而解僵后烤制的羊肉风味物质含量相对丰富^[6]。关于宰后僵直和解僵成熟过程对肉品质的影响在国内外已开展了大量研究, 而对僵直前生鲜肉的品质研究则较少, 从

而成为近年来的热点。动物屠宰后, 肌肉内仍进行着各种氧化反应, 并且氧化反应的程度与肉品质密切相关^[7-8]。研究表明, 生鲜肉加工与贮藏过程中, 蛋白质的氧化是导致肉品品质下降的主要原因, 如蛋白质氧化能够抑制 μ -钙蛋白酶的活性从而影响生鲜肉嫩度^[9]。宰后肌肉的抗氧化活性与饲养过程中的饲料组成、动物品种、年龄、分割部位、贮藏时间等外部因素有关, 同时生鲜肉的抗氧化活性与游离氨基酸的组成与含量密切相关^[10-15]。【本研究切入点】现有研究更多地关注解僵成熟生鲜肉在贮藏过程中的氧化反应变化, 关于宰后早期羊肉抗氧化活性的变化未见报道。

【拟解决的关键问题】本试验以滩羊为研究对象, 在宰后 0.5、3、6、12 和 48 h 取背最长肌, 探究宰后不同时间滩羊肉抗氧化活性的变化, 并从游离氨基酸、蛋白质组角度阐释抗氧化活性变化的原因, 为开发高品质羊肉提供数据支持。

1 材料与方法

样品采集试验于 2018 年 12 月在宁夏盐池滩羊产业发展集团有限公司进行; 样品测定试验于 2019—

2020 年在中国农业科学院农产品加工研究所肉品实验室和农业农村部农产品加工重点实验室进行。

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品采集 选取同一养殖场的 6 月龄健康舍饲未去势公滩羊 6 只, 饲喂大北农集团肉羊育肥期配合饲料。按伊斯兰屠宰方式屠宰, 胴体重为 (18.30 ± 1.41) kg, 宰后立即推入 $0-4^{\circ}\text{C}$ 冷却间冷却, 分别在宰后 0.5、3、6、12 和 48 h 取单侧背最长肌的部分肌肉样品 (约 100 g), 每个时间点分别各选择 3 只滩羊取左侧背最长肌、3 只滩羊取右侧背最长肌样品, 剔除表面脂肪和筋膜, 将肌肉样品分为两份, 一份 5 g 左右, 经液氮冷冻后干冰保存, 冷链运输至实验室, -80°C 贮存, 用于蛋白质组学分析; 剩余 95 g 左右样品, 经液氮冷冻后, 用干冰保存, 并用冷链运输至实验室, -20°C 贮存备用, 用于游离氨基酸、抗氧化性能测定。

1.1.2 主要仪器与试剂 LGJ-25 冷冻干燥机, 北京四环科学仪器厂; 超低温冰箱, 美国 Thermo 公司; ML204/02 电子天平, 上海梅特勒-托利多有限公司; FCR1000-UF-E 超纯水机, 青岛富勒姆科技有限公司; SpectraMax 190 全波长酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; L-8900 全自动氨基酸分析仪, 日本日立公司; HITACHI 高速冷冻离心机, 日立 (中国) 有限公司; TissueLyser LT 研磨仪, 德国 QIAGEN 公司; Sorvall™ Legend™ Micro 17 微量离心机, 美国 Thermo 公司; Ultra Turrax Disperser S25 匀浆仪, 德国 IKA 集团; SC210A 真空干燥仪, 美国 Thermo 公司; RIGOL L-3000 高效液相色谱, 北京普源精电科技有限公司; Orbitrap Q-Exactive HF 质谱仪, 美国 Thermo 公司。

氧自由基吸收能力 (oxygen-radical absorbance capacity, ORAC) 抗氧化试剂盒 (AOX-2), Zenbio 公司; 总抗氧化能力检测试剂盒 (2, 2-联氨基双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (2, 2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate), ABTS 快速法), 上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 抗氧化活性的测定 采用 QUENCHER 方法对抗氧化活性进行测定^[13]。

1.2.1.1 样品制备 参考 OH 等^[16]方法制备样品, 称取 10 g 滩羊背最长肌样品, 切碎, 采用冷冻干燥机进行冻干 (冷阱温度 -60°C , 物料温度 -40°C , 真空度 1 Pa), 冻干时间为 27 h; 将冻干后的样品采用研钵研磨, 并与纤维素以 1 : 1 (w/w) 的比例混合, 稀释

后采用 50 目筛过筛, 用于抗氧化能力的测定。

1.2.1.2 铁离子还原/抗氧化能力 (ferric ion reducing antioxidant power, FRAP) 测定 参考 BENZIE 和 STRAIN^[17]的方法, 分别配制 $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液 (pH 3.6)、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4,6-三吡啶-咪唑 (TPTZ) 溶液与 $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸的混合液、 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化铁溶液, 并以 10 : 1 : 1 (v/v/v) 的比例混合制备 FRAP 工作液, 在 37°C 孵育 30 min 后使用。将 10 mg 肉粉-纤维素 (1 : 1) 样品转移到 15 mL 离心管中, 加入 10 mL FRAP 工作液开始反应, 避光涡旋 30 s 使试管充分混合, 于室温避光条件下在轨道摇床上以 200 r/min 的速度摇晃混合物, 以促进样品颗粒和 FRAP 溶液之间的充分反应, 将自由基溶液引入肉样品 120 min 后, $699\times g$ 离心 2 min, 取 200 μL 上清液转移到 96 孔板中, 并在 595 nm 处测量吸光度值。FRAP 活性表示为每千克干重肉的 Trolox 毫摩尔当量 (mmol Trolox Eq./kg 干肉)。

1.2.1.3 ABTS 自由基清除能力测定 采用总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS 法) 进行检测, 按照试剂盒操作说明进行前处理, 称取 10 mg 肉粉-纤维素 (1 : 1) 样品转移到 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 冰冷的磷酸缓冲盐溶液进行匀浆, 4°C 下 $12\,000\times g$ 离心 5 min, 取上清液用于后续测定。取 20 μL 过氧化物酶工作液加入到 96 孔板中, 加入 10 μL 待测样品上清液后, 加入 170 μL ABTS 工作液, 轻轻混匀, 室温孵育 6 min, 并在 414 nm 处测定吸光度值。ABTS 自由基清除能力表示为每千克干重肉的 Trolox 毫摩尔当量 (mmol Trolox Eq./kg 干肉)。

1.2.1.4 2,2-二苯代苦味酰基苯肼 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除能力测定 参考 OH 等^[16]方法进行测定, 称取 40 mg DPPH 溶解于 100 mL 乙醇中制备 DPPH 储备溶液 A, 然后用 100 mL 去离子水稀释 DPPH 储备溶液 A, 获得水-乙醇 (50 : 50, v/v) 混合物的 DPPH 储备溶液 B, 将 200 mL 储备溶液 A 与 800 mL 储备溶液 B 混合得到 DPPH 工作溶液。称取 10 mg 肉粉-纤维素 (1 : 1) 样品转移到 15 mL 的离心管中, 添加 10 mL 的 DPPH 工作溶液开始反应, 在黑暗中涡旋 30 s 使试管充分混合, 于室温避光条件下在轨道摇床上以 200 r/min 的速度摇晃混合物, 以促进肉样品颗粒和 DPPH 溶液之间的反应, 将自由基溶液引入肉样品 30 min 后, $699\times g$ 离心 2 min。取 200 μL 上清液转移到 96 孔板中, 并在 540 nm 处测量吸光度值。DPPH 自由基清除能力

表示为每千克干重肉的 Trolox 毫摩尔当量 (mmol Trolox Eq./kg 干肉)。

1.2.1.5 氧自由基吸收能力 (ORAC) 测定 采用 ORAC 荧光法检测试剂盒进行测定, 将 10 mg 肉粉-纤维素 (1:1) 样品加入到 15 mL 离心管中, 添加 10 mL 冰冷的工作液, 避光涡旋 30 s 使其充分混合待用; 按照试剂盒操作说明进行测定, 将 96 孔板 37℃ 预热, 加入 150 μ L 荧光素溶液到 96 孔板中, 随后加入 25 μ L Trolox 标品和待测样品, 37℃ 孵育 10 min; 随后加入 25 μ L 2, 2'-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐工作液, 在 520 nm 处测量吸光度值。ORAC 值表示为每千克干重肉的 Trolox 毫摩尔当量 (mmol Trolox Eq./kg 干肉)。

1.2.1.6 *N, N*-二甲基-对苯二胺 (*N, N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine, DMPD) 总抗氧化能力测定 参考 FOGLIANO 等^[18]方法进行测定, 将 0.05 mol·L⁻¹ 氯化铁、100 mmol·L⁻¹ DMPD 的水溶液和 100 mmol·L⁻¹ 醋酸缓冲液按 2:10:1000 (v/v/v) 的比例混合 (pH 5.25), 制备 DMPD 工作液。将 10 mg 肉粉-纤维素 (1:1) 样品加入到 15 mL 离心管中, 添加 10 mL DMPD 工作溶液开始反应, 避光涡旋 30 s 使试管充分混合, 于室温避光条件下在轨道摇床上以 200 r/min 的速度摇晃混合物, 以促进肉样颗粒和 FRAP 溶液之间的充分反应, 将自由基溶液引入肉样品 60 min 后, 699×g 离心 2 min, 取上清液 (200 μ L) 转移到 96 孔板中, 并在 505 nm 处测定吸光度值。FRAP 活性表示为每千克干重肉的 Trolox 毫摩尔当量 (mmol Trolox Eq./kg 干肉)。

