

# 基于高温高湿条件下苹果加工过程中 代谢产物的多样性分析

宋娟<sup>1,2</sup>, 康三江<sup>1</sup>, 张海燕<sup>1</sup>, 曾朝珍<sup>1</sup>, 袁晶<sup>1</sup>, 慕钰文<sup>1</sup>, 苟丽娜<sup>1</sup>

(1. 甘肃省农业科学院农产品贮藏加工研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学  
食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 通过分析发酵对苹果品质影响的内在机制, 为苹果功能成分及代谢调控机制提供科学依据, 助力苹果产业纵深发展。采用非靶向代谢组学技术分析了高温高湿条件下苹果加工过程产生的各类差异代谢化合物, 分别使用主成分分析方法、聚类热图、偏最小二乘判别方法、KEGG 通路富集等对代谢组数据进行分析。结果表明, 通过主成分分析(PCA)显示了不同发酵过程中苹果代谢组成的显著阶段性变化, 代谢物质鉴定表明, 存在 334 种代谢物, 其中脂质和类脂分子所占比例最大, 达到 44.61%。利用聚类树图和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)揭示了在发酵末期苹果样本的代谢物水平明显高于未发酵样本, 有效地区分了不同发酵阶段的苹果样本。通过 KEGG 路径分析进一步指出, 苹果的苯丙素生物合成和苯丙氨酸代谢途径在发酵期间非常活跃, 并且在高温条件下激活了玉米素生物合成和鞘脂代谢的特定途径, 这对苹果的高温适应性和风味的形成具有重要影响。

**关键词:** 非靶向代谢组学; 苹果; 高温发酵; 代谢途径; 代谢产物; 多样性; 质量控制; 风味形成

**中图分类号:** S661.1; TS207.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-2172(2024)08-0711-13

[doi:10.3969/j.issn.2097-2172.2024.08.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.2097-2172.2024.08.005)

## Analysis of Metabolite Diversity in Apple Processing Based on High Temperature and High Humidity Conditions

SONG Juan<sup>1,2</sup>, KANG Sanjiang<sup>1</sup>, ZHANG Haiyan<sup>1</sup>, ZENG Chaozhen<sup>1</sup>, YUAN Jing<sup>1</sup>, MU Yuwen<sup>1</sup>, GOU Lina<sup>1</sup>

(1. Agricultural Product Storage and Processing Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** By analyzing the intrinsic mechanisms of how fermentation affects apple quality, this study provides a scientific basis for the functional components and metabolic regulation mechanisms of apples, supporting the in-depth development of the apple industry. In this research, non-targeted metabolomics technology was utilized to analyze the diverse differential metabolic compounds generated during the processing of apples under high temperature and high humidity conditions. Various methods such as principal component analysis (PCA), cluster heat maps, partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), and KEGG pathway enrichment were utilized to evaluate the metabolomic data. PCA revealed significant stage-wise changes in the metabolic composition of apples during different fermentation processes. Metabolite identification indicated the presence of 314 metabolites, with lipids and lipid-like molecules accounting for the largest proportion, reaching 44.61%. Utilizing cluster dendrograms and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), it was revealed that the metabolite levels in the apple samples at the end of fermentation were significantly higher than those in the unfermented samples, effectively distinguishing apple samples at different fermentation stages. Further, KEGG pathway analysis pointed out that the biosynthesis of phenylpropanoids and the metabolism of phenylalanine in apples were very active during fermentation, and specific pathways for the biosynthesis of cornoside and sphingolipid metabolism were activated under high temperature conditions, which have an important impact on the high-temperature adaptability and flavor formation of apples.

