

液相色谱-质谱非靶向代谢组学分析3种不同生产原料波杂发酵饮品的代谢差异

汪琪^{1,2}, 高雁^{1,*}, 薛娟娟², 曾军¹, 霍向东¹, 赵仲凯²

(1.新疆农业科学院微生物应用研究所, 新疆特殊环境微生物实验室, 新疆 乌鲁木齐 830091;

2.新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要: 利用超高效液相色谱-串联飞行时间质谱对3种不同生产原料的波杂发酵饮品进行非靶向代谢组学研究。采用主成分分析、偏最小二乘判别分析等多元统计分析方法, 筛选出差异代谢物, 并对差异代谢物及其通路富集情况进行研究。结果表明, 3种不同生产原料的波杂样品组间代谢物均存在明显差异。非遗波杂(G1)、传统塔尔米波杂(G2)和传统玉米波杂(G3)组间筛选的显著差异代谢物分别是109(G1 vs G2)、124种(G1 vs G3)和114种(G3 vs G2)。这些差异代谢物主要体现在脂质和类脂分子、有机酸及其衍生物、有机杂环类化合物、苯丙烷类和聚酮类化合物等, 差异可能是由原料的不同所引起。京都基因与基因组百科全书代谢通路富集分析显示, 这些差异代谢物主要参与了多种植物次生代谢产物的生物合成、苯丙烷类化合物的生物合成、黄酮类物质的生物合成及其降解等代谢通路。本研究探索了3种不同生产原料的波杂发酵饮品的差异代谢物及代谢通路, 以期更好地为波杂发酵饮品综合开发利用提供科学理论依据。

关键词: 波杂; 液相色谱-质谱法; 非靶向代谢组学; 代谢物; 代谢通路

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Untargeted Metabolomics Analysis of Differential Metabolites in Three Types of Boza Made from Different Raw Materials

WANG Qi^{1,2}, GAO Yan^{1,*}, XUE Juanjuan², ZENG Jun¹, HUO Xiangdong¹, ZHAO Zhongkai²

(1. Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Ürümqi 830091, China; 2. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China)

Abstract: Untargeted metabolomics based on ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was adopted to study three types of Boza, made from different raw materials. Multivariate statistical techniques such as principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were used to screening for differential metabolites, and pathway enrichment analysis of differential metabolites was carried out. The results showed that there were significant differences in metabolites among the three types of Boza. Altogether, 109, 124 and 114 differential metabolites were identified in intangible cultural heritage (G1) vs traditional Talmi Boza (G2), G1 vs traditional corn Boza (G3), and G3 vs G2, respectively. These differential metabolites mainly included lipids and lipid-like molecules, organic acids and their derivatives, organic heterocyclic compounds, phenylpropanoids, and polyketones. The difference might be caused by the difference in raw materials. According to Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) metabolic pathway enrichment analysis, these differential metabolites mainly participated in the biosynthesis of various secondary metabolites in plants, the biosynthesis of phenylpropanoids, the biosynthesis and degradation of flavonoids, and other metabolic pathways. This study provides a theoretical basis for the comprehensive development and utilization of Boza.

Keywords: Boza; liquid chromatography-mass spectrometry; untargeted metabolomics; metabolite; metabolic pathways

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240429-271

中图分类号: Q93

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)23-0081-12

收稿日期: 2024-04-29

基金项目: 新疆维吾尔自治区奶产业技术体系项目(NCYJSTX2024); 农业科技创新稳定支持项目(xjnkjwdzc-2023005-6)

第一作者简介: 汪琪(1999—)(ORCID: 0009-0007-3655-9825), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品工程。

E-mail: 448531665@qq.com

*通信作者简介: 高雁(1979—)(ORCID: 0000-0001-6987-6519), 女, 研究员, 博士, 研究方向为微生物资源挖掘与应用。

E-mail: 47795411@qq.com

引文格式:

汪琪, 高雁, 薛娟娟, 等. 液相色谱-质谱非靶向代谢组学分析3种不同生产原料波杂发酵饮品的代谢差异[J]. 食品科学, 2024, 45(23): 81-92. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240429-271. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Qi, GAO Yan, XUE Juanjuan, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry-based untargeted metabolomics analysis of differential metabolites in three types of Boza made from different raw materials[J]. Food Science, 2024, 45(23): 81-92. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240429-271. <http://www.spkx.net.cn>

波杂(Boza)是一种新疆柯尔克孜族广泛消费的非乳制品发酵特色饮品,它由大麦、小米、玉米等谷物粉末加水混匀,加入酵母进行第一次发酵、煮制、冷却后接种酶制剂进行第二次发酵,浆渣分离,就得到了具有CO₂刹口感、低糖度、质地浓稠的低酒精度发酵饮料^[1-2]。新疆伊犁特克斯县柯尔克孜族波杂酿造技艺被列为新疆维吾尔自治区非物质文化遗产名录的传统技艺类目(新政发〔2009〕71号文件)。波杂作为一种健康的传统发酵谷物饮品,受到国内外乳糖不耐症患者和素食主义者的青睐。它不仅提供发酵谷物所特有的感官特性,还富含多种具有健康益处的生物活性物质,具有抗炎、抗氧化、增强免疫系统和激素调节等功能^[2]。目前,对于波杂的研究进展主要有:1)微生物群落组成方面:通过对新疆不同地区及国外地区的波杂饮料的微生物群落结构进行分析,发现波杂饮料中的细菌组成主要包括植物乳杆菌、短乳杆菌、蜡状芽孢杆菌和巴氏醋酸杆菌,酵母菌则以啤酒酵母为主;采用高通量测序和宏基因组学分析土耳其不同地区的23种波杂饮料中细菌微生物群落特征,直接提取DNA的波杂饮料中主要由乳酸球菌属、乳酸杆菌属、明串球菌属和链球菌属组成;而经过预富集的波杂饮料中,乳酸球菌属、肠球菌属、埃希菌属、志贺菌属、芽孢杆菌属和乳酸杆菌属的丰度较高^[1-8]。2)工艺研究及研发方面:通常选择不同比例的大麦、糜子(黑皮)、玉米、小麦等为发酵原料,通过控制发酵温度、发酵时间、添加酶制剂、单一菌种或者复合菌种等条件,研发具有一定挥发性成分、口感细腻、酸甜适中、稳定性好的饮料^[9-13]。但目前对波杂发酵代谢物及代谢物分析方面鲜有报道。

代谢组学是对生物系统中代谢物(一般小于1 000 Da)进行定量分析的研究,筛选差异代谢物进行代谢通路的富集分析,其常用于研究发酵前后的代谢差异物^[14]。液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)是进行非靶向代谢组学分析的最常用工具之一,基于LC-MS的非靶向代谢组学分析是一种高效的技术手段,它能够深入探究生物样品的化学成分。此技术不仅能够全面识别和精确量化样品中的各种代谢物,而且为揭示生物体代谢状态的全面图景提供了重要支撑^[15-16]。本研究运用LC-MS的非靶向代谢组学技术结合主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(partial least

squares-discriminant analysis, PLS-DA)、正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)等多元统计学分析方法,筛选出显著差异代谢物;同时用京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库以及人类代谢数据库(Human Metabolome Database, HMDB)进行代谢物注释及分析,探究不同生产原料的波杂饮品其发酵的代谢特征,以期为该饮品的开发和利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

非遗波杂(黍子)(G1) 新疆伊宁汉人街大巴扎Boza门店;传统塔尔米波杂(G2)、传统玉米波杂(G3) 新疆伊宁佳恩食品店。

甲醇、乙腈、甲酸、纯水、丙醇(均为色谱纯)美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 仪器与设备

Triple TOF5600三重四极杆质谱仪、ExionLC AD液相色谱系统 美国SCIEX公司;HSS T3色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、BEH C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 美国Waters公司;JXDC-20型氮气吹扫仪 上海净信实业发展有限公司;LNG-T88型台式快速离心浓缩干燥器 太仓市华美生化仪器厂;Wonbio-96c型高通量组织破碎仪 上海万柏生物科技有限公司;SBL-10TD型超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司;Centrifuge 5430R型高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司;New Classic MF MS105DU型电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

吸取100 μL液体样本于1.5 mL离心管中,加入400 μL提取液(乙腈:甲醇=1:1, V/V),涡旋混匀30 s后,低温超声提取30 min(5 ℃、40 kHz),将样品静置于-20 ℃ 30 min。随后4 ℃、13 000×g离心15 min,移取上清液,氮气吹干。然后用100 μL复溶液(乙腈:水=1:1, V/V)复溶,低温超声萃取5 min(5 ℃、40 kHz),并4 ℃、13 000×g离心10 min,移取上清液至带内插管的进样小瓶中上机分析。每组样品检测6次。