1.2.2 游离氨基酸测定 参考 ZOU 等^[19]方法, 稍作修改。称取 3 g 左右绞碎的鲜肉样品, 加入 20 mL 5-磺基水杨酸 (3 g/100 mL) 均质 (6 000 r/min, 2×20 s), 4℃ 下 10 000×g 离心 15 min, 取上清液定容至 25 mL。称取 2 mL 正己烷于上清液中, 混匀振荡 (60 s), 10 000×g 离心 10 min 后取下层溶液, 最后通过 0.22 μ m 水相滤膜过滤后, 采用氨基酸自动分析仪对游离氨基酸含量进行测定, 结果以 mg/100 g 鲜肉表示。

1.2.3 蛋白质组学分析 根据抗氧化能力和游离氨基酸结果, 选择宰后 0.5、6 和 48 h 的滩羊肉进行蛋白质组学分析, 具体参考邹波等^[20]的方法, 对裂解液配方浓度和离心力大小作适当修改。

1.2.3.1 总蛋白提取 取-80℃ 保存的滩羊肉样品在液氮中研磨成粉, 按照 1:10 比例 (W/V) 加入裂解液 (7 mol·L⁻¹ 尿素、2 mol·L⁻¹ 硫脲、0.1% 3-(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基-1-丙磺酸、1% 蛋白酶抑制剂),

涡旋混匀, 采用组织研磨仪磨成匀浆, 冰上静置 30 min; 16 200×g 条件下, 4℃ 离心 15 min, 取上清液。采用 Bradford 法测定蛋白浓度, 采用 SDS-PAGE 法对蛋白样品质量进行评测。

1.2.3.2 总蛋白酶解 取蛋白质量为 25 μ g 的上清液, 加入到 10 kD 超滤管 (Milipore) 中, 按照 40:1 (V/V) 加入 1 mol·L⁻¹ 二硫苏糖醇溶液 (终浓度为 25 mmol·L⁻¹), 涡旋混匀, 37℃ 水浴 1 h; 随后, 按照 20:1 (V/V) 加入 1 mol·L⁻¹ 碘乙酰胺溶液 (终浓度为 50 mmol·L⁻¹), 涡旋混匀, 避光室温放置 30 min; 随后, 加入 300 μ L 20 mmol·L⁻¹ 的四乙基溴化铵, 13 800×g 离心 10 min, 收集底部溶液, 重复操作 3 次; 随后, 加入 2% 的胰蛋白酶 (Promega), 37℃ 消化 12 h; 最后, 加入四乙基溴化铵, 13 800×g 离心 10 min, 收集管底部溶液, 重复 3 次。

1.2.3.3 固相萃取 采用 ZipTip C18 固相萃取柱对酶切的多肽溶液进行萃取, 采用 10 μ L 100% 乙腈对萃取柱进行活化, 采用 10 μ L 2% 乙腈-0.1% 甲酸溶液平衡萃取柱。上样后采用 10 μ L 2% 乙腈-0.1% 甲酸溶液进行清洗脱盐 (重复 5 次), 采用 50% 乙腈-0.1% 甲酸溶液进行洗脱, 收集洗脱液真空抽干后-80℃ 保存备用。

1.2.3.4 LC-MS/MS 分析 将多肽组分重溶于 10 μ L 0.1% 甲酸溶液中, 经过 EASY-nLC 液相, 低 pH 反相 C18 毛细管色谱柱 (150 μ m×150 mm, 1.9 μ m) 分离, A 相为 0.1% 甲酸, B 相为 80% 乙腈和 0.1% 甲酸, 线性洗脱, 流动相 B 从 12% 到 100%, 总洗脱时间为 120 min, 流速为 0.6 μ L·min⁻¹。

采用 Orbitrap Q-Exactive HF 质谱仪分析鉴定多肽混合物, 喷雾电压 2 200 V, 离子源温度 320℃, 选择高灵敏度模式, 每个全扫描为高速信号依赖扫描, 扫描时间为 120 min。一级全扫描分辨率为 60 000, 扫描范围为 300—1 500 m/z, AGC 为 3e6, 最大注射时间为 80 ms; 每一个一级扫描后筛选前 20 个离子进入碰撞池打碎, 碰撞能量为 30%, 二级扫描分辨率为 15 000, 电荷状态筛选 (包含+2—+6 电荷的前体), 动态消除 20 s。

1.2.3.5 数据库检索、蛋白质定量、功能分析 所得质谱数据经 MaxQuant (version 1.5.3.8) 检索匹配和定量分析, 使用数据库为: uniprot_proteome_UP000002356_sheep_23111_20200310.fasta (序列总数: 23 111)。采用 Perseus (1.5.5.1) 软件进行相关性和 PCR 分析。基于样本技术重复间蛋白定量比值的分布, 确定筛选

差异蛋白 ratio 的阈值。选取 2 组样本间蛋白 ratio \leq 1-2SD 或 ratio \geq 1+2SD 作为筛选差异蛋白 ratio 的阈值,以 $P<0.05$ 、差异倍数 >1.5 或 <0.67 作为阈值,选取差异蛋白。采用 OmicsBox (版本: 1.2.4) 软件对差异蛋白进行功能注释分析和 GO 富集分析。

1.3 数据分析

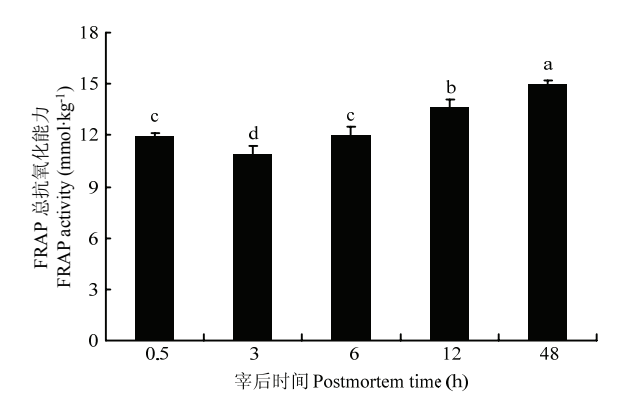
每个处理组 6 个生物学重复,每个样品测 2—3 次,取平均值。采用 SPSS19.0 统计软件进行方差分析,选用 Duncan's 法进行多重比较分析,采用 Person 进行相关性比较;结果表示为平均值 \pm 标准差,以 $P<0.05$ 为差异显著性判断标准,以 $P<0.01$ 为差异极显著性判断标准。

2 结果

2.1 宰后不同时间滩羊肉抗氧化活性

如图 1 所示,宰后 48 h 内,滩羊肉中 FRAP 总抗氧化能力呈先下降后上升的趋势。宰后 3 h 滩羊肉中 FRAP 总抗氧化能力最低,且显著低于宰后 0.5 h 和 6 h 的水平 ($P<0.05$)。宰后 3 h 以后,随着宰后时间的延长,滩羊肉中 FRAP 总抗氧化能力呈上升趋势,宰后 6、12 和 48 h 之间均存在显著性差异 ($P<0.05$)。

宰后 48 h 内,滩羊肉中 ABTS 自由基清除能力呈先升高后趋于稳定的变化趋势。宰后 0.5、3 和 6 h 之



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。下同
Different lowercase letters indicate significant difference between treatments ($P<0.05$). The same as below

图 1 宰后不同时间滩羊肉中 FRAP 总抗氧化能力

Fig. 1 FRAP activity of Tan lamb in different postmortem time

间,滩羊肉中 ABTS 自由基清除能力存在显著性差异 ($P<0.05$);宰后 6、12 和 48 h,滩羊肉 ABTS 自由基清除能力差异不显著 ($P>0.05$) (图 2-A)。

宰后 48 h 内,滩羊肉中 DPPH 和 DMPD 自由基清除能力整体均呈现上升的变化趋势。宰后 0.5 h 和 3 h 滩羊肉中 DPPH 和 DMPD 自由基清除能力差异不显著 ($P>0.05$)。宰后 6、12 和 48 h 滩羊肉中 DPPH 和