**Key words:** Non-targeted metabolomics; Apple; High-temperature fermentation; Metabolic pathway; Metabolic product; Diversity; Quality control; Flavor formation

苹果作为一种全球性的水果, 不仅种植遍布 世界各地并深受消费者青睐, 而且因其丰富的营

收稿日期: 2024-07-02

基金项目: 甘肃省农业农村厅科技项目(GNKJ-2022-29); 国家苹果产业技术体系(CARS-27-2024); 甘肃省科技计划项目(23JRRA1792)。

作者简介: 宋娟(1988—), 女, 甘肃榆中人, 助理研究员, 硕士, 研究方向为营养与食品安全。Email: songjuan88126@126.com。

通信作者: 康三江(1977—), 男, 甘肃陇西人, 研究员, 研究方向为果蔬贮藏加工技术。Email: kang58503@163.com。

养价值和在食品工业中的多样化用途而备受重视。苹果在贮藏和加工过程中,微生物发酵使苹果经历复杂的代谢变化,涵盖多个生物化学反应和路径,对苹果的质量、口感和风味提升起着决定性作用段<sup>[1-2]</sup>。非靶向代谢组学技术正日益成为揭示食品发酵过程中显著变化的关键手段。该技术不仅显著增强了食品发酵的效率与品质,而且在提升食品安全标准方面发挥了重要作用<sup>[3]</sup>。

目前,众多学者采用一系列尖端分析技术,包括高效液相色谱(HPLC)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)以及液相色谱-质谱联用(LC-MS)等,对食品发酵过程中产生的代谢产物进行深入的定性与定量分析,旨在揭示其内在特性和生物学功能<sup>[4-6]</sup>。在对食品发酵过程的研究主要集中在代谢物的分析和形成机理方面,Salazar-Orbea等<sup>[7]</sup>利用非靶向代谢组学技术,识别出在高温加工过程中草莓的关键代谢标记物,包括丙氨酸、蝶酰谷氨酸、2-羟基-5-甲氧基苯甲酸以及2-羟基苯甲酸 $\beta$ -D-葡萄糖苷。Markkinen等<sup>[8]</sup>通过核磁共振代谢组学方法分析了植物乳杆菌对沙棘汁发酵过程中的46种代谢物的变化,在发酵的早期阶段,L-苹果酸、多种必需氨基酸和核苷类物质被大量利用,而糖类物质则主要在发酵末期被消耗。彭玉娇等<sup>[9]</sup>运用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)识别出6982种代谢物,其中7种黄酮类化合物和6种氨基酸及多肽类化合物对黑果枸杞与红果枸杞的氨基酸代谢过程具有显著影响。陈云丽等<sup>[10]</sup>采用广泛靶向代谢组学技术分析了陈化7~11 a的广陈皮中的化学成分变化,观察到陈化时间对陈皮中黄酮类、萜类、氨基酸及其衍生物的含量有显著的影响。然而,关于苹果在高温条件下发酵过程中代谢产物多样性的系统分析仍相对缺乏,限制了对苹果发酵机制的深入理解和产品品质的精准控制。

本研究通过建立苹果高温发酵过程中的代谢图谱以揭示发酵对苹果品质影响的内在机制;并综合运用液相色谱-串联质谱分析技术(LC-MS/MS)对苹果在各个发酵阶段的代谢物质进行细致的分析和持续监控。利用主成分分析(PCA)、聚类分析和KEGG代谢途径等复杂多元统计方法,准确地识别和定量评估苹果在发酵过

程中的关键代谢物。不仅增进了对苹果在发酵过程中代谢产物多样性的理解,而且为苹果的长期保鲜及加工利用提供了理论依据。这对于后期苹果的开发利用和增强苹果相关产品在市场竞争中的竞争力,以及满足消费者对高端苹果产品的追求均具有极其重要的参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料与试剂

供试苹果品种为红富士,由甘肃省静宁县静宁苹果试验站提供。

蛋白胨、牛肉浸粉、酵母浸粉由国药集团化学试剂有限公司提供,柠檬酸(色谱纯)、3-辛醇(色谱纯)由美国Sigma公司提供,葡萄糖、磷酸氢二钾、醋酸钠、硫酸镁、硫酸锰、甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯)均由上海源叶生物科技有限公司提供。