1.3.2 质控 (quality control, QC) 样本制备

取等体积的所有样品的提取液混合制备成QC样本, 在仪器分析过程中, 每6个样品中插入一个QC样本, 以考察整个分析过程的重复性。

1.3.3 LC条件

色谱柱: BEH C_{18} 柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相A为水 (含0.1%甲酸), 流动相B为乙腈-异丙醇 (1:1, V/V) (含0.1%甲酸)。流速为0.40 mL/min, 进样量为20 μ L, 柱温为40 $^{\circ}$ C。梯度洗脱程序: 0~3 min, 100%~80% A、0%~20% B; 3~9 min, 80%~40% A、20%~60% B; 9~11 min, 40%~0% A、60%~100% B, 后以0% A、100% B维持2.5 min; 13.5~13.6 min, 0%~100% A、100%~0% B, 后以100% A、0% B维持2.4 min。

1.3.4 MS条件

样品质谱信号采集分别采用正负离子扫描模式, 电喷雾毛细管电压、进样电压和碰撞电能分别为1.0 kV、40 V和6 eV。离子源温度和去溶剂温度分别为120 $^{\circ}$ C和500 $^{\circ}$ C, 载气流量为900 L/h, 质谱扫描范围为 m/z 50~1 000, 全MS分辨率为60 000。

1.4 数据分析

原始数据包含QC样品和检测样品, 为了更好地分析数据, 对原始数据进行一系列的预处理, 主要包括过滤低质量峰、缺失值填充、归一化、QC样本相对标准偏差评估等。对预处理后的矩阵文件进行差异分析。R软件包ropls (Version 1.6.2) 进行PCA、PLS-DA和OPLS-DA。此外, 进行Student's T 检验和差异倍数 (fold change, FC) 分析。差异代谢物的选择基于OPLS-DA模型得到的变量投影重要性 (variable importance in projection, VIP) 和Student's T 检验 P 值来确定。

对筛选出的差异代谢物通过KEGG数据库 (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) 和HMDB (<https://hmdb.ca>) 进行注释。KEGG数据库进行代谢通路注释, 获得差异代谢物参与的通路。Python软件包 (scipy) 进行通路富集分析, 并通过Fisher精确检验获得与实验处理最相关的生物学途径。

2 结果与分析

2.1 代谢物的PCA和PLS-DA

采用PCA对不同原料波杂样品数据进行降维。其中, 每组6个样品, 3个QC样本。如图1所示, PC1方差贡献率为50.80%, PC2方差贡献率为33.90%, 两者的累计方差贡献率为84.70%, 说明这2个PC基本包含了波杂样品的绝大部分信息。所有QC样本聚集紧密, 接近坐标

原点, 这说明数据采集过程中设备及实验条件稳定, 所得数据准确可靠。而G1、G2和G3 3组样品组内距离相对较近, 说明每组样品的平行样之间重复性较好; 3组样品组间距离较远, 说明3组样品之间差异显著。

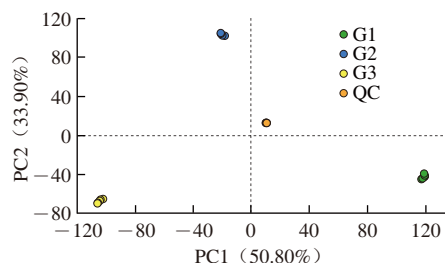


图1 不同生产原料的波杂样品的PCA

Fig. 1 PCA plot of Boza made from different raw materials

进一步研究3组波杂样品之间的差异, 建立PLS-DA模型, 有监督的PLS-DA进一步分析各组的相似性和差异性。如图2所示, 不同原料的3组波杂样品在PLS-DA图中明显分离, 其分布趋势与PCA结果相似。PLS-DA分析中, R^2 和 Q^2 分别用来评价PLS-DA模型的解释能力和预测能力。一般选择随机置换检验200次, 进一步评估其有效性。

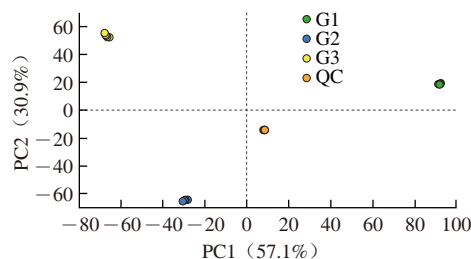


图2 不同生产原料的波杂样品的PLS-DA

Fig. 2 PLS-DA plot of Boza made from different raw materials

从图3可以看出, R^2 和 Q^2 截距分别为0.194和-0.489, 说明不存在过拟合, 表明模型具有良好的预测能力, 增强了对PLS-DA模型可靠性的置信水平, 能够对3种样品的差异进行验证。并且从相关性热图 (图4) 中根据颜色差异可明显看出, 样品组间存在明显差异, 这与PCA结果一致。

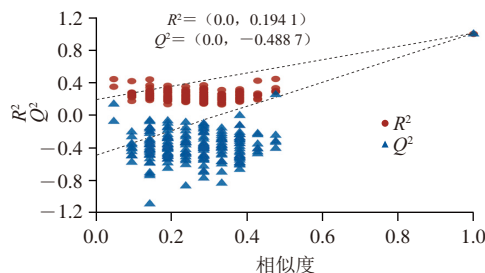


图3 不同生产原料波杂样品的PLS-DA置换检验

Fig. 3 Permutation test of PLS-DA models for discriminating Boza made from different raw materials

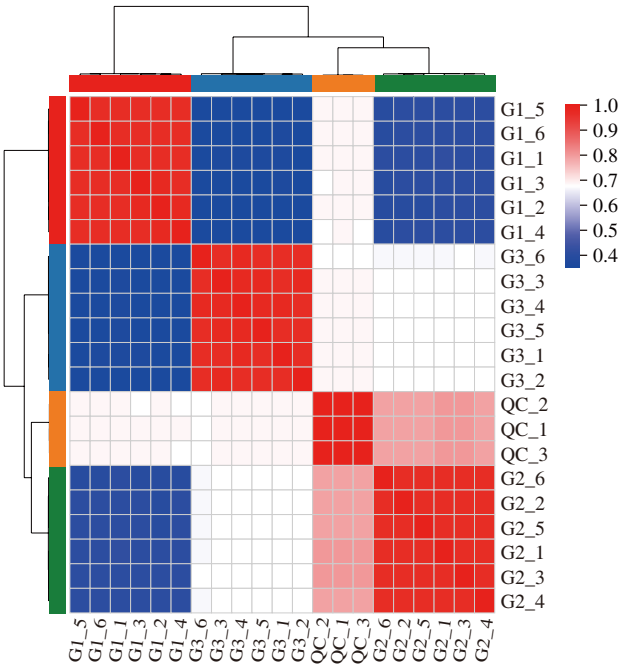


图4 不同生产原料波杂样品的相关性热图

Fig. 4 Correlation heatmap between differential metabolites in Boza made from different raw materials

2.2 不同生产原料波杂的Venn图

为了更加清楚地了解不同原料波杂代谢物变化的规律及其组成，将样品首先通过LC实现组分的分离，随后各单一组分进入到高真空质谱仪离子源进行离子化处理。通过质荷比获得质谱图，最后通过样品的质谱数据分析，得到样品的定性定量结果。通过Venn图统计不同组别中所共有和特有的代谢物数目。不同生产原料的波杂样品发酵代谢物的Venn图表明（图5），每种波杂样品都有特定的代谢物。共检测到3 321种差异代谢物（VIP>1、P<0.05）。其中，G1含2 964种代谢物，G2含3 063种代谢物，G3含2 796种代谢物。三者共有的代谢物有2 436种，G1和G2、G2和G3、G1和G3共有代谢物数量分别是2 739、2 720种和2 479种。在特有代谢物中，G1有182种，G2和G3分别是40种和33种。

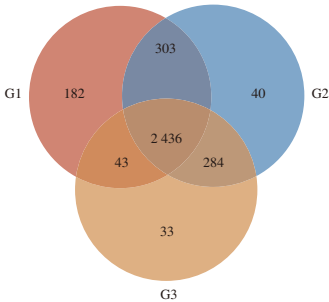


图5 不同生产原料的波杂样品代谢物的Venn图

Fig. 5 Venn diagram showing unique and shared differential metabolites in Boza made from different raw materials

2.3 总代谢物注释信息

KEGG数据库是一个强大的工具，用于进行生物体内的代谢分析和代谢网络映射，它帮助研究者深入了解代谢物如何参与特定的生物学通路，并提供了代谢物的生物学功能分类信息。KEGG Compound数据库汇集了小分子、生物聚合物以及其他与生物系统相关的化学物质。这些化合物的分类按照它们在生物学功能中的层级和角色进行，从而便于研究和理解代谢物在生物系统中的活动。代谢物所对应的通路信息如图6所示。3种不同原料的波杂饮品共检测出186种化合物，其中，脂类64种、碳水化合物23种、有机酸19种。主要的化合物有磷脂质类41种、羧酸类19种、二十烷类15种、单糖类15种和氨基酸类13种。