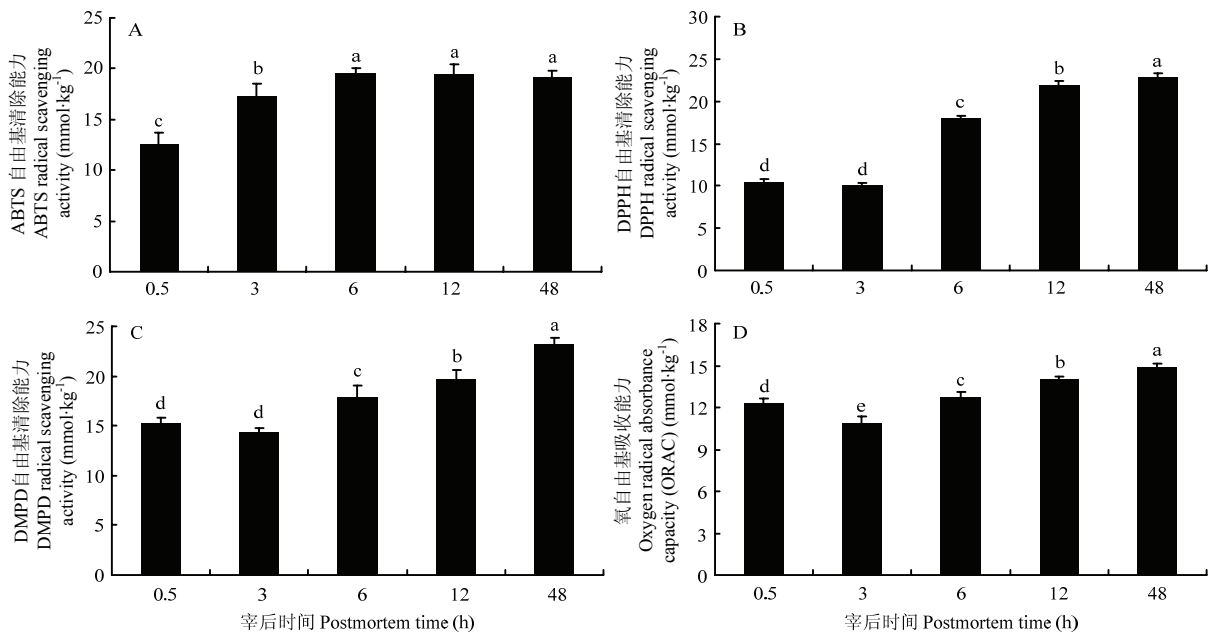


图 2 宰后不同时间滩羊肉中自由基清除能力

Fig. 2 Radical scavenging activity of Tan lamb in different postmortem time

DMPD 自由基清除能力显著高于宰后 0.5 h 水平 ($P<0.05$)。同时, 宰后 6、12 和 48 h 之间均存在显著性差异 ($P<0.05$) (图 2-B、C)。

滩羊肉中ORAC在宰后 48 h 内整体呈现上升的变化趋势。宰后 0.5 h 和 3 h 滩羊肉中 ORAC 差异显著($P<0.05$), 宰后 6、12 和 48 h 滩羊肉中 ORAC 显著增加 ($P<0.05$) (图 2-D)。

2.2 宰后不同时间滩羊肉中游离氨基酸含量

如表 1 所示, 滩羊肉中游离氨基酸的总含量为 1 085.16—1 100.43 mg/100 g, 不同时间点游离氨基酸总

含量差异不显著 ($P>0.05$)。滩羊肉中主要的游离氨基酸为肌肽 (499.15—555.97 mg/100 g)、鹅肌肽 (197.54—213.93 mg/100 g)、谷氨酸 (108.09—120.10 mg/100 g)、牛磺酸 (70.26—92.20 mg/100 g)、丙氨酸 (49.53—52.07 mg/100 g) 和甘氨酸 (20.13—21.40 mg/100 g) 等, 以上氨基酸的含量在不同时间点基本不存在显著性差异 ($P>0.05$)。胱氨酸、亮氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、精氨酸的含量在不同时间点存在显著性差异 ($P<0.05$), 并且总体呈增加的趋势, 宰后 48 h 滩羊肉中的含量显著高于宰后 0.5 h 的滩羊肉 ($P<0.05$)。

表 1 宰后不同时间滩羊肉中游离氨基酸含量
Table 1 Free amino acid contents of Tan lamb in different postmortem time

氨基酸含量 Amino acid (mg/100 g fresh meat)	宰后时间 Postmortem time (h)					P 值 P value
	0.5	3	6	12	48	
邻磷酸丝氨酸 <i>o</i> -Phospho-serine	4.16±0.29b	4.14±0.31b	4.19±0.64b	4.45±0.41ab	4.85±0.65a	0.08
牛磺酸 Taurine	79.10±41.24a	92.20±32.03a	80.19±28.93a	73.62±27.64a	70.26±36.18a	0.83
邻苯二乙醇胺 <i>o</i> -Phosphoethanolamine	3.25±0.68a	3.18±0.34a	2.95±0.39a	2.80±0.42a	3.09±0.71a	0.60
天冬氨酸 Aspartic acid	0.76±1.19a	0.50±1.23a	0.05±0.13a	0.00±0.00a	0.04±0.09a	0.33
苏氨酸 Threonine	4.33±1.53a	5.03±1.19a	4.74±1.69a	5.05±1.33a	5.22±1.24a	0.82
丝氨酸 Serine	6.63±0.47a	6.68±0.71a	6.76±0.63a	6.92±1.18a	6.78±0.72a	0.97
谷氨酸 Glutamic acid	120.10±15.06a	111.63±19.4a	108.09±22.41a	111.07±25.38a	108.38±24.75a	0.87
甘氨酸 Glycine	20.13±3.15a	21.22±2.50a	20.69±2.42a	21.40±1.18a	20.88±1.92a	0.90
丙氨酸 Alanine	49.53±6.12a	51.46±4.48a	51.76±4.34a	52.07±2.27a	51.04±2.23a	0.85
缬氨酸 Valine	1.39±0.85a	0.92±0.44a	0.97±1.31a	1.30±0.82a	1.37±0.28a	0.77
蛋氨酸 Methionine	0.04±0.02a	0.03±0.01a	0.04±0.02a	0.05±0.03a	0.05±0.05a	0.84
胱氨酸 Cystine	1.04±0.10b	1.17±0.10ab	1.14±0.14b	1.09±0.17b	1.31±0.16a	0.02
亮氨酸 Leucine	1.81±0.30c	2.13±0.17bc	2.20±0.13b	2.27±0.19b	2.66±0.46a	0.00
酪氨酸 Tyrosine	4.97±0.67c	5.78±0.75bc	6.17±0.66b	6.42±0.72b	7.55±1.05a	0.00
异亮氨酸 Isoleucine	1.99±0.29b	2.40±0.43ab	2.43±0.37ab	2.47±0.31ab	2.79±0.53a	0.03
苯丙氨酸 Phenylalanine	2.00±0.40c	2.33±0.31bc	2.41±0.27bc	2.49±0.32ab	2.89±0.43a	0.00
γ-氨基丁酸 γ-Amino-n-butyric acid	0.90±0.16a	0.85±0.17a	0.88±0.14a	0.86±0.10a	0.80±0.07a	0.78
氨 Ammonia	18.83±4.17a	20.57±2.66a	20.99±2.15a	21.08±1.71a	21.75±1.94a	0.42
鸟氨酸 Ornithine	1.70±0.53a	1.38±0.34bc	1.27±0.34bc	1.10±0.12b	1.49±0.42bc	0.10
赖氨酸 Lysine	2.56±0.91b	3.12±0.58ab	3.21±0.66ab	3.31±0.57ab	3.79±0.89a	0.10
组氨酸 Histidine	2.57±0.36a	2.80±0.73a	2.84±0.92a	3.14±0.69a	3.32±0.70a	0.40
鹅肌肽 Anserine	197.54±25.69a	200.95±24.56a	208.89±18.77a	213.93±18.28a	202.07±28.81a	0.76
肌肽 Carnosine	499.15±27.17a	530.58±65.12a	533.56±85.88a	555.97±34.04a	528.04±65.02a	0.60
精氨酸 Arginine	6.03±1.02c	7.03±0.81bc	7.53±1.41ab	7.13±1.05ab	8.51±0.63a	0.01
脯氨酸 Proline	5.63±0.89ab	4.88±1.62b	5.29±1.07ab	5.20±0.62ab	6.32±0.89a	0.15
合计 Total	1086.05±62.03a	1100.05±78.03a	1081.83±70.54a	1100.43±15.42a	1085.16±57.00a	0.97

数值为平均值±标准偏差 Values are represented as “Mean±SD”

与 FRAP 显著相关的游离氨基酸有 7 个, 均呈现显著正相关关系, 包括邻磷酸丝氨酸 ($r=0.489$, $P<0.01$)、亮氨酸 ($r=0.566$, $P<0.01$)、酪氨酸 ($r=0.596$, $P<0.01$)、异亮氨酸 ($r=0.374$, $P<0.05$)、苯丙氨酸 ($r=0.499$, $P<0.01$)、赖氨酸 ($r=0.375$, $P<0.05$) 和精氨酸 ($r=0.376$, $P<0.05$)。其中, 亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、精氨酸与 FRAP、ABTS、DPPH、ORAC、DMPD 均呈极显著正相关关系 ($P<0.01$) (表 2)。

表 2 滩羊肉中游离氨基酸含量与抗氧化活性的相关性
Table 2 Person's correlation between amino acids contents and antioxidant activity in Tan lamb