MRS肉汤液体培养基(g/L):蛋白胨10 g,牛肉浸粉10 g,酵母浸粉5 g,葡萄糖20 g,磷酸氢二钾2 g,醋酸钠5 g,柠檬酸2 g,硫酸镁0.1 g,硫酸锰0.05 g,吐温801.0 g, pH 6.2 $\pm$ 0.2(25 $^{\circ}$ C),蒸馏水1 000 mL,121 $^{\circ}$ C高压蒸汽灭菌20 min。

### 1.2 仪器与设备

DHG-9003电加热恒温干燥箱由上海景宏实验室仪器有限公司提供,HH-2恒温水浴锅由赫维生物科技股份有限公司提供,AE1204J电子天平由上海研丰电子科技有限公司提供,UV-6100BS紫外可见分光光度计由上海子期实验设备有限公司提供,Scientz-10ND原位普通型真空冷冻干燥机由宁波新芝冻干设备股份有限公司提供,TGL-22S高速冷冻离心机由上海锦玖仪器设备有限公司提供,ICS-3000离子色谱仪由美国Dionex公司提供,TSQ Quantum Access液相色谱-质谱联用仪由美国Thermo Scientific公司提供。

### 1.3 测定方法

将供试红富士苹果随机分为4组,分别为A组(对照组,未添加乳酸菌组)、B组(乳酸菌发酵前期,1~30 d)、C组(乳酸菌发酵中期,30~60 d)和D组(乳酸菌发酵末期,60~90 d)。对照组的前处理是苹果未添加乳酸菌,处理组的前处理是苹果经过彻底清洁并添加活性乳酸菌,启动24~48 h的基础发酵过程。控制温度为50~90 $^{\circ}$ C、相对湿度维持在50%~90%的环境条件下苹果按实

验设计持续发酵, 分别提取各处理组苹果样品以进行分析研究。

1.3.1 样本前处理 参照周春娜等<sup>[11]</sup>的方法, 稍有改动。在对苹果样本进行质量评估时, 确保取样环境严格无菌, 以消除样本间可能的交叉污染。精确量取 100  $\mu\text{L}$  样本通过冷冻干燥法或使用液氮迅速冻结, 磨成细粉状, 用甲醇和乙腈的混合液(体积比例为 1 : 1)进行混合后放置于超声波浴中持续震荡 30 min 后, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  的条件下用高速离心机 14 000 r/min 处理 10 min, 利用 0.22  $\mu\text{m}$  孔径的过滤膜进行过滤, 将得到的清液放入旋转蒸发器中, 保留干燥的样品供后续的液相色谱-串联质谱分析(LC-MS/MS)使用。

1.3.2 QC 制备 参照董春涛等<sup>[12]</sup>的方法, 稍有改动。从各个样本中提取 10  $\mu\text{L}$  稀释液, 将其混合以制备质量控制样本(QC样本)进行持续跟踪和监控分析, 确保实验过程中数据的一致性和可复制性。

1.3.3 色谱条件 参照 Cortada-Garcia<sup>[13]</sup>、魏梦媛<sup>[14]</sup>的方法, 稍有改动。使用 Acquity UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱(Waters Corporation, Milford, USA)进行液相色谱时, 采用两种流动相进行梯度洗脱。流动相 A 为含有 0.1% 甲酸的超纯水, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈。设置的梯度洗脱起始于 95% 的流动相 A, 持续 5 min, 随后在 10 min 内过渡至 40% A, 并在接下来的 5 min 内进一步减少至 5% A, 最后在 5 min 内恢复至 95% A 并对色谱柱进行平衡。设定流速为 0.4 mL/min, 色谱柱的温度控制在 40  $^{\circ}\text{C}$ , 每次注入 5  $\mu\text{L}$  的样品进行色谱分析。