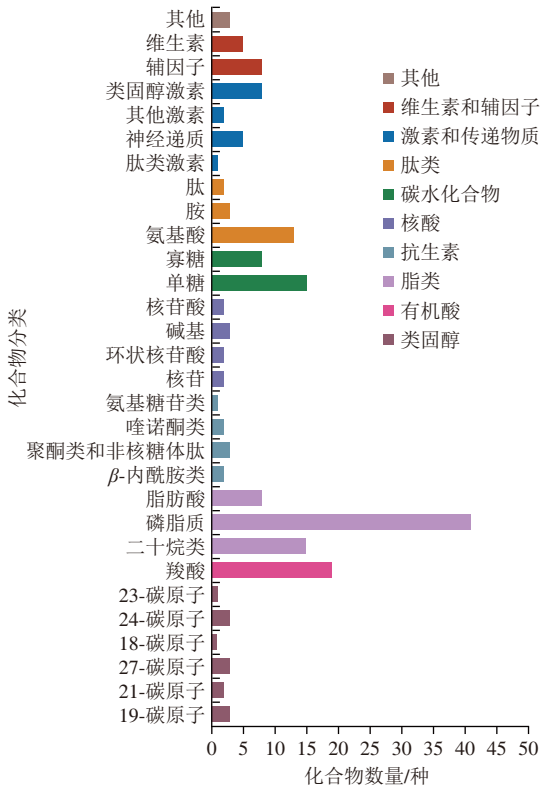


图6 不同生产原料的波杂样品代谢物的KEGG化合物分类

Fig. 6 KEGG compound classification of metabolites from Boza made from different raw materials

KEGG通路图数据库是一个精心构建的代谢通路集合，它详细描绘了分子间的相互作用、生理生化反应以及基因产物之间的关系。通过将代谢物与KEGG化合物ID进行比对，可以揭示代谢物参与的特定代谢通路，进而评估它们对生物体新陈代谢过程的影响。如图7所示，

本研究涉及的51条代谢通路，主要包括其他次级代谢物的生物合成、脂质代谢、氨基酸代谢、化学结构转换和碳水化合物代谢。

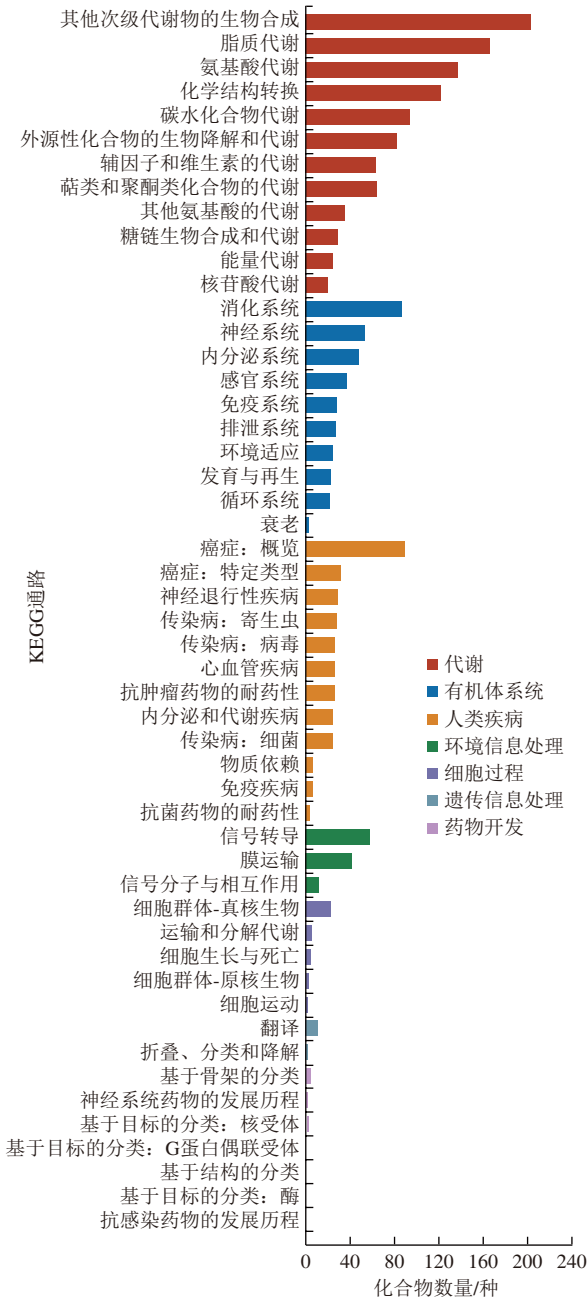


图7 差异代谢物KEGG通路富集

Fig. 7 KEGG pathway enrichment of differential metabolites

HMDB包含了有关人类代谢物及其生物学作用的综合信息。图8显示了在HMDB中，3组波杂样品代谢物以脂质和类脂分子（25.83%）、有机酸及其衍生物（15.09%）、有机杂环化合物（14.33%）为主要类别，这与上述在KEGG数据库中的描述具有相似的结论。