氨基酸名称 Amino acid name	相关系数 Correlation coefficients				
	FRAP	ABTS	DPPH	ORAC	DMPD
邻磷酸丝氨酸 <i>o</i> -Phospho-serine	0.480**	0.208	0.420*	0.417*	0.417*
牛磺酸 Taurine	-0.226	-0.091	-0.188	-0.227	-0.235
邻苯二乙醇胺 <i>o</i> -Phosphoethanolamine	-0.106	-0.236	-0.222	-0.132	-0.181
天冬氨酸 Aspartic acid	-0.252	-0.393*	-0.378*	-0.246	-0.268
苏氨酸 Threonine	0.128	0.213	0.135	0.192	0.241
丝氨酸 Serine	0.114	0.175	0.120	0.143	0.137
谷氨酸 Glutamic acid	-0.034	-0.129	-0.162	-0.117	-0.110
甘氨酸 Glycine	0.063	0.083	0.062	-0.040	0.086
丙氨酸 Alanine	0.077	0.182	0.113	0.076	0.098
缬氨酸 Valine	0.168	-0.109	0.111	0.208	0.082
蛋氨酸 Methionine	0.270	-0.022	0.168	0.247	0.080
胱氨酸 Cystine	0.313	0.227	0.296	0.226	0.312
亮氨酸 Leucine	0.566**	0.487**	0.597**	0.471**	0.629**
酪氨酸 Tyrosine	0.596**	0.493**	0.656**	0.532**	0.679**
异亮氨酸 Isoleucine	0.374*	0.391*	0.456*	0.324	0.425*
苯丙氨酸 Phenylalanine	0.499**	0.405*	0.545**	0.445*	0.569**
γ -氨基丁酸 γ -Amino-n-butyric acid	-0.234	-0.171	-0.144	-0.193	-0.153
氨 Ammonia	0.235	0.371*	0.289	0.230	0.258
鸟氨酸 Ornithine	-0.010	-0.402*	-0.274	-0.117	-0.091
赖氨酸 Lysine	0.375*	0.265	0.410*	0.271	0.391*
组氨酸 Histidine	0.333	0.252	0.337	0.300	0.372*
鹅肌肽 Anserine	0.075	0.269	0.157	0.073	0.095
肌肽 Carnosine	0.040	0.370*	0.187	0.110	0.170
精氨酸 Arginine	0.376*	0.486**	0.493**	0.384*	0.536**
脯氨酸 Proline	0.324	-0.078	0.212	0.285	0.370*
合计 Total	-0.089	-0.014	-0.016	-0.116	-0.078

*在 0.05 水平上显著相关, **在 0.01 水平上显著相关。下同
* Correlation is significant at the 0.05 level, ** Correlation is significant at the 0.01 level. The same as below

2.3 宰后不同时间滩羊肉蛋白质组

根据宰后不同时间滩羊肉抗氧化活性结果, 选择宰后 0.5、6 和 48 h 的滩羊肉进行蛋白组学分析, 总共鉴定出 1 030 个蛋白 (其中 787 个为共定量蛋白),

共有 971 个蛋白在数据库中有其对应的 GO 条目。通过对滩羊肉蛋白质组进行主成分分析 (图 3), 3 个处理组不能完全分开, 表明宰后 3 个时间点的滩羊肉蛋白质组差异有限。以 $P<0.05$ 、差异倍数 >1.5

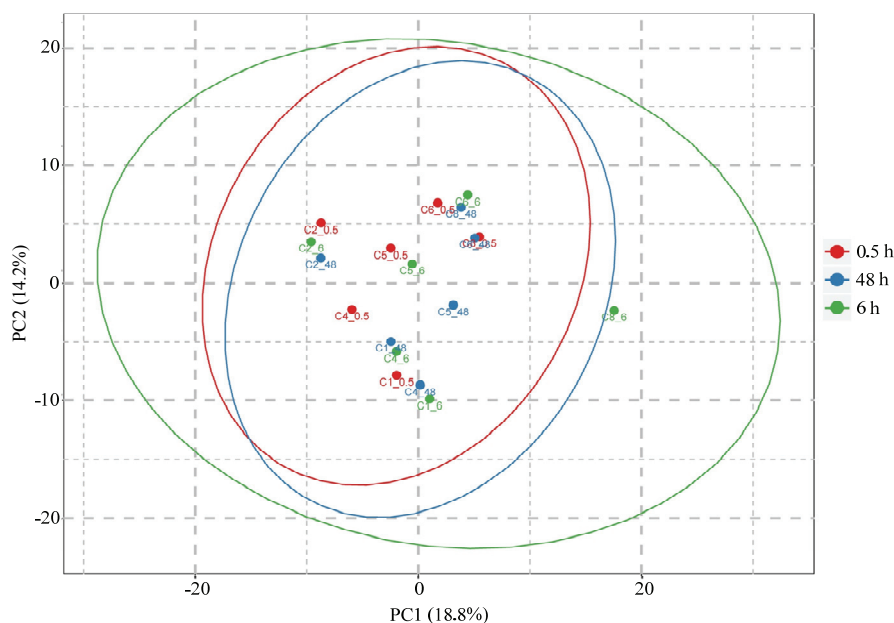


图3 宰后不同时间滩羊肉整体差异分析

Fig. 3 Overall difference analysis among the Tan lamb in different postmortem time

或 <0.67 作为阈值,筛选出宰后不同时间的滩羊肉中存在差异蛋白20个,如图4所示,随着宰后时间的延长,上调的蛋白有伴肌动蛋白(W5PFV9)、糖原蛋白1(W5P5C5)、H15结构域蛋白(W5NS65)、肽基脯氨酰异构酶(W5PHT7)、电压门控钙离子通道辅助亚基 $\alpha 2\delta$ -1(W5Q466)、脯氨酸/精氨酸丰富端亮氨酸丰富重复蛋白(W5NUA0)、泛素羧基末端水解酶(W5Q922)、蛋白激酶结构域蛋白(W5QG38)、苯丙氨酰-tRNA合成酶 β (W5QGI4)、H1组蛋白家族成员0(W5QGM7);下调的蛋白有钙蛋白酶抑制蛋白(C3V6M4)、辅酶Q8A(W5NTS5)、亲联蛋白1(W5P8Z2)、蛋白酶体26S亚基ATP合酶(W5P9K6)、亮氨酸拉链和CTNNBIP1结构域(W5PA76)、载脂蛋白B mRNA编辑酶催化亚基2(W5NRQ5)、真核细胞翻译起始因子4H(W5PQJ1)、胞膜窖相关蛋白4(W5PCH1)以及2个未知蛋白(W5PID4、W5PP64)。

对宰后不同时间滩羊肉中的差异蛋白进行GO组分富集分析(图5),这些蛋白主要参与生物学进程、细胞组分和分子功能。其中,参与生物学过程的蛋白主要涉及核小体的组织、组装等;在细胞组分中,富集的功能包括核小体、DNA包装复合体、蛋白质-DNA复合体等;在分子功能中,蛋白质主要参与电压门控