1.3.4 质谱条件 使用 Q-Exactive Orbitrap 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)进行代谢物的精确检测<sup>[15-16]</sup>。离子源(ESI)参数设置: 喷雾电压 3.5 KV, 辅助气体温度 400  $^{\circ}\text{C}$ , 鞘气的流速为 52 Arb, 辅助气的流速为 14 Arb, 仪器扫描的质量范围 150 ~ 1 500  $m/z$ , 对每个检测周期内最高丰度的离子进行 5 次的 MS/MS 扫描。

#### 1.4 数据分析

代谢组学原始数据导入 Proteowizard V3.0.8789 软件进行数据预处理, 通过保留时间(RT)和  $m/z$  数据识别不同离子, 记录每个离子峰强度并最终输出分子量、保留时间(RT)、峰面积和鉴定结果等信息。利用 t 检验检测两组样本之间代谢物丰度

差异, 使用 FDR 对 p 值进行多次校正(Benjamini-Hochberg)。利用主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)对代谢物进行多变量分析, 得到每个代谢物的变量投影重要度值(VIP)。同时满足筛选条件 BenjaminiHochberg 校正  $p$ -value < 0.05、PLS-DA 变量投影重要度值(VIP) > 1、物质倍数比值 ratio  $\geq 2$  或者 ratio  $\leq 1/2$  的代谢物被认为是显著差异代谢物。采用 KEGG Mapper 对筛选出的显著差异代谢物进行代谢通路分析。所有实验均重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 实验质控

2.1.1 QC 相关性分析 在代谢组学的研究领域中, 使用质量控制样本(简称 QC 样本)不仅可以评估实验过程的稳定性以及仪器性能, 还可以确保实验的一致性和数据的可靠性。从高温发酵处理对苹果样品 QC 相关性分析(图1)可以看出, QC 样本 QC-1、QC-2、QC-3 的相关性分别为 0.96、0.96、0.97, 说明实验采取的质量控制措施非常有效, 保证了得到的数据真实可靠。

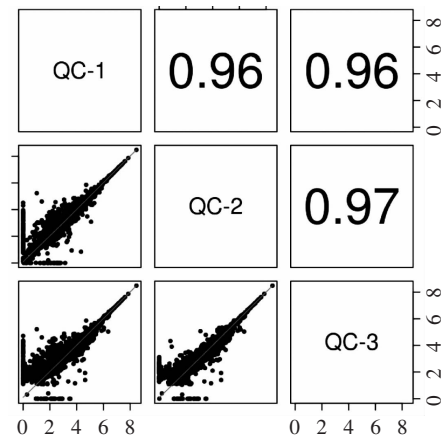


图1 苹果高温发酵过程中 QC 相关性分析

2.1.2 样本总体 PCA 分析 采用主成分分析(PCA)研究苹果在发酵周期不同阶段的代谢特征, 由高温发酵处理对苹果样本总体 PCA 分析(封三图2)可知, 苹果样本在 2 个主成分上共解释了 72.4% 的数据变异, 表明 PCA 技术能够有效揭示苹果在发酵过程中的主要代谢变化。特别是未添加乳酸菌的高温发酵(A 组)与乳酸菌高温发酵末期(D 组)的苹果之间分离度显著提高, 表明发酵过程中苹果的代谢特性发生了显著的变化。然而, 乳酸菌高温发酵前期(B 组)和中期(C 组)的样本虽然在

PCA 图上有区别,但这些区别比较微小。这可能表明在发酵的前中期阶段,苹果的代谢路径变化不够剧烈,或者变化程度还没有达到在 PCA 图上能够清晰区分的水平。用于质量控制(QC)的样本点聚集紧密,表明实验操作的一致性。

### 2.2 代谢物鉴定分析

通过代谢物鉴定分析可以了解苹果发酵过程中的生化反应和代谢途径的变化。从高温发酵处理对苹果样品的代谢物鉴定分析结果(封三图3)可以看出,在高温发酵条件下,苹果样本中检测到的代谢物种类高达 334 种,覆盖了苹果中众多的生物化学反应和代谢通道。在这些代谢物中,脂质和类脂物质占据了显著的比例,达到 44.61%,这些成分在苹果的氧化和水解等关键反应中起着中心作用。苯丙素和聚酮类占比 18.56%,主要包括黄酮和木质素等成分,对苹果的色泽和香气等感官品质有着重要影响。此外,有机含氧化合物和苯类化合物分别占 11.98%和 11.38%,这些物质在苹果的抗氧化防御和植物保护方面发挥着关键