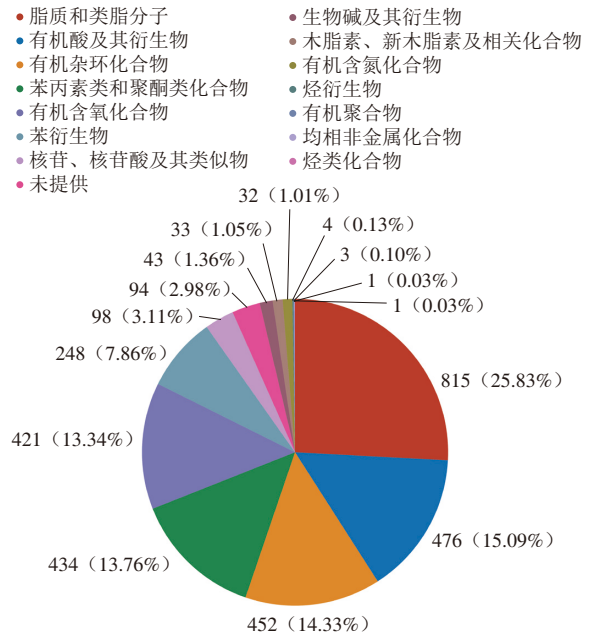


图8 HMDB数据库中差异代谢物分类图

Fig. 8 Classification map of differential metabolites in HMDB database

2.4 多组比较差异代谢物聚类分析

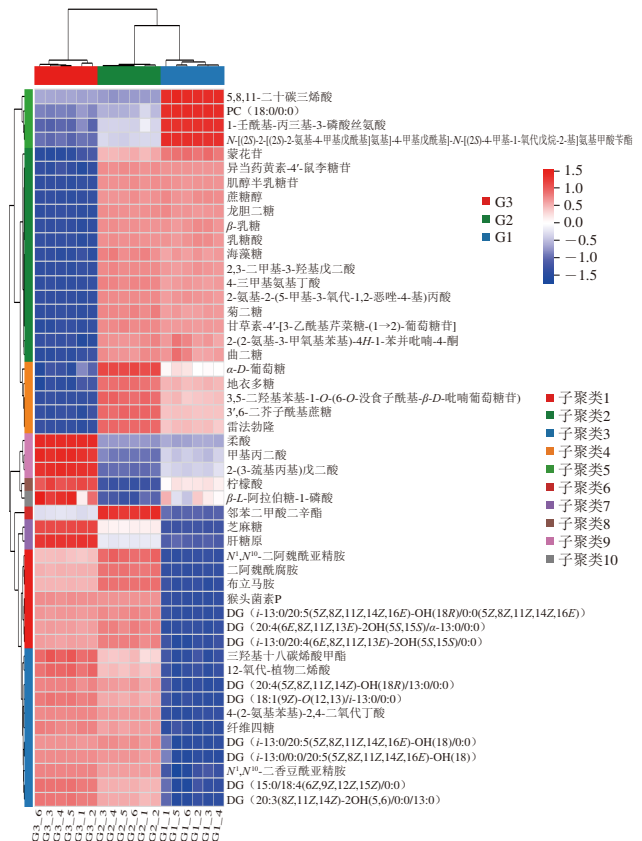


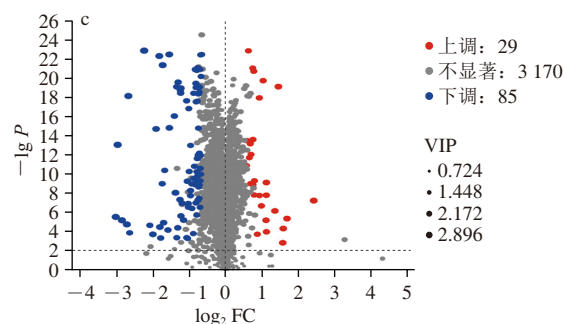
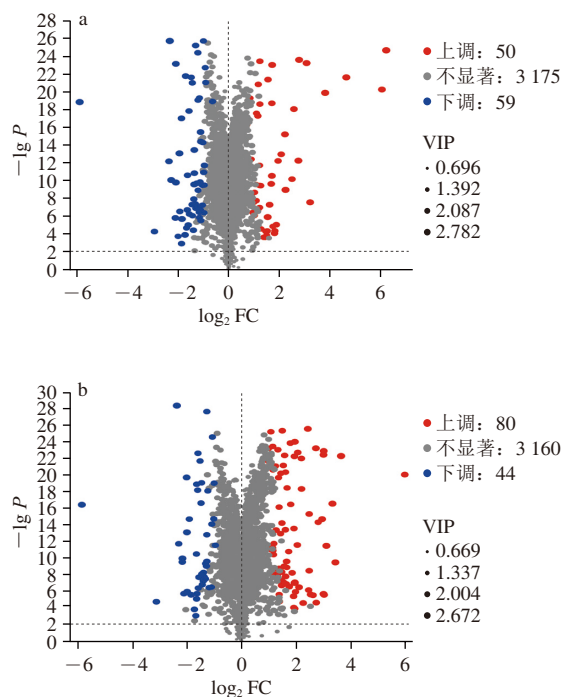
图9 多组比较差异代谢物聚类热图

Fig. 9 Cluster heatmap of differential metabolites among three types of Boza

对筛选到的前50种显著性差异代谢物进行聚类分析,聚类热图能较直观地根据颜色变化表现出代谢物在各组上调或下调的情况,结果如图9所示,其中横向为不同样品组别,左边为代谢物的子聚类,右边为代谢物名称,占比最大的子聚类依次是子聚类2、子聚类3和子聚类1。由于前50差异代谢物在KEGG数据库中注释信息较少,因此选用HMDB对差异代谢物进行注释。在HMDB中,子聚类2中的主要化合物分类是有机氧化物,其中蒙花苷、菊二糖等物质对人体健康有一定益处^[17-18]。子聚类3中主要化合物分类是脂类和类脂分子,其中三羟基十八碳烯酸甲酯、12-氧代-植物二烯酸等对预防疾病及治疗具有一定功效^[19-20]。子聚类1中主要化合物分类是苯丙烷类和聚酮类,其中二阿魏酰腐胺对人体有益,具有抗氧化活性等作用^[21]。

2.5 差异代谢物火山图

在进行两组比较分析时,差异火山图提供了一种直观的方式来展示代谢物表达量的变化差异,从而便于后续分析中挖掘和筛选出具有生物学意义的差异代谢产物。在实验中,通过单变量统计分析方法对这些差异代谢物进行验证,将VIP>2且P<0.01的代谢物确定为具有显著差异的代谢物。对G1 vs G2、G1 vs G3和G3 vs G2组样品数据进行火山图分析。如图10所示,G1 vs G2组间共筛选鉴定出显著差异代谢物109种,其中50种上调,59种下调;G1 vs G3组间共筛选鉴定出显著差异代谢物124种,其中80种上调,44种下调;G3 vs G2组间共筛选鉴定出显著差异代谢物114种,其中29种上调,85种下调。



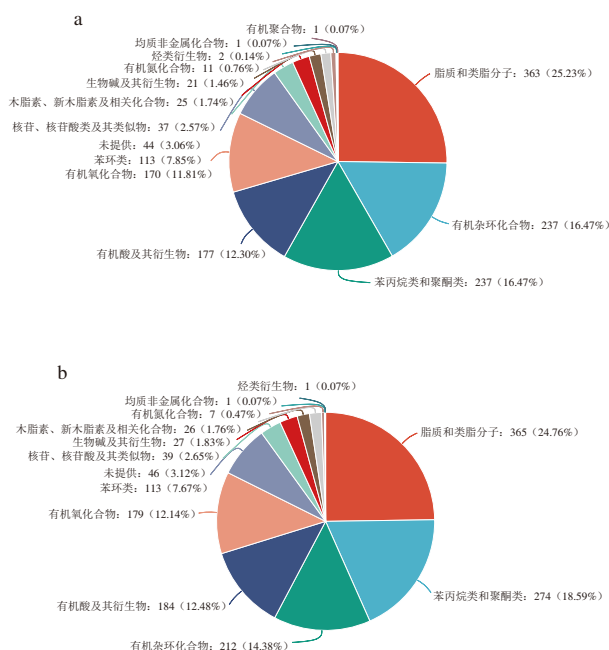
a. G1 vs G2; b. G1 vs G3; c. G3 vs G2。下同。

图10 不同比较组差异代谢物火山图

Fig. 10 Volcano plot of differential metabolites among three types of Boza

2.6 差异代谢物的分类和鉴定

采用多维统计VIP>1和单变量统计P<0.05进行差异代谢物的筛选。如图11所示,从Super Class分类上看,G1 vs G2组中脂质和类脂分子占25.23%、有机杂环化合物占16.47%、苯丙烷类和聚酮类占16.47%、有机酸及其衍生物占12.30%、有机氧化物占11.81%;G1 vs G3组中脂质和类脂分子占24.76%、苯丙烷类和聚酮类占18.59%、有机杂环化合物占14.38%、有机酸及其衍生物占12.48%、有机氧化物占12.14%;G3 vs G2组中有机杂环化合物占17.62%、脂质和类脂分子占17.15%、苯丙烷类和聚酮类占16.78%、有机酸及其衍生物占15.93%、有机氧化物占12.65%。



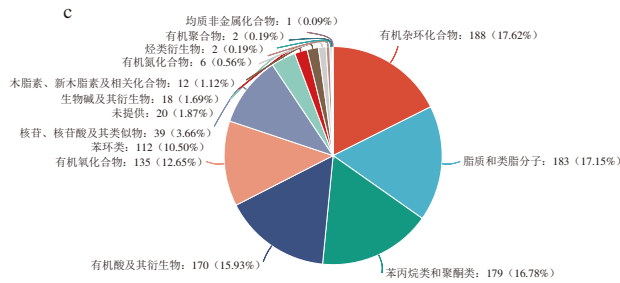


图 11 HMDB数据库中比较组差异代谢物分类图

Fig. 11 Classification map of differential metabolites among three types of Boza in the HMDB database

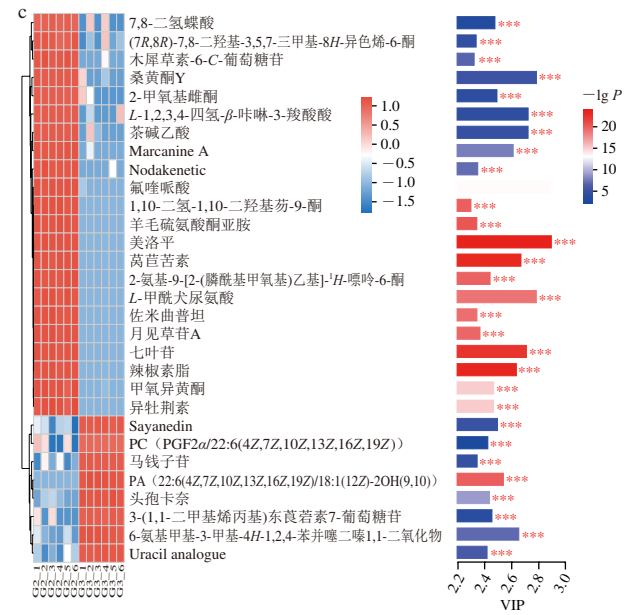
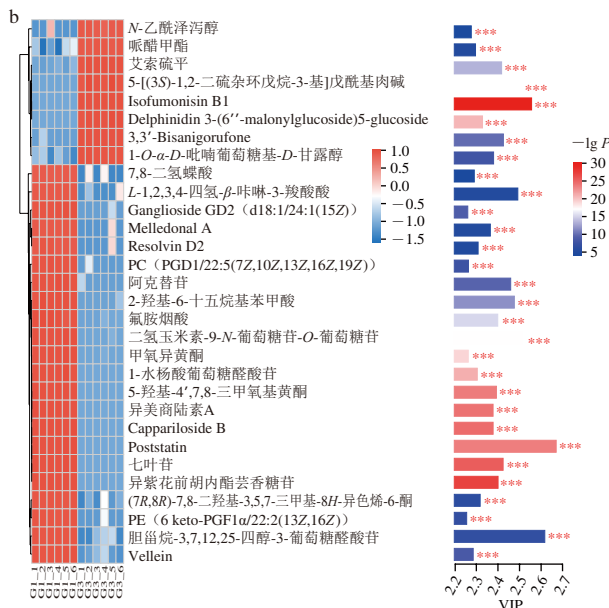
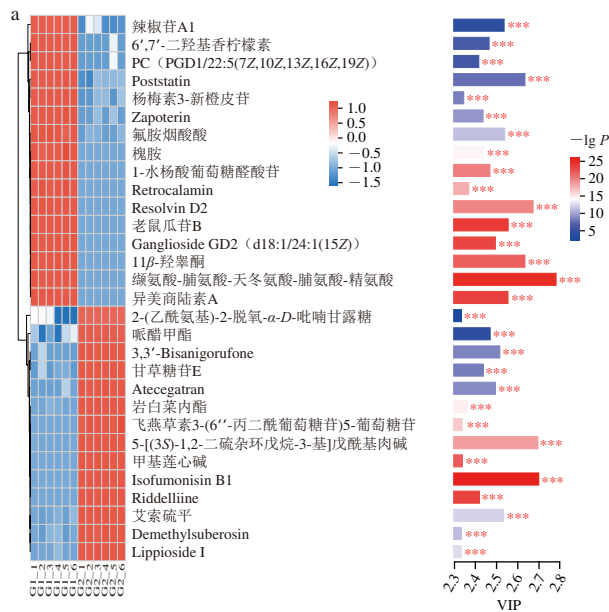
***, $P < 0.001$; 下同。