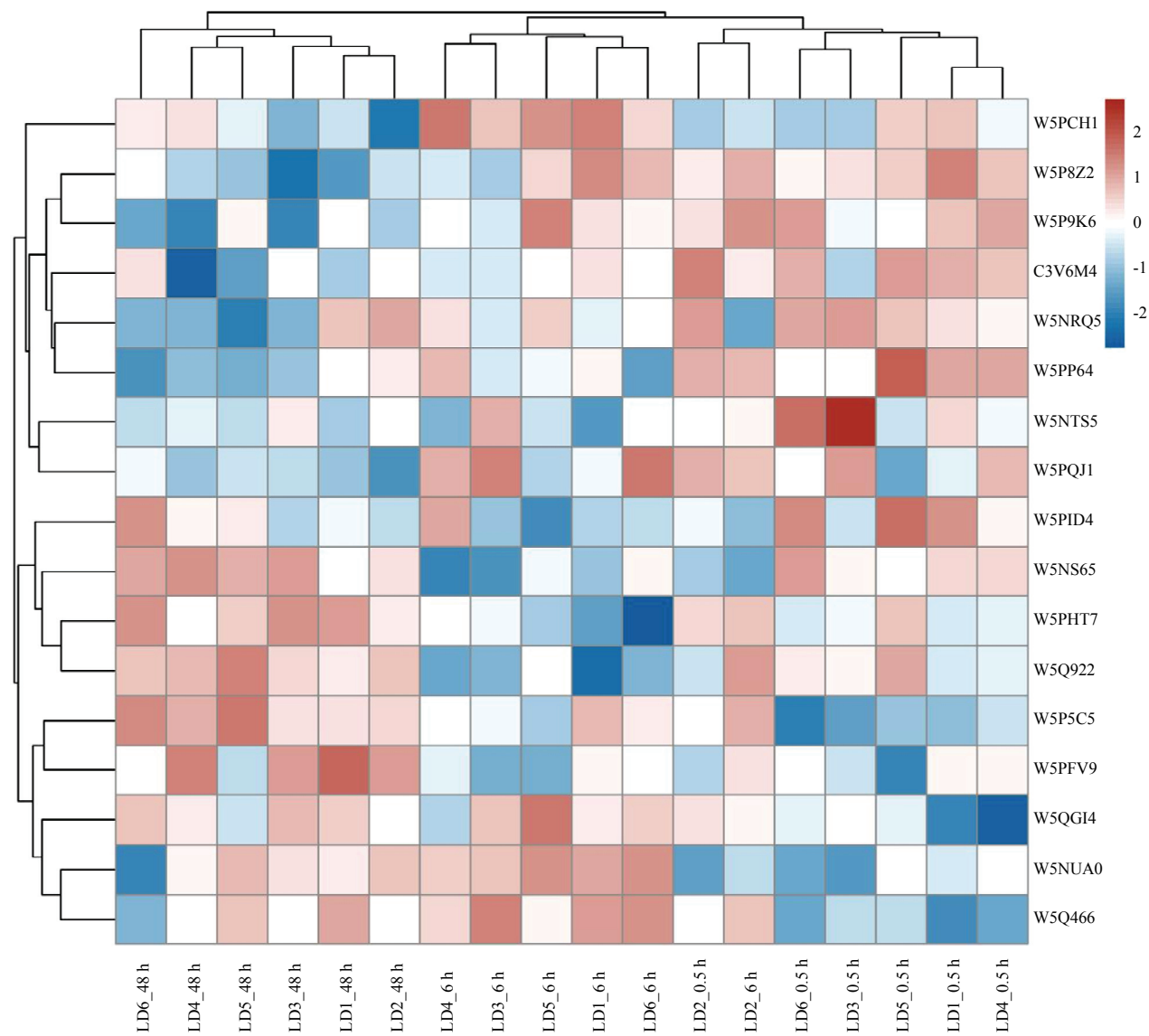
性钙通道活性、葡萄糖苷转移酶活性、胞苷脱氨酶活性等过程。

3 讨论

3.1 宰后不同时间的滩羊肉抗氧化活性变化

由于肉品是复杂体系,难以用单一的方法确定其抗氧化活性。本研究采用FRAP总抗氧化能力、ORAC、DPPH、DMPD、ABTS自由基清除能力等5种方法评价宰后不同时间滩羊肉的抗氧化活性,其中,DPPH、ABTS、FRAP三种抗氧化均属于单电子转移(ET)机制,是体外评价活性物质抗氧化能力的常见方法,操作简单^[21-23]。ORAC是指氧化自由基吸收能力,是国际上衡量抗氧化能力的通用指标^[24];DMPD是一种有机自由基前提物,在酸性条件下可被 Fe^{3+} 、 H_2O_2 等氧化形成有色自由基,被用来测定水溶性样品的抗氧化能力^[21]。

动物屠宰后,血液循环停止,肌细胞中的氧化-还原平衡被打破,由于缺乏能量的持续供给,肌细胞启动凋亡程序,发生细胞内氧化损伤。正常活体内,机体内的抗氧化防御体系主要由超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶保护体系和由维生素C、维生素E、胡萝卜素等物质组成的非酶保护体系共同构成^[25]。宰后肌肉中的抗氧化物质含量和活性会随着宰后时间的延长而逐渐消耗,直至无



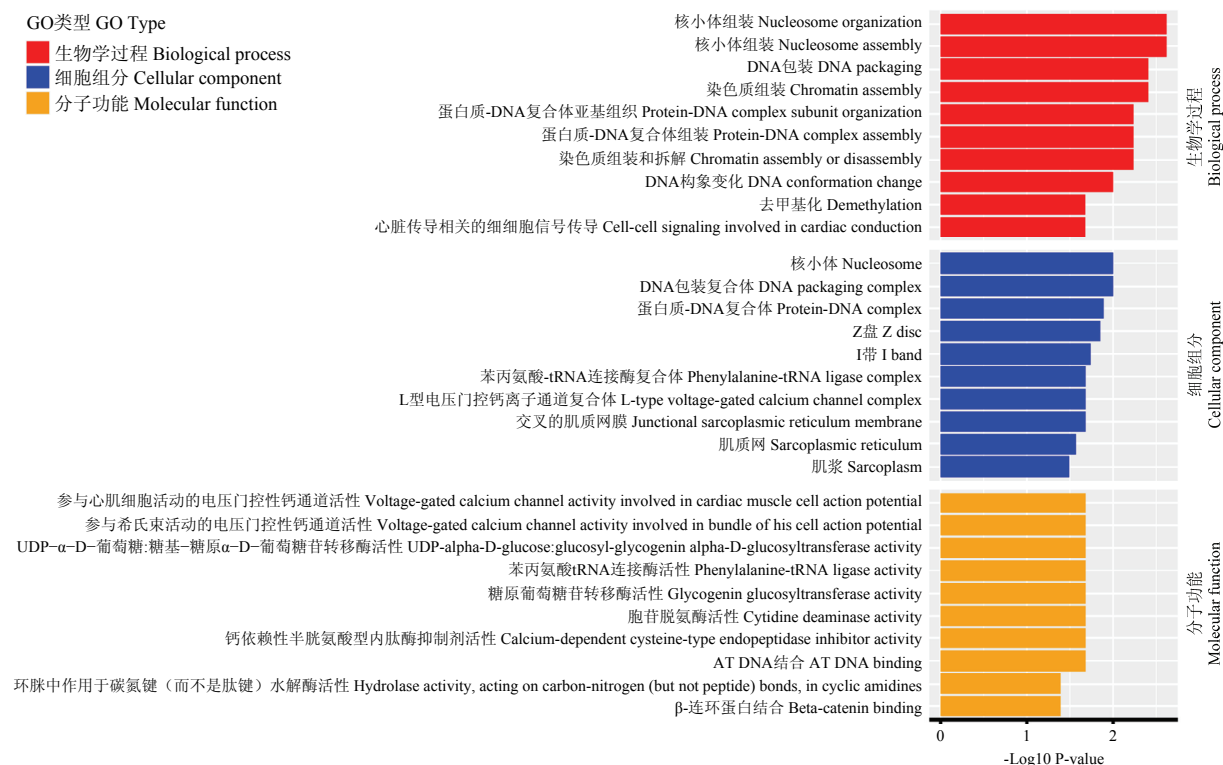
图中不同列代表不同的样品（LD 代表背最长肌，数字代表宰后时间），不同行代表不同的蛋白；颜色代表蛋白在样品中的表达量（深红色代表高强度，深蓝色代表低强度，白色代表中强度）
Different columns represent different samples (LD represents the *longissimus dorsi* and the number represents postmortem time), and different rows represent different proteins. The color represents the relative abundance of the proteins (Deeper red represents higher intensity, deeper blue represents lower intensity, and white represents middle intensity)

图 4 宰后不同时间滩羊肉中差异蛋白层次聚类热图

Fig. 4 Hierarchical clustering and heatmap of differentially abundant proteins in Tan lamb in different postmortem time

法有效降低活性氧自由基对肌肉的损耗，从而影响肉品品质变化，樊路杰等^[7]研究发现，宰后肌肉氧化反应的程度与肉色、保水性、货架期长短密切相关。之前研究多数集中在宰后贮藏过程中蛋白质、脂肪氧化对肉品质的影响，而对宰后早期（48 h 内）肌肉中抗氧化能力的研究较少。本研究中，随着宰后贮藏时间延长（0—48 h），滩羊肉中 FRAP、DMPD、ORAC、

DPPH 总抗氧化能力总体呈上升趋势。宰后 48 h 内，肌肉经历着僵直、解僵成熟过程，肌细胞内环境发生巨大变化，肌细胞启动凋亡程序，能量代谢酶、细胞凋亡酶、钙激活酶等发挥作用，肌细胞内进行着复杂的代谢活动，尽可能维持细胞的平衡状态。本研究证实宰后早期 48 h 内滩羊肉具有较强的自由基清除能力。



纵坐标为 GO 条目，横坐标表示差异蛋白在对应的功能条目中的富集情况， $-\text{LOG}_{10} P\text{-Value}$ 的值越大，差异蛋白和该功能越相关
The ordinate is the GO entry, and the abscissa indicates the enrichment of the differential protein in the corresponding function entry. The larger the value of $-\text{LOG}_{10} P\text{-Value}$, the more relevant the differential protein and the function

图 5 宰后不同时间滩羊肉中差异蛋白 GO 富集分析图

Fig. 5 GO enrichment analysis diagram of differentially abundant proteins in Tan lamb in different postmortem time