作用。有机酸及其衍生物和杂环化合物均占比 5.99%,它们对于维持生物体内的酸碱平衡和促进代谢反应的顺利进行起着至关重要的作用。尽管生物碱、核苷及均相非金属化合物的比例较小,分别为 0.60%、0.30%,但它们在细胞内的信号传递和基因表达调控中扮演着关键角色。这些发现不仅在苹果的研究中具有重要价值,而且与枸杞、鳕鱼、桃红葡萄酒等其他食品体系中的研究结果类似<sup>[9, 17-18]</sup>,进一步证实了代谢物在多种食品加工和质量控制中的普遍性和重要性。代谢物的这些功能对于提升食品的风味特性和营养价值起着核心作用。

### 2.3 两两比较分析

2.3.1 正交偏最小二乘判别分析 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)作为一种有效的监督学习工具,在识别样本间差异及验证模型稳定性方面展现出了显著的优势。由高温发酵处理对苹果正交偏最小二乘判别分析(图4)可知,未添加乳酸菌的高温发酵苹果(A组)与乳酸菌发酵不同阶段的

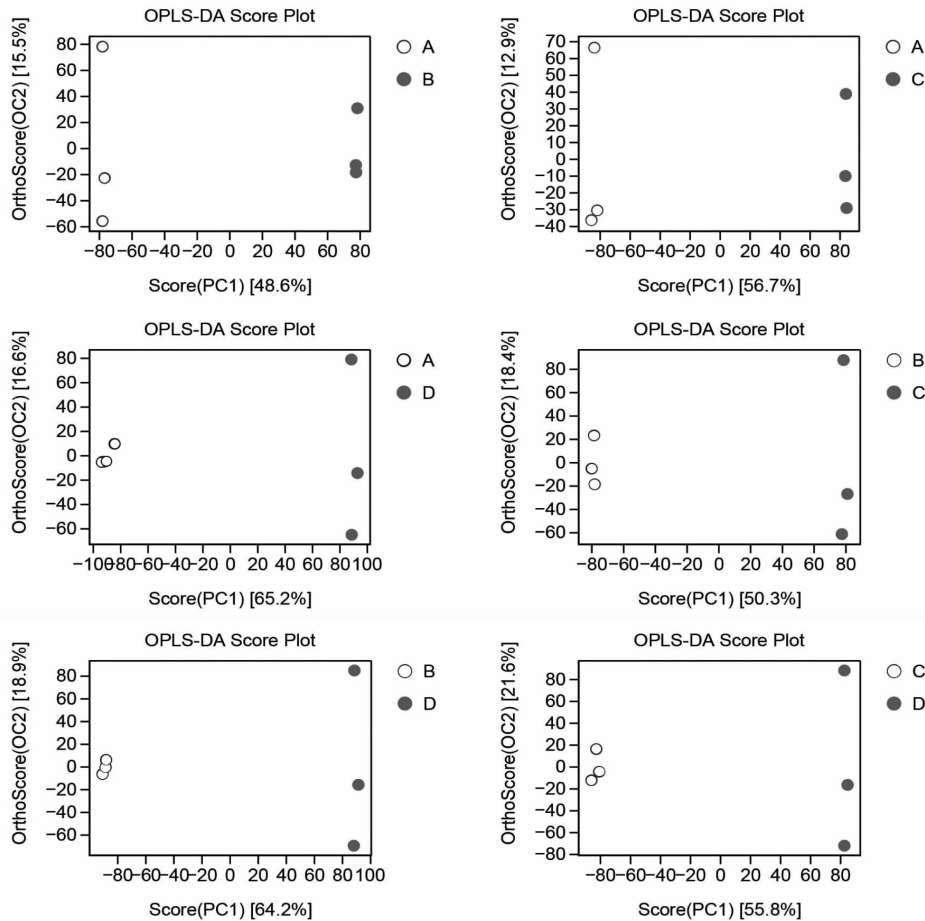


图 4 苹果高温发酵过程中 OPLS-DA 分析

苹果样本(B组、C组、D组)之间存在显著性差异( $P<0.05$ ), 表明了发酵过程对苹果样本的化学组成产生了显著影响。这些样本之间的差异贡献率则体现了发酵过程中化学成分变化程度, 其中A组与B组、C组、D组的差异贡献率分别是64.1%、69.6%、81.8%; 而从发酵前期(B组)到中期(C组), 再到发酵末期(D组)的差异贡献率分别增加至68.7%和77.4%, 尤其是在乳酸菌发酵末期的样本(D组)的差异贡献率达到83.1%, 表明在乳酸菌发酵的最后阶段, 苹果的化学成分变化最为剧烈。