图 12 比较组差异代谢物分析

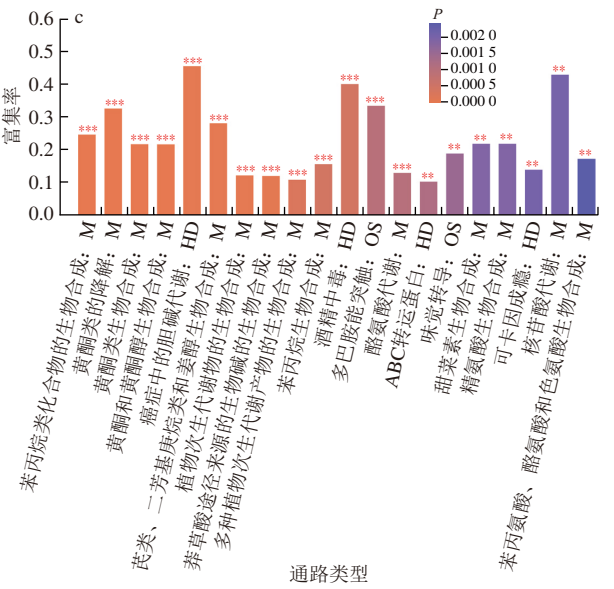
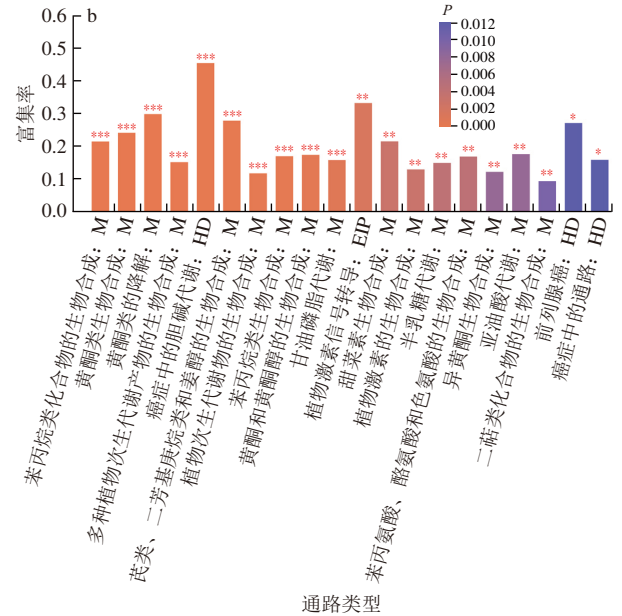
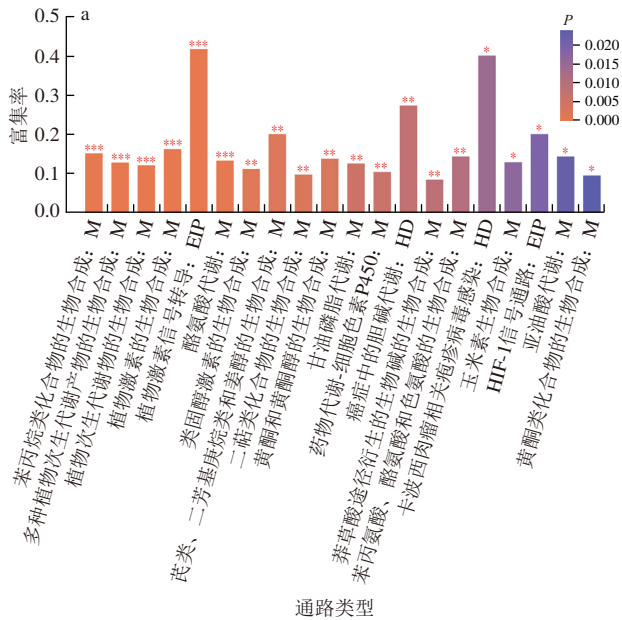
Fig. 12 Analysis of differential metabolites among three types of Boza

图12显示了G1 vs G2、G1 vs G3和G3 vs G2组丰度前30的差异代谢物的热图和VIP图。在G1 vs G2组中，差异代谢物主要是黄酮类、异戊烯醇脂类、羧酸及其衍生物。与G1组相比，G2组中增加了14种化合物，主要是黄酮类，减少了16种化合物，主要是类固醇和类固醇衍生物。在G1 vs G3组中，差异代谢物主要是脂肪酰类、香豆素及其衍生物、羧酸及其衍生物。与G1组相比，G3组增加了8种化合物，主要是脂肪酰类，减少了22种化合物，主要是香豆素及其衍生物。在G3 vs G2组中，差异代谢物主要是香豆素及其衍生物、黄酮类、内酰胺类。与G2组相比，G3组增加了8种化合物（主要是黄酮类），减少了22种化合物（主要是香豆素及其衍生物、黄酮类）。

这些差异主要是由于原料不同引起的。黍子经脱壳处理，塔尔米未经脱壳，而黄酮类化合物大部分是在谷物的外层积累^[22]。塔尔米为黍类作物，因此在品质上与黍子有许多相似之处，但粗纤维和脂肪高于黍子^[23]，这也是G1组和G2组相差不大的原因。在使用担子菌（*Agaricus blazei*）对谷物进行固态发酵过程中，黍子在发酵后，其总酚、氨基酸、水溶性蛋白含量以及抗氧化性质的提升幅度都高于玉米^[24]，这与本研究结果相似，G1组和G2组的代谢物含量均高于G3组。

将不同比较组中所有的显著差异代谢物匹配KEGG的数据库，从而获得代谢物参与的通路信息。对注释完的结果进行富集分析，获得差异代谢物富集较多的通路。KEGG富集分析中，前20种富集的代谢通路如图13所示。G1 vs G2组的主要差异代谢物的前3差异

代谢通路分别是苯丙烷类化合物的生物合成、多种植物次生代谢产物的生物合成、植物次生代谢物的生物合成；G1 vs G3组的主要差异代谢物的前3差异代谢通路分别是苯丙烷类化合物的生物合成、黄酮类生物合成、黄酮类的降解；G3 vs G2组的主要差异代谢物的前3差异代谢通路分别是苯丙烷类化合物的生物合成、黄酮类的降解、黄酮类生物合成。在这些组中，苯丙烷类化合物的生物合成通路是共同的差异代谢通路，而G1 vs G3组和G3 vs G2组的主要差异代谢通路基本一致。



M.代谢; HD.人类疾病; OS.生物系统; 环境信息处理。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。

图 13 比较组差异代谢物KEGG通路富集
Fig. 13 KEGG pathway enrichment map of differential metabolites among three types of Boza