宰后不同时间滩羊肉 20 个差异蛋白中，与 FRAP 显著相关的差异蛋白有 12 个，其中与钙蛋白酶抑制蛋白、真核细胞翻译起始因子 4H、亮氨酸拉链和 CTNBP1 结构域、未知蛋白 2 等 4 个蛋白呈显著负相关关系 ($P<0.05$)，与亲联蛋白 1 和蛋白酶体 26S 亚基 ATP 合酶呈极显著负相关关系 ($P<0.01$)；与 H15 结构域蛋白、肽基脯氨酰异构酶呈显著正相关关系 ($P<0.05$)，与糖原蛋白 1、伴肌动蛋白、蛋白激酶结构域蛋白、H1 组蛋白家族成员 0 等 4 个蛋白呈极显著正相关关系 ($P<0.01$)。钙蛋白酶抑制蛋白和未知蛋白 2 与 FRAP、ABTS、DPPH、ORAC、DMPD 均呈现显著负相关关系 ($P<0.05$)，其中钙蛋白酶抑制蛋白与 DPPH 呈极显著负相关关系 ($P<0.01$)，未知蛋白 2 与 ABTS、DPPH、ORAC、DMPD 呈极显著负相关关系 ($P<0.01$)。而糖原蛋白 1 和蛋白激酶结构域蛋白与 FRAP、ABTS、DPPH、ORAC、DMPD 均呈显著正相关关系 ($P<0.05$)。

3.2 宰后不同时间滩羊肉中游离氨基酸变化

本研究中，肌肽、鹅肌肽、谷氨酸、牛磺酸、丙氨酸和甘氨酸是滩羊肉中主要的游离氨基酸，与 OH 等^[16]在 Hanwoo 牛肉上的研究结果一致。OH 等^[16]研究发现，肌肽是 Hanwoo 牛 10 个部位中最丰富的游离氨基酸，其次为鹅肌肽、谷氨酸、牛磺酸和丙氨酸。肌肽又称 β -丙氨酰-L-组氨酸，是天然存在于肌肉中的水溶性二肽，具有清除自由基、螯合转运金属离子、淬灭单线态氧等抗氧化性质^[26-27]；鹅肌肽又称 β -丙氨酰-1-甲基-L-组氨酸，具有水溶性和显著的抗氧化、抗衰老、降尿酸等功能^[28]。牛磺酸又称 2-氨基乙磺酸，是机体内含量最丰富的游离氨基酸，是人体健康必不可少的一种营养素，具有多种生理功能，是婴幼儿生长发育的必需氨基酸，可促进大脑生长发育，有助于预防心血管疾病、高血压、糖尿病等^[29]。本研究中，滩羊背最长肌中肌肽、牛磺酸的含量高于德克赛尔杂交羔羊背最长肌中肌肽 (458 mg/100 g) 和

表 3 滩羊肉中差异蛋白丰度与抗氧化活性的相关性

Table 3 Person's correlation between differentially abundant proteins and antioxidant activity in Tan lamb

登记号 Accession	蛋白名称 Protein name	相关系数 Correlation coefficient				
		FRAP	ABTS	DPPH	ORAC	DMPD
C3V6M4	钙蛋白酶抑制蛋白 Calpastatin	-0.556*	-0.587*	-0.638**	-0.573*	-0.589*
W5NRQ5	载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化亚基 2 Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 2	-0.432	-0.544*	-0.584*	-0.409	-0.599**
W5NS65	H15 结构域蛋白 H15 domain-containing protein	0.471*	-0.155	0.142	0.396	0.375
W5NTS5	辅酶 Q8A Coenzyme Q8A	-0.223	-0.372	-0.448	-0.289	-0.359
W5NUA0	脯氨酸/精氨酸丰富端亮氨酸丰富重复蛋白 Proline and arginine rich end leucine rich repeat protein	0.052	0.541*	0.422	0.126	0.169
W5P5C5	糖原蛋白 1 Glycogenin 1	0.642**	0.655**	0.800**	0.637**	0.818**
W5P8Z2	亲联蛋白 1 Junctophilin 1	-0.786**	-0.467	-0.632**	-0.817**	-0.630**
W5P9K6	蛋白酶体 26S 亚基 ATP 合酶 Proteasome 26S subunit, ATPase 3	-0.738**	-0.384	-0.558*	-0.722**	-0.651**
W5PA76	亮氨酸拉链和 CTNNBIP1 结构域 Leucine zipper and CTNNBIP1 domain containing	-0.465*	-0.296	-0.527	-0.487*	-0.572*
W5PCH1	胞膜窖相关蛋白 4 Caveolae associated protein 4	-0.442	0.168	-0.100	-0.333	-0.305
W5PFV9	伴肌动蛋白 Nebulin	0.627**	0.253	0.539*	0.587*	0.596**
W5PHT7	肽基脯氨酰异构酶 Peptidylprolyl isomerase	0.562*	-0.027	0.256	0.508*	0.416
W5PID4	未知蛋白 1 Uncharacterized protein 1	0.025	-0.502*	-0.319	-0.056	-0.151
W5PP64	未知蛋白 2 Uncharacterized protein 2	-0.557*	-0.674**	-0.674**	-0.627**	-0.673**
W5PQJ1	真核细胞翻译起始因子 4H Eukaryotic translation initiation factor 4H	-0.521*	-0.056	-0.376	-0.505*	-0.443
W5Q466	电压门控钙离子通道辅助亚基 $\alpha 2\delta$ -1 Calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha 2 delta 1	0.183	0.742**	0.555*	0.284	0.334
W5Q922	泛素羧基末端水解酶 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	0.447	-0.040	0.230	0.403	0.465
W5QG38	蛋白激酶结构域蛋白 Protein kinase domain-containing protein	0.611**	0.489*	0.584*	0.607**	0.539*
W5QGI4	苯丙氨酰-tRNA 合成酶 β Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	0.261	0.634**	0.499*	0.456	0.406
W5QGM7	H1 组蛋白家族成员 0 H1 histone family member 0	0.716**	0.058	0.454	0.574*	0.626**

牛磺酸（57.3 mg/100 g）的含量^[30]以及 Hanwoo 牛肋脊部肉中的含量^[16]。HOU 等^[31]和 TRIKI 等^[32]研究发现，谷氨酰胺、丙氨酸、甘氨酸是羊肉的主要游离氨基酸，而牛肉中主要的游离氨基酸是天冬氨酸、谷氨酰胺和甘氨酸^[33]。肌肉中游离氨基酸的含量受品种、部位、贮藏时间等因素的影响^[16,32,34-35]；另外，由于测定方法的差异，部分研究没有测定牛磺酸、肌肽、鹅肌肽等游离氨基酸含量。

本研究表明，宰后滩羊肉中胱氨酸、亮氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、精氨酸的含量随着时间的延长，含量呈现增加趋势，这之前研究结果一致^[34-35]；宰后 48 h 内，滩羊肉中游离氨基酸的总量没有发生显著变化，表明本研究中滩羊肉中蛋白质没有发生大量水解，与之前的研究结果一致^[36]。生鲜肉的抗氧化活性受到诸多因素的影响，如维生素、多酚、

脂肪酸、氨基酸、酶等^[8,13,34]。WU 等^[37]研究表明，马鲛鱼肉在贮藏过程中，游离氨基酸和肽的变化与抗氧化活性显著相关。另有研究表明，不稳定的氨基酸侧链，如半胱氨酸、蛋氨酸、色氨酸、酪氨酸、组氨酸和苯丙氨酸，在含有低能量自由基的体系中可作为抗氧化剂^[38]。本研究中，胱氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、精氨酸的含量呈现升高趋势，并且亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、精氨酸与 FRAP、ABTS、DPPH、ORAC、DMPD 均呈显著正相关关系，部分结果与 PÉREZ 等^[39]在蜂蜜上的研究结果一致。因此，推测宰后不同贮藏时间滩羊肉抗氧化能力的变化与氨基酸含量有关。本研究关于 DPPH 自由基清除能力的结果与 FU 等^[40]和 LIU 等^[41]在宰后成熟过程中牛肉和鸭肉上的研究结果一致，DPPH 自由基清除能力与宰后成熟过程中生物活性肽的释放和游离氨基酸含量的变化有关。

3.3 宰后不同时间滩羊肉蛋白质组变化

本研究筛选出宰后不同时间滩羊肉的差异蛋白 20 个, 差异蛋白的数量与师希雄等^[42]在牦牛肉上的研究结果相当, 其鉴定出牦牛肉成熟前后 18 个差异表达蛋白, 其中 14 个蛋白质在成熟过程中表达量下降, 包括代谢酶、结构蛋白以及应激蛋白。本研究中, 随着宰后时间的延长, 蛋白表达量上升的蛋白有伴肌动蛋白、肽基脯氨酰异构酶、电压门控钙离子通道辅助亚基 $\alpha 2\delta$ -1、脯氨酸/精氨酸丰富端亮氨酸丰富重复蛋白、泛素羧基末端水解酶、蛋白激酶结构域蛋白、苯丙氨酰-tRNA 合成酶 β 等。伴肌动蛋白存在于肌节的 I 带中, 连接细肌丝与 Z 区, 并将肌动蛋白单体连接在一起, 通常在宰后 1 d 后开始降解^[43]。泛素羧基末端水解酶, 是泛素-蛋白酶体系统中的重要成员, 具有去泛素化的作用^[44]; 苯丙氨酰-tRNA 合成酶 β 在蛋白质生物合成中具有重要作用, 其在氧化应激下可逆性失活^[10]; 肽基脯氨酰异构酶通过加速脯氨酸肽键的顺反异构化调节蛋白质功能^[45]; 电压门控钙离子通道辅助亚基 $\alpha 2\delta$ -1 对电压门控钙通道具有重要的调节作用, 参与维持细胞内钙稳态^[46]。本研究鉴定出的其他差异蛋白通过功能预测表明参与细胞生物学过程、分子功能等。