这一发现与其他食品如陈皮、石榴汁、黑糯米酒、牛奶等研究所得结果相似<sup>[10, 19-21]</sup>, 表明在食品发酵的末期可能形成了一些关键生物标志物, 这些标志物在评价样本的化学变异性中起了决定性的作用。

**2.3.2 差异物质筛选** 差异物质筛选作为一种强有力的可视化工具, 有效地揭示了不同样本间代谢物差异的数量。由高温发酵处理对苹果样品差异物质筛选分析(图5)可知, 苹果在不同发酵阶段存在显著的代谢物差异( $P<0.05$ )。特别是在未添加乳酸菌的高温发酵阶段(A组)与乳酸菌发酵前期阶段(B组)的转变期间, 有242种代谢物表现出显著变化。其中193种代谢物表达上调, 49种代谢物表达下调, 表明在发酵前期阶段, 代谢活动非常活跃, 新的代谢物产生很可能是微生物活动和酶促反应共同作用的结果。这一阶段对于苹果代谢途径的转换及其代谢物的多样性显得尤为关键。然而, 在苹果的发酵过程中, 从乳酸菌发酵前期阶段(B组)到中期阶段(C组)的转变, 发酵中的代谢物种类和数量并未出现明显的变化, 表明苹果在此发酵阶段的代谢系统展现了一定的稳定性。这可能是苹果适应持续高温环境的结果, 同时也反映了代谢物可能在此阶段继续累积。当进入到乳酸菌发酵的末期阶段(D组), 差异代谢物的总数减少至125种, 其中111种差异代谢物表达上调, 14种差异代谢物表达下调, 表明苹果在发酵的末期阶段的代谢活动开始趋于平稳, 代谢途径和代谢物的组成可能已经形成一种动态平衡。这一发现与咖啡、发酵糙米等研究的结果类似<sup>[22-23]</sup>, 表明食品的代谢稳定性及其累积可能与其处于高温发酵条件时的生理调整有着密切关系。

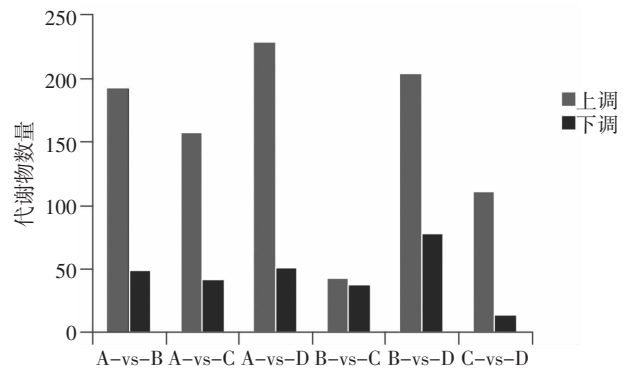
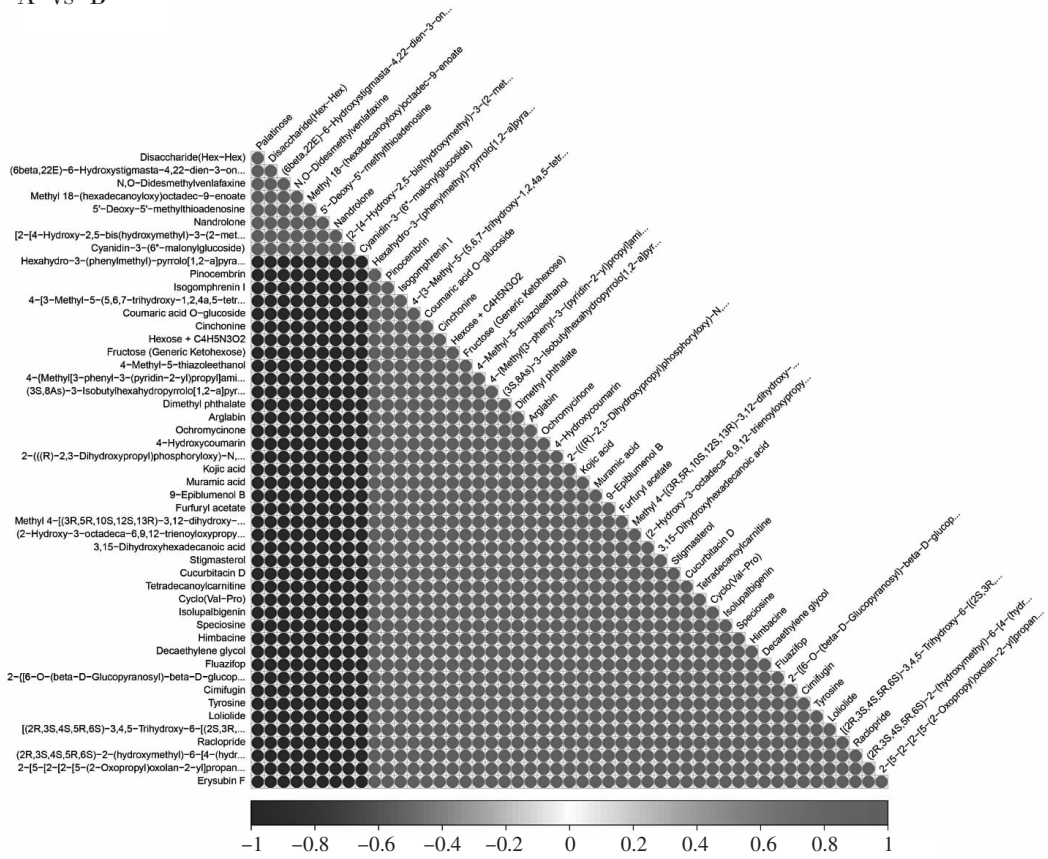


图5 苹果高温发酵过程中差异物质筛选

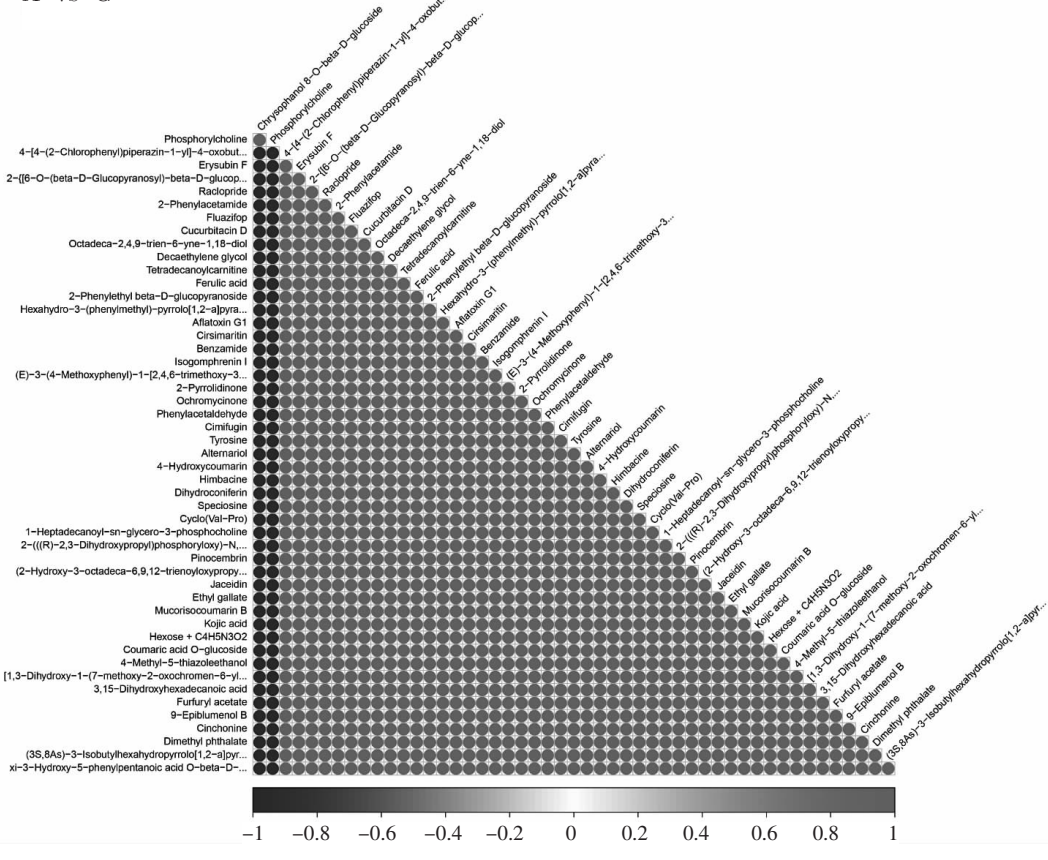
**2.3.3 差异物质聚类分析** 差异物质聚类分析是一种揭示发酵过程中关键代谢物和生物途径的重要工具。从高温发酵处理对苹果样品代谢物差异物质聚类分析(封三图6)可知, 苹果样本在未添加乳酸菌(A)以及添加乳酸菌发酵前期(B)、发酵中期(C)和发酵末期(D)的代谢物表达量变化显著( $P<0.05$ ), 颜色从蓝色渐变到红色, 形象地表现了随着发酵进程的推移, 代谢物表达量的显著变化。特别是在乳酸菌发酵末期(D), 样本普遍呈现出浓烈的红色, 表明这一阶段代谢活动的显著增强。此外, 聚类图中发现未添加乳酸菌发酵的苹果样本(A1、A2、A3)在聚类中分布紧密, 表明这些样本的代谢物组成具有较高的一致性和稳定性, 主要由基础代谢产物如糖和有机酸构成。乳酸菌发酵前期(B1、B2、B3)和中期样本(C1、C2、C3)也形成了清晰的集群, 表明代谢物在发酵过程中的动态变化, 可能与代谢活动的增强或降低有关。然而, 乳酸菌发酵末期样本(D1、D2、D3)展现了一个独立的分支, 表明在发酵的最后阶段, 苹果内部代谢物的组成变得更加多样化和稳定, 这与板苳研究结果类似<sup>[24]</sup>, 表明这些代谢物与可能对食品形成独特的发酵风味起到关键作用。此外, 图中的质量控制样本(QC)的集中分布进一步证实了实验操作和分析的高度一致性, 这对于确保研究结果的准确性和可靠性至关重要。

**2.3.4 差异物质相关性分析** 在研究苹果发酵过程中代谢物关系的趋势图中, 用灰色表示正相关性, 即代谢物之间的协同作用; 用黑色表示负相关性, 反映了代谢物之间的抑制作用。由高温发酵苹果的差异物质相关性分析(图7)可知, 随着苹果从未添加乳酸菌发酵状态到乳酸菌发酵各阶段