对匹配富集代谢通路所对应的差异代谢物进行数据挖掘，并通过VIP评分对代谢产物进行鉴别，选择VIP最大的差异代谢物进行解析。如表1所示，在G1 vs G2富集通路中，苯丙烷类化合物的生物合成通路涉及17种差异代谢物，上调的有10种。其中，异紫花前胡内酯（VIP=1.90）具有强效抗疟作用^[25]，并且能通过抑制血管内皮生长因子AVEGF-A刺激的信号通路，下调细胞表面信号分子来实现抗血管生成作用^[26]，此外，它具备血管舒张功能，对血管内皮具有一定的保护作用^[27]。下调的差异代谢物有7种，7-去甲基软木花椒素（VIP=2.34）通过抑制CaV1.2通道，产生血管舒张作用，从而降低血压^[28]，还具有显著的抗真菌活性，可以防治炭疽病^[29]。多种植物次生代谢产物的生物合成通路涉及21种差异代谢物，上调的有14种。其中6,7-二羟基佛手柑素（VIP=2.47）可以抑制CYP3A4活性，提高药物生物利用度，增强药效^[30]。同时，该通路中下调的有7种差异代谢物，其显著差异代谢物是7-去甲基软木花椒素（VIP=2.34）。植物次生代谢物的生物合成通路涉及18种差异代谢物，其中15种差异代谢物上调。甲羟戊酸（VIP=1.73）在调节胆固醇代谢、细胞增殖分化以及调控炎症反应等方面发挥着重要作用^[31]。下调的3种差异代谢物中，异胡豆苷（VIP=1.75）具有调节神经递质受体、抑制乙酰胆碱酯酶活性等，拥有治疗阿尔茨海默病的潜力^[32]。

表1 G1 vs G2代谢通路前3所富集的差异代谢物
Table 1 Top three metabolic pathways where differential metabolites in G1 vs G2 were enriched most

代谢通路	序号	代谢物	变化情况	KEGG化合物ID	VIP
苯丙烷类化合物的生物合成	1	异紫花前胡内酯	上调	C09276	1.90
	2	欧前胡酚	上调	C18080	1.71
	3	罗汉松脂素	上调	C10682	1.68
	4	邻氨基苯甲酸	上调	C00108	1.63
	5	甘草素	上调	C09762	1.37
	6	氧戊二酸	上调	C00026	1.26
	7	2-羟基苯甲醛	上调	C06202	1.22
	8	苹果酸	上调	C00149	1.21
	9	七叶亭	上调	C09263	1.09
	10	7-羟基香豆素	上调	C09315	1.03
	11	7-去甲基软木花椒素	下调	C18083	2.34
	12	莽草酸	下调	C00493	1.58
	13	β -葡萄糖没食子鞣苷	下调	C01158	1.44
	14	芥子醇	下调	C02325	1.31
	15	异紫花前胡香豆素	下调	C09276	1.29
	16	芥子酸	下调	C00482	1.16
	17	原儿茶酸	下调	C00230	1.03
多种植物次生代谢产物的生物合成	1	6,7-二羟基佛手柑素	上调	C22156	2.47
	2	<i>N</i> ¹ - <i>trans</i> -Feruloylagmatine	上调	C18325	2.22
	3	香豆酸	上调	C05838	2.06
	4	异紫花前胡内酯	上调	C09276	1.9
	5	欧前胡酚	上调	C18080	1.71
	6	罗汉松脂素	上调	C10682	1.68
	7	邻氨基苯甲酸	上调	C00108	1.63
	8	大麻二醇酸	上调	C10784	1.51
	9	15-去乙酰新茄病镰刀菌烯醇	上调	C02951	1.43
	10	落叶松树脂醇	上调	C10646	1.4
	11	<i>S</i> -腺苷甲硫氨酸	上调	C00019	1.28
	12	Coumarinate	上调	C05838	1.13
	13	七叶亭	上调	C09263	1.09
	14	7-羟基香豆素	上调	C09315	1.03
	15	7-去甲基软木花椒素	下调	C18083	2.34
	16	人参皂甙C-K	下调	C22127	1.7
	17	莽草酸	下调	C00493	1.58
	18	β -葡萄糖没食子鞣苷	下调	C01158	1.44
	19	异紫花前胡香豆素	下调	C09276	1.29
	20	脱氧麦根酸	下调	C15485	1.27
	21	3,4-二氢-2 <i>H</i> -1-苯并吡喃-2-酮	下调	C02274	1.07
植物次生代谢物的生物合成	1	甲羟戊酸	上调	C00418	1.73
	2	4-羟基苯乙醛	上调	C03765	1.72
	3	邻氨基苯甲酸	上调	C00108	1.63
	4	3-羟基黄酮	上调	C01495	1.54
	5	2,4-二甲基-2-戊烯酸	上调	C08898	1.5
	6	黄烷酮	上调	C00766	1.49
	7	肌苷酸	上调	C00130	1.47
	8	<i>S</i> -腺苷甲硫氨酸	上调	C00019	1.28
	9	氧戊二酸	上调	C00026	1.26
	10	3,4-黄烷酮	上调	C01495	1.24
	11	苹果酸	上调	C00149	1.21
	12	1-氨基环丙烷羧酸	上调	C01234	1.21
	13	5'-甲硫腺苷	上调	C00170	1.16
	14	茉莉酮酸	上调	C08491	1.04
	15	<i>L</i> -丙氨酸	上调	C00041	1.02
	16	异胡豆苷	下调	C03470	1.75
	17	莽草酸	下调	C00493	1.58
	18	(<i>S</i>)-脱落酸	下调	C06082	1.52

如表2所示, 在G1 vs G3富集通路中, 苯丙烷类化合物的生物合成通路涉及23种差异代谢物, 上调的物质有19种, 罗汉松脂素(VIP=1.79)具有免疫调节, 抑制葡萄膜炎^[33]、神经炎症^[34]等作用。同时, 下调的有4种, 其显著差异代谢物是7-去甲基软木花椒素(VIP=2.12)。黄酮类生物合成通路涉及19种差异代谢物, 上调的有15种, 牡荆素(VIP=1.83)具有多种药理活性, 包括抗氧化、抗炎、抗癌等作用^[35], 并且对糖尿病肾病有改善作用^[36]。下调的有4种。橙皮素(VIP=1.42)可以减轻顺铂诱导的肾毒性, 抑制细胞凋亡^[37], 对神经退行性疾病的神经有保护作用^[38]。黄酮类的降解通路涉及12种差异代谢物, 均上调。雌马酚(VIP=1.85)对多种健康问题具有有益的效果, 例如具有较强的雌激素活性和抗氧化活性^[39]、对癌症细胞增殖的抑制作用^[40]。

表2 G1 vs G3代谢通路前3所富集的差异代谢物
Table 2 Top three metabolic pathways where differential metabolites in G1 vs G3 were enriched most

代谢通路	序号	代谢物	变化情况	KEGG化合物ID	VIP
苯丙烷类化合物的生物合成	1	罗汉松脂素	上调	C10682	1.79
	2	异紫花前胡内酯	上调	C09276	1.77
	3	七叶亭	上调	C09263	1.67
	4	欧前胡酚	上调	C18080	1.58
	5	2-羟基苯甲酸甲酯	上调	C12305	1.51
	6	二氢榭皮素	上调	C01617	1.51
	7	染料木黄酮	上调	C09126	1.45
	8	美迪紫檀素	上调	C10503	1.44
	9	<i>L</i> -色氨酸	上调	C00078	1.32
	10	东莨菪素	上调	C01752	1.32
	11	柚皮素	上调	C00509	1.25
	12	氧戊二酸	上调	C00026	1.25
	13	卡瓦胡椒内酯	上调	C09980	1.19
	14	黄酮二氢山奈酚	上调	C00974	1.17
	15	2-羟基苯甲醛	上调	C06202	1.09
	16	松柏醛	上调	C02666	1.08
	17	邻氨基苯甲酸	上调	C00108	1.07
	18	7-羟基香豆素	上调	C09315	1.05
	19	<i>P</i> -香豆醛	上调	C05608	1.03
	20	7-去甲基软木花椒素	下调	C18083	2.12
	21	没食子酸	下调	C01424	1.45
	22	甘草素	下调	C09762	1.23
	23	<i>D</i> -赤藓糖-4-磷酸	下调	C00279	1.05
黄酮类生物合成	1	牡荆素	上调	C01460	1.83
	2	柚皮苷二氢查耳酮	上调	C09789	1.64
	3	绿原酸	上调	C00852	1.52
	4	二氢榭皮素	上调	C01617	1.51
	5	毛地黄黄酮	上调	C01514	1.36
	6	樱花素	上调	C09833	1.32
	7	5- <i>O</i> -咖啡酰莽草酸	上调	C10434	1.31
	8	榭皮素	上调	C00389	1.29
	9	柚皮素	上调	C00509	1.25
	10	4-香豆酰莽草酸酯	上调	C02947	1.25
	11	圣草酚	上调	C05631	1.25
	12	紫柳黄酮	上调	C09614	1.22