钙蛋白酶抑制蛋白是一种内源性、需 Ca^{2+} 的钙蛋白酶抑制蛋白, 通过抑制 μ -钙蛋白酶活性影响宰后肌肉嫩化进程^[47-48]。宰后肌肉中钙蛋白酶抑制蛋白的含量逐渐减少, 其被降解和失活的速度与肌肉中蛋白质的水解和肉嫩度有关, 通过与 μ -钙蛋白酶之间的相互作用共同参与调控宰后肌肉的嫩度^[49]。本研究中, 随着宰后时间的延长, 滩羊肉中钙蛋白酶抑制蛋白的表达量下降, 与前人研究一致。亲联蛋白 1 是一种位于骨骼肌三联管处的蛋白, 连接横管和肌浆网, 对维持三联管稳定发挥重要作用。缺失亲联蛋白 1 可导致肌浆网崩解^[50], 本研究中, 随着宰后时间的延长, 滩羊肉中亲联蛋白 1 的表达量下降, 表明宰后肌肉僵直、解僵过程中, 肌细胞结构受到破坏, 解离后的亲联蛋白 1 容易被肌浆中的蛋白质水解酶降解, 导致表达量下降。辅酶 Q 也叫泛醌 (Ubiquinone), 是一类脂溶性醌类化合物, 具有很强的抗氧化能力^[51]。胞膜窖 (Caveolae) 是细胞膜内陷形成的一种特殊的脂筏结构, 并在调节细胞信号转导中发挥重要作用^[52]。26S 蛋白酶体是细胞中负责蛋白质降解的主要分子机器, 参与生物体的大多数生命活动^[53], 而 ATP 合酶是生物体能量转换的核心酶^[54]。真核细胞翻译起

始因子、亮氨酸拉链和 CTNNBIP1 结构域、载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化亚基 2 等在肌肉代谢中发挥着重要作用^[55-56]。

本研究中, 钙蛋白酶抑制蛋白和未知蛋白 2 与 FRAP、ABTS、DPPH、ORAC、DMPD 均呈显著负相关关系, 而糖原蛋白 1 和蛋白激酶结构域蛋白与 FRAP、ABTS、DPPH、ORAC、DMPD 均呈显著正相关关系。王磊^[57]研究表明, 抗氧化蛋白、分子伴侣蛋白和一些酶类参与调节宰后机体细胞内的氧化应激和氧化还原调节等过程, 从而间接导致其肉色的差异。这表明, 钙蛋白酶抑制蛋白、未知蛋白 2、糖原蛋白 1 和蛋白激酶结构域蛋白可作为表征宰后肌肉抗氧化活性的潜在标志物。综上, 宰后初期肌肉中进行着复杂的代谢活动, 代谢酶、伴侣蛋白、应激蛋白等参与宰后早期肌肉氧化还原调节过程, 下一步将从分子代谢通路角度阐释宰后初期肌肉抗氧化活性变化的机制。

4 结论

宰后 48 h 内, 滩羊肉总抗氧化能力总体呈现上升趋势, 并且抗氧化能力的升高与宰后肌肉中亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、精氨酸等游离氨基酸的释放有关; 宰后初期, 肌肉中钙蛋白酶抑制蛋白、未知蛋白 2 等蛋白表达量的下降和糖原蛋白 1、蛋白激酶结构域蛋白等蛋白表达量的上升与宰后滩羊肉抗氧化能力的变化显著相关。

参考文献 References

- [1] GÖKMEN V, SERPEN A, FOGLIANO V. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: The 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20(6): 278-288.
- [2] SHAHIDI F. Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20(9): 376-387.
- [3] 张德权, 侯成立. 热鲜肉与冷却肉品质差异之管见. *肉类研究*, 2020, 34(5): 83-90.
ZHANG D Q, HOU C L. Humble opinion on the quality difference between hot meat and chilled meat. *Meat Research*, 2020, 34(5): 83-90. (in Chinese)
- [4] 肖雄, 侯成立, 李欣, 陈丽, 张德权, 任驰, 摆玉菁, 刘登勇. 宰后不同时间蒙寒杂交羔羊霖肉的营养品质分析. *食品科学技术学报*, 2020, 38(2): 99-106.
XIAO X, HOU C L, LI X, CHEN L, ZHANG D Q, REN C, BAI Y Q,

- LIU D Y. Nutritional quality analysis of knuckle muscle in Mongolian and small-tailed Han crossbred lamb at different postmortem times. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 38(2): 99-106. (in Chinese)
- [5] 肖雄, 侯成立, 李欣, 郑晓春, 张德权, 任驰, 摆玉蔷, 颜统晶, 刘登勇. 宰后贮藏过程中羔羊肉食用品质的变化. *肉类研究*, 2019, 33(9): 53-58.
- XIAO X, HOU C L, LI X, ZHENG X C, ZHANG D Q, REN C, BAI Y Q, YAN T J, LIU D Y. Changes in eating quality of lamb during postmortem storage. *Meat Research*, 2019, 33(9): 53-58. (in Chinese)
- [6] XIAO X, HOU C L, ZHANG D Q, LI X, REN C, IJAZ M, HUSSAIN Z, LIU D Y. Effect of pre- and post-rigor on texture, flavor, heterocyclic aromatic amines and sensory evaluation of roasted lamb. *Meat Science*, 2020, 169: 108220.
- [7] 樊路杰, 窦鸣乐, 王小宇, 李泽, 史新娥, 李晓. 宰后肌肉抗氧化能力与肉品质的关系. *动物营养学报*, 2018, 30(5): 1676-1680.
- FAN L J, DOU M L, WANG X Y, LI Z, SHI X E, LI X. Relationship between antioxidant capacity of postmortem muscle and meat quality. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(5): 1676-1680. (in Chinese)
- [8] PONNAMPALAM E N, BUTLER K L, MCDONAGH M B, JACOBS J L, HOPKINS D L. Relationship between muscle antioxidant status, forms of iron, polyunsaturated fatty acids and functionality (retail colour) of meat in lambs. *Meat Science*, 2012, 90(2): 297-303.
- [9] 孟彤, 刘源, 仇春洪, 王锡昌. 蛋白质氧化及对肉品质影响. *中国食品学报*, 2015, 15(1): 173-181.
- MENG T, LIU Y, QIU C Y, WANG X C. Research progress on protein oxidation mechanisms and its effects on meat quality. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(1): 173-181. (in Chinese)
- [10] CHAKRABORTY S, GANGULI S, CHOWDHURY A, IBBA M, BANERJEE R. Reversible inactivation of yeast mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase under oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 2018, 1862(8): 1801-1809.
- [11] DESCALZO A M, SANCHEZ A M. A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in *Argentina*. *Meat Science*, 2008, 79(3): 423-436.
- [12] QWELE K, HUGO A, OYEDEMI S O, MOYO B, MASIKA P J, MUCHENJE V. Chemical composition, fatty acid content and antioxidant potential of meat from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves, sunflower cake and grass hay. *Meat Science*, 2013, 93(3): 455-462.
- [13] SERPEN A, GÖKMEN V, FOGLIANO V. Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 2012, 90(1): 60-65.
- [14] 张敏, 张淑二, 朱应民, 冯鑫磊, 于家利, 曾勇庆, 刘展生. 不同品种猪肉抗氧化性能比较分析. *安徽农业科学*, 2018, 46(14): 188-190.
- ZHANG M, ZHANG S E, ZHU Y M, FENG X L, YU J L, ZENG Y Q, LIU Z S. Comparison and anylsis on the antioxidant properties of meat quality in different pig breeds. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(14): 188-190. (in Chinese)
- [15] 董瑗榕, 苗建军, 彭忠利, 曾钰, 付洋洋, 王鼎, 郭春华. 年龄对舍饲育肥牦牛肉营养价值和抗氧化活性的影响. *食品科学*, 2019, 40(19): 77-82.
- DONG A R, MIAO J J, PENG Z L, ZENG Y, FU Y Y, WANG D, GUO C H. Effect of age on nutritional value and antioxidant activity of house-feeding yak meat. *Food Science*, 2019, 40(19): 77-82. (in Chinese)
- [16] OH M, KIM E K, JEON B T, TANG Y J, KIM M S, SEONG H J, MOON S H. Chemical compositions, free amino acid contents and antioxidant activities of Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) beef by cut. *Meat Science*, 2016, 119: 16-21.
- [17] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1): 70-76.
- [18] FOGLIANO V, VERDE V, RANDAZZO G, RITIENI A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(3): 1035-1040.
- [19] ZOU Y H, KANG D C, LIU R, QI J, ZHOU G H, ZHANG W G. Effects of ultrasonic assisted cooking on the chemical profiles of taste and flavor of spiced beef. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2018, 46: 36-45.
- [20] 邹波, 何广捷, 赵迪, 闫静, 张泽, 徐幸莲, 周光宏, 李春保. 蛋白质组学揭示宰前温和驱赶改善猪肉品质的潜在机制. *食品科学*, 2020, 41(13): 29-37.
- ZOU B, HE G J, ZHAO D, YAN J, ZHANG Z, XU X L, ZHOU G H, LI C B. Proteomic analysis of the potential mechanism for improving pork quality by preslaughter mild driving. *Food Science*, 2020, 41(13): 29-37. (in Chinese)
- [21] SANCHEZ-MORENO C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 2002, 8(3): 121-137.
- [22] 周昇昇. 抗氧化能力体外评价方法的进展和比较. *卫生研究*, 2010, 39(2): 164-167.
- ZHOU S S. Progress and comparison of antioxidant capacity

- evaluation methods *in vitro*. Journal of Hygiene Research, 2010, 39(2): 164-167. (in Chinese)
- [23] HOU C, WU L G, WANG Z Y, SAGUER E, ZHANG D Q. Purification and identification of antioxidant alcalase-derived peptides from sheep plasma proteins. Antioxidants, 2019, 8(12): 592.
- [24] THAIPOONG K, BOONPRAKOB U, CROSBY K, CISNEROS-ZEVALLOS L, BYRNE D H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(6/7): 669-675.
- [25] CHAN K M, DECKER E A. Endogenous muscle antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1994, 34(4): 403-426.
- [26] JUNG S, BAE Y S, KIM H J, JAYASENA D D, LEE J H, PARK H B, HEO K N, JO C. Carnosine, anserine, creatine, and inosine 5'-monophosphate contents in breast and thigh meats from 5 lines of Korean native chicken. Poultry Science, 2013, 92(12): 3275-3282.
- [27] 张梦寒, 徐幸莲, 周光宏. 肌肽对肌肉中脂类氧化的抑制作用. 肉类研究, 2001, 15(4): 16-18.
- ZHANG M H, XU X L, ZHOU G H. Anti-oxidative function of carnosine on muscular lipid. Meat Research, 2001, 15(4): 16-18. (in Chinese)
- [28] KOHEN R, YAMAMOTO Y, CUNDY K C, AMES B N. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. PNAS, 1988, 85(9): 3175-3179.
- [29] LARSEN R, EILERTSEN K E, M HRE H, JENSEN I J, ELVEVOLL E O. Taurine Content in Marine Foods: Beneficial Health Effects. John Wiley & Sons, Ltd. 2013: 249-268.
- [30] PURCHAS R W, RUTHERFURD S M, PEARCE P D, VATHER R, WILKINSON B H P. Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q10, and creatine. Meat Science, 2004, 66(3): 629-637.
- [31] HOU C L, WANG Z Y, WU L G, CHAI J L, ZHANG W T, ZHANG D Q. Effects of breeds on the formation of heterocyclic aromatic amines in smoked lamb. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(12): 2661-2669.
- [32] TRIKI M, HERRERO A M, JIM NEZ-COLMENERO F, RUIZ-CAPILLAS C. Quality assessment of fresh meat from several species based on free amino acid and biogenic amine contents during chilled storage. Foods, 2018, 7(9): 132.
- [33] SZTERK A. Heterocyclic aromatic amines in grilled beef: The influence of free amino acids, nitrogenous bases, nucleosides, protein and glucose on HAAs content. Journal of Food Composition and Analysis, 2015, 40: 39-46.
- [34] FEIDT C, PETIT A, BRUAS-REIGNIER F, BRUN-BELLUT J. Release of free amino-acids during ageing in bovine meat. Meat Science, 1996, 44(1/2): 19-25.
- [35] MOYA V J, FLORES M, ARISTOY M C, TOLDRÁ F. Pork meat quality affects peptide and amino acid profiles during the ageing process. Meat Science, 2001, 58(2): 197-206.
- [36] LAWRIE R A, LEDWARD D. Lawrie's Meat Science. 7th ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006: 95-101.
- [37] WU H C, CHEN H M, SHIAU C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International, 2003, 36(9): 949-957.
- [38] ELIAS R J, KELLERBY S S, DECKER E A. Antioxidant activity of proteins and peptides. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008, 48(5): 430-441.
- [39] PÉREZ R A, IGLESIAS M T, PUEYO E, GONZÁLEZ M, DE LORENZO C. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(2): 360-365.
- [40] FU Y, YOUNG J F, THERKILDSEN M. Bioactive peptides in beef: Endogenous generation through postmortem aging. Meat Science, 2017, 123: 134-142.
- [41] LIU D M, CHEN X, HUANG J C, HUANG M, ZHOU G H. Generation of bioactive peptides from duck meat during post-mortem aging. Food Chemistry, 2017, 237: 408-415.
- [42] 师希雄, 罗天林, 余群力. 牦牛肉成熟前后差异蛋白质组学分析. 农业机械学报, 2015, 46(9): 251-256.
- SHI X X, LUO T L, YU Q L. Analysis of differential proteomics between fresh and aging yak meat. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(9): 251-256. (in Chinese)
- [43] 王颖, 李欣, 李铮, 朱杰, 张社奇, 张德权. 极限 pH 对羊肉宰后成熟过程中肌原纤维蛋白特型的影响. 食品工业科技, 2019, 40(2): 13-18.
- WANG Y, LI X, LI Z, ZHU J, ZHANG S Q, ZHANG D Q. Effects of ultimate pH on the properties of myofibrillar proteins from ovine muscle during postmortem aging. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(2): 13-18. (in Chinese)
- [44] HSU S H, LAI M C, ER T K, YANG S N, HUNG C H, TSAI H H, LIN Y C, CHANG J G, LO Y C, JONG Y J. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) regulates the level of SMN expression through ubiquitination in primary spinal muscular atrophy fibroblasts. Clinica Chimica Acta, 2010, 411(23): 1920-1928.

- [45] REIN T. Peptidylprolyl isomerases, protein folders, or scaffolders? The example of FKBP51 and FKBP52. *BioEssays*, 2020, 42(7): 1900250.
- [46] 瞿芳, 陈可之, 陈金军. 电压门控钙通道辅助亚基 $\alpha 2\delta$ -1 的结构和分子药理. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(8): 872-878.
- QU F, CHEN K Z, CHEN J J. The structure and molecular pharmacology of voltage-gated calcium channel auxiliary subunits $\alpha 2\delta$ -1. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 36(8): 872-878. (in Chinese)
- [47] LEAL-GUTIÉRREZ J D, ELZO M A, JOHNSON D D, SCHEFFLER T L, SCHEFFLER J M, MATEESCU R G. Association of μ -calpain and calpastatin polymorphisms with meat tenderness in a Brahman-Angus population. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 56.
- [48] LI Z, LI X, GAO X, SHEN Q W, DU M T, ZHANG D Q. Phosphorylation prevents *in vitro* myofibrillar proteins degradation by μ -calpain. *Food Chemistry*, 2017, 218: 455-462.
- [49] 杜曼婷, 李欣, 李铮, 高星, 张彩霞, 张德权. 不同嫩度羊肉中钙蛋白酶的差异. *中国农业科学*, 2016, 49(17): 3424-3431.
- DU M T, LI X, LI Z, GAO X, ZHANG C X, ZHANG D Q. Analysis and comparison of calpain in mutton with different levels of tenderness. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(17): 3424-3431. (in Chinese)
- [50] MURPHY R M, DUTKA T L, HORVATH D, BELL J R, DELBRIDGE L M, LAMB G D. Ca^{2+} -dependent proteolysis of junctophilin-1 and junctophilin-2 in skeletal and cardiac muscle. *The Journal of Physiology*, 2013, 591(3): 719-729.
- [51] SHUKLA S, DUBEY K K. CoQ10 a super-vitamin: Review on application and biosynthesis. 3 *Biotech*, 2018, 8(5): 249.
- [52] PARTON R G. Caveolae: Structure, function, and relationship to disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2018, 34: 111-136.
- [53] 王丰, 施一公. 26S 蛋白酶体的结构生物学研究进展. *中国科学(生命科学)*, 2014, 44(10): 965-974.
- WANG F, SHI Y G. Progress in structural biology of 26S proteasome. *Science in China (Series C)*, 2014, 44(10): 965-974. (in Chinese)
- [54] YOSHIDA M, MUNHEYUKI E, HISABORI T. ATP synthase: A marvellous rotary engine of the cell. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2(9): 669-677.
- [55] CAO W, WU W. Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like gene expression, RNA editing, and microRNAs regulation//*MicroRNA and Cancer: Methods and Protocols*. Springer New York: New York, NY, 2018: 75-81.
- [56] RICHTER-COOK N J, DEVER T E, HENSOLD J O, MERRICK W C. Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor. Eukaryotic initiation factor 4H. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(13): 7579-7587.
- [57] 王磊. 基于肌浆蛋白质组学研究宰后初期不同极限 pH 值牛肉颜色的差异机制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- WANG L. Beef color difference mechanism of different ultimate pH values during early postmortem based on sarcoplasmic proteomics [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2017. (in Chinese)

(责任编辑 赵伶俐)