续表2

代谢通路	序号	代谢物	变化情况	KEGG化合物ID	VIP
黄酮类的降解	13	高圣草酚	上调	C09756	1.18
	14	根皮素	上调	C00774、C10680	1.17
	15	黄酮二氢山奈酚	上调	C00974	1.17
	16	橙皮素	下调	C01709	1.42
	17	甘草素	下调	C09762	1.23
	18	Caffeoylshikimate	下调	C10434	1.19
	19	橙皮素7-新橘皮糖苷	下调	C09806	1.06
	1	雌马酚	上调	C14131	1.85
	2	柚皮苷二氢查耳酮	上调	C09789	1.64
	3	二氢槲皮素	上调	C01617	1.51
	4	葛根素	上调	C10524	1.47
	5	染料木黄酮	上调	C09126	1.45
黄酮类生物合成	6	毛地黄黄酮	上调	C01514	1.36
	7	槲皮素	上调	C00389	1.29
	8	柚皮素	上调	C00509	1.25
	9	圣草酚	上调	C05631	1.25
	10	染料木苷	上调	C09126	1.24
	11	根皮素	上调	C00774、C10680	1.17
	12	黄酮二氢山奈酚	上调	C00974	1.17
	1	雌马酚	上调	C14131	1.85
	2	柚皮苷二氢查耳酮	上调	C09789	1.64
	3	二氢槲皮素	上调	C01617	1.51
	4	葛根素	上调	C10524	1.47
	5	染料木黄酮	上调	C09126	1.45

如表3所示，在G3 vs G2富集通路中，苯丙烷类化合物的生物合成通路涉及15种差异代谢物，上调的有4种，甘草素（VIP=2.25）具有抗病毒和抗菌作用^[41]，可以通过抑制AKR1Cs酶，尤其是AKR1C3酶，从而发挥抗肿瘤作用^[42]。下调的有11种差异代谢物，二氢槲皮素（VIP=1.75）在炎症、肿瘤、微生物感染、氧化应激、心血管疾病和肝脏疾病方面显示出具有前景的药理活性^[43]。黄酮类的降解通路涉及10种差异代谢物，均显示为下调，葛根素（VIP=2.06）可以通过调节血清和肝脏代谢产物，参与多个代谢通路的调控，从而保护肝脏并减轻酒精性肝损伤^[44]，也可用于治疗多种中枢神经系统疾病^[45]。黄酮类生物合成通路涉及15种差异代谢物，上调的有2种，其显著差异代谢物是甘草素（VIP=2.25），下调的有13种，其显著差异代谢物是牡荆素（VIP=1.78）。

表3 G3 vs G2代谢通路前3所富集的差异代谢物
Table 3 Top three metabolic pathways where differential metabolites in G3 vs G2 were enriched most

代谢通路	序号	代谢物	变化情况	KEGG化合物ID	VIP
苯丙烷类化合物的生物合成	1	甘草素	上调	C09762	2.25
	2	没食子酸	上调	C01424	1.79
	3	D-赤藓糖-4-磷酸	上调	C00279	1.73
	4	邻氨基苯甲酸	上调	C00108	1.33
	5	二氢槲皮素	下调	C01617	1.75
	6	卡瓦胡椒内酯	下调	C09980	1.71
	7	2-羟基苯甲酸甲酯	下调	C12305	1.67
	8	七叶亭	下调	C09263	1.65
	9	染料木黄酮	下调	C09126	1.64
	10	黄酮二氢山奈酚	下调	C00974	1.61
	11	美迪紫檀素	下调	C10503	1.59
	12	松柏醛	下调	C02666	1.55
	13	柚皮素	下调	C00509	1.48
	14	L-色氨酸	下调	C00078	1.4
	15	东莨菪素	下调	C01752	1.34

续表3

代谢通路	序号	代谢物	变化情况	KEGG化合物ID	VIP
黄酮类的降解	1	葛根素	下调	C10524	2.06
	2	二氢槲皮素	下调	C01617	1.75
	3	染料木黄酮	下调	C09126	1.64
	4	黄酮二氢山奈酚	下调	C00974	1.61
	5	毛地黄黄酮	下调	C01514	1.58
	6	槲皮素	下调	C00389	1.52
	7	柚皮素	下调	C00509	1.48
	8	雌马酚	下调	C14131	1.48
	9	根皮素	下调	C00774	1.47
	10	染料木苷	下调	C09126	1.20
黄酮类生物合成	1	甘草素	上调	C09762	2.25
	2	Caffeoylshikimate	上调	C10434	1.35
	3	牡荆素	下调	C01460	1.78
	4	二氢槲皮素	下调	C01617	1.75
	5	绿原酸	下调	C00852	1.66
	6	黄酮二氢山奈酚	下调	C00974	1.61
	7	毛地黄黄酮	下调	C01514	1.58
	8	槲皮素	下调	C00389	1.52
	9	樱花素	下调	C09833	1.52
	10	4-香豆酰莽草酸酯	下调	C02947	1.49
	11	柚皮素	下调	C00509	1.48
	12	根皮素	下调	C00774	1.47
	13	5-O-咖啡酰莽草酸	下调	C10434	1.41
	14	紫柳黄酮	下调	C09614	1.35
	15	高圣草酚	下调	C09756	1.29

对富集到代谢通路前3的差异代谢物中进一步分析。在G1 vs G2中，上调和下调的主要化合物是香豆素及其衍生物，但上调的物质种类明显高于下调的物质。其中，香豆素及其衍生物在治疗癌细胞方面有潜在应用^[46]。在G1 vs G3中，上调和下调的主要化合物是黄酮类化合物，但上调的物质种类明显高于下调的物质，黄酮类化合物对人体健康有许多有益的功效^[47]。在G3 vs G2中，上调和下调的主要化合物是黄酮类化合物，但下调的物质种类明显高于上调物质。由此可知，G3组代谢物含量明显低于G1组和G2组，这与上述图12部分描述内容大体一致。依据上调和下调数据，可得出G1的营养价值优于G2和G3，而G2优于G3。

3 结论

本研究采用LC-MS联用技术结合非靶向代谢组学和多元分析手段，探究3种不同生产原料波杂样品的差异代谢物及其代谢通路。通过PCA、PLS-DA表明3种不同生产原料组间代谢物具有显著差异，而差异原因可能是由原料不同引起的。根据VIP>1和P<0.05的筛选标准，结果显示各组中显著的差异代谢物主要为脂质和类脂分子、有机酸及其衍生物、有机杂环类化合物、苯丙烷类和聚酮类等。各比较组差异代谢物所富集到的代谢通路表明，多种植物次生代谢产物的生物合成、植物次生代

谢物的生物合成、苯丙烷类化合物的生物合成、黄酮类生物合成、黄酮类的降解是较为显著的通路。对代谢通路所对应的差异代谢物进行数据挖掘,发现G1的营养价值优于G2和G3。综上,通过对不同生产原料的波杂样品进行代谢产物分析,探究了其差异代谢产物与代谢通路,研究结果可为波杂发酵饮品的开发与应用提供参考。

参考文献:

- [1] 努尔古丽·热合曼, 华长春, 朱晓莹, 等. 新疆柯尔克孜族传统发酵饮料博扎中微生物群落结构的PCR-DGGE分析[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 111-114.
- [2] 阿特尔古丽·沙布尔江, 热合满·艾拉, 艾乃吐拉·马合木提, 等. 复合波杂自然发酵工艺研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(3): 160-164. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2017.03.032.
- [3] OSIMANI A, GAROFALO C, AQUILANTI L, et al. Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 194: 62-70. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.011.
- [4] PATRA M, BASHIR O, AMIN T, et al. A comprehensive review on functional beverages from cereal grains-characterization of nutraceutical potential, processing technologies and product types[J]. Heliyon, 2023, 9(6): e16804. DOI:10.1016/j.heliyon.2023.e16804.
- [5] KAUR H, SHAMS R, DASH K K, et al. A comprehensive review of pseudo-cereals: nutritional profile, phytochemicals constituents and potential health promoting benefits[J]. Applied Food Research, 2023, 3(2): 100351. DOI:10.1016/j.afres.2023.100351.
- [6] UCAK S, YURT M N Z, TASBASI B B, et al. Identification of bacterial communities of fermented cereal beverage Boza by metagenomic analysis[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 153: 112465. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112465.
- [7] 吾尔恩·阿合别尔迪, 杨晓绒, 木古丽, 等. 传统发酵饮料博扎中酵母菌的分离和鉴定[J]. 中国酿造, 2013, 32(12): 108-111. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2013.12.026.
- [8] 蒋雅馨, 张悦, 俞晓亭, 等. 植物乳杆菌发酵谷物饮料工艺的优化[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 83-99. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2018.11.015.
- [9] GOK I. Functional potential of several turkish fermented traditional foods: biotic properties, bioactive compounds, and health benefits[J]. Food Reviews International, 2023, 39(5): 2568-2593. DOI:10.1080/87559129.2021.1962340.
- [10] AYSELI M T, COSKUN I, SELLI S. Evaluation of volatile and thermal properties of Boza, a traditional fermented beverage[J]. Microchemical Journal, 2023, 193: 108918. DOI:10.1016/j.microc.2023.108918.
- [11] 热合满·艾拉, 阿特尔古丽·沙布尔江, 祖木拉·艾力, 等. 玉米波杂粉最优冲调条件的研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(9): 167-171. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2019.09.032.
- [12] 张慧娟, 段雅文, 隋妙, 等. 一种波杂饮料的工艺研发[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 77-82. DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2021.04.013.
- [13] 陈海强, 梁钻好, 林小晖, 等. 鼠李糖乳杆菌和产乳酸芽孢杆菌混合发酵薏米饮料[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 98-104. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2018.11.017.
- [14] 王磊, 贾玉龙, 罗彦玉, 等. 基于UPLC-MS非靶向代谢组学分析乳杆菌发酵方竹笋超细全浆的代谢差异[J]. 食品科学, 2023, 44(18): 200-213. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20221019-177.
- [15] PARKER E J, BILLANE K C, AUSTEN N, et al. Untangling the complexities of processing and analysis for untargeted LC-MS data using open-source tools[J]. Metabolites, 2023, 13(4): 463. DOI:10.3390/metabo13040463.
- [16] GUPTA R, GAUR S. LC-MS investigated as a tool to study the metabolomic characteristics of cereal fermentation[J]. Applied Food Research, 2024, 4(1): 100365. DOI:10.1016/j.afres.2023.100365.
- [17] NIRMALA F S, LEE H, KIM Y I, et al. Exercise-induced signaling activation by *Chrysanthemum zawadskii* and its active compound, linarin, ameliorates age-related sarcopenia through Sestrin 1 regulation[J]. Phytomedicine, 2024, 129: 155695. DOI:10.1016/j.phymed.2024.155695.
- [18] 徐寒冰. 菊粉DFA-III代谢途径关键酶筛选鉴定、分子改造及应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023. DOI:10.27169/d.cnki.gwqgu.2023.002129.
- [19] MIURA A, KUWAHARA S. A concise synthesis of pinellic acid using a cross-metathesis approach[J]. Tetrahedron, 2009, 65(17): 3364-3368. DOI:10.1016/j.tet.2009.02.063.
- [20] MAYNARD D, GR GER H, DIERKS T, et al. The function of the oxylipin 12-oxophytodienoic acid in cell signaling, stress acclimation, and development[J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(22): 5341-5354. DOI:10.1093/jxb/ery316.
- [21] ELDER T, DEL RÍO J C, RALPH J, et al. Density functional theory study on the coupling and reactions of diferuloylputrescine as a lignin monomer[J]. Phytochemistry, 2022, 197: 113122. DOI:10.1016/j.phytochem.2022.113122.
- [22] SUNIL C K, NANJE GOWDA N A, NAYAK N, et al. Unveiling the effect of processing on bioactive compounds in millets: implications for health benefits and risks[J]. Process Biochemistry, 2024, 138: 79-96. DOI:10.1016/j.procbio.2024.01.010.
- [23] 刘玉梅, 曹军, 王萱. 新疆哈萨克传统食品塔尔米营养成分研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3): 310-312.
- [24] ZHAI F H, WANG Q, HAN J R. Nutritional components and antioxidant properties of seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei*[J]. Journal of Cereal Science, 2015, 65: 202-208. DOI:10.1016/j.jcs.2015.07.010.
- [25] EZENYI I C, CHIRAWURAH J D, ERHUNSE N, et al. Marmesin isolated from *Celtis durandii* Engl. root bioactive fraction inhibits β -hematin formation and contributes to antiplasmodial activity[J]. Journal of Ethnopharmacol, 2023, 317: 116804. DOI:10.1016/j.jep.2023.116804.
- [26] KIM J H, KIM J K, AHN E K, et al. Marmesin is a novel angiogenesis inhibitor: regulatory effect and molecular mechanism on endothelial cell fate and angiogenesis[J]. Cancer Letters, 2015, 369(2): 323-330. DOI:10.1016/j.canlet.2015.09.021.
- [27] 张芬, 王颖楠. 异紫花前胡内酯对妊娠糖尿病大鼠主动血管收缩及AT1R、AT2R、COX-1、COX-2表达的影响[J]. 中国药师, 2019, 22(4): 649-655. DOI:10.3969/j.issn.1008-049X.2019.04.014.
- [28] YANG X P, NA C, WANG Y. *Angelica decursiva* exerts antihypertensive activity by inhibiting L-type calcium channel[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 313: 116527. DOI:10.1016/j.jep.2023.116527.
- [29] MARTINEZ J, GOMEZ A, RAMIREZ C, et al. Controlling anthracnose by means of extracts, and their major constituents, from *Brosimum rubescens* Taub[J]. Biotechnology Reports, 2020, 25: e00405. DOI:10.1016/j.btre.2019.e00405.
- [30] FUHR L M, MAROK F Z, FUHR U, et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling of bergamottin and 6,7-dihydroxybergamottin to describe CYP3A4 mediated grapefruit-drug interactions[J]. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2023, 114(2): 470-482. DOI:10.1002/cpt.2968.

- [31] FESSLER M B. The intracellular cholesterol landscape: dynamic integrator of the immune response[J]. Trends in Immunology, 2016, 37(12): 819-830. DOI:10.1016/j.it.2016.09.001.
- [32] PERROT T, MARC J, LEZIN E, et al. Emerging trends in production of plant natural products and new-to-nature biopharmaceuticals in yeast[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2024, 87: 103098. DOI:10.1016/j.copbio.2024.103098.
- [33] LI X, GAO Q, YANG L, et al. Matairesinol ameliorates experimental autoimmune uveitis by suppression of IRBP-specific Th17 cells[J]. Journal of Neuroimmunology, 2020, 345: 577286. DOI:10.1016/j.jneuroim.2020.577286.
- [34] XU P, HUANG M W, XIAO C X, et al. Matairesinol suppresses neuroinflammation and migration associated with Src and ERK1/2-NF- κ B pathway in activating BV2 microglia[J]. Neurochemical Research, 2017, 42(10): 2850-2860. DOI:10.1007/s11064-017-2301-1.
- [35] BABAEI F, MOAFIZAD A, DARVISHVAND Z, et al. Review of the effects of vitexin in oxidative stress-related diseases[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(6): 2569-2580. DOI:10.1002/fsn3.1567.
- [36] ZHANG S, ZHANG S X, WANG H, et al. Vitexin ameliorated diabetic nephropathy via suppressing GPX4-mediated ferroptosis[J]. European Journal of Pharmacology, 2023, 951: 175787. DOI:10.1016/j.ejphar.2023.175787.
- [37] CHEN X L, WEI W, LI Y Z, et al. Hesperetin relieves cisplatin-induced acute kidney injury by mitigating oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. Chemico-Biological Interactions, 2019, 308: 269-278. DOI:10.1016/j.cbi.2019.05.040.
- [38] KHAN A, IKRAM M, HAHM J R, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Citrus flavonoid* hesperetin: special focus on neurological disorders[J]. Antioxidants, 2020, 9(7): 609. DOI:10.3390/antiox9070609.
- [39] MAYO B, VÁZQUEZ L, FLÓREZ A B. Equol: a bacterial metabolite from the daidzein isoflavone and its presumed beneficial health effects[J]. Nutrients, 2019, 11(9): 2231. DOI:10.3390/nu11092231.
- [40] YAMASHITA S, LIN I, OKA C, et al. Soy isoflavone metabolite equol inhibits cancer cell proliferation in a PAP associated domain containing 5-dependent and an estrogen receptor-independent manner[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2022, 100: 108910. DOI:10.1016/j.jnutbio.2021.108910.
- [41] WANG L Q, YANG R, YUAN B C, et al. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2015, 5(4): 310-315. DOI:10.1016/j.apsb.2015.05.005.
- [42] LIU H, YAO Z Q, SUN M N, et al. Inhibition of AKR1Cs by liquiritigenin and the structural basis[J]. Chemico-Biological Interactions, 2023, 385: 110654. DOI:10.1016/j.cbi.2023.110654.
- [43] SUNIL C, XU B J. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin)[J]. Phytochemistry, 2019, 166: 112066. DOI:10.1016/j.phytochem.2019.112066.
- [44] 邵仕娟, 王浩, 史雯馨, 等. 基于代谢组学探究葛根素对慢性酒精性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 食品工业科技, 2024, 45(16): 25-35. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2023120219.
- [45] LIU X, HUANG R, WAN J Y. Puerarin: a potential natural neuroprotective agent for neurological disorders[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023, 162: 114581. DOI:10.1016/j.biopha.2023.114581.
- [46] AHMAD BHAT A, KAUR G, TANDON N, et al. Current advancements in synthesis, anticancer activity, and structure-activity relationship (SAR) of coumarin derivatives[J]. Inorganic Chemistry Communications, 2024, 167: 112605. DOI:10.1016/j.inoche.2024.112605.
- [47] SHEN N, WANG T F, GAN Q, et al. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132531. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132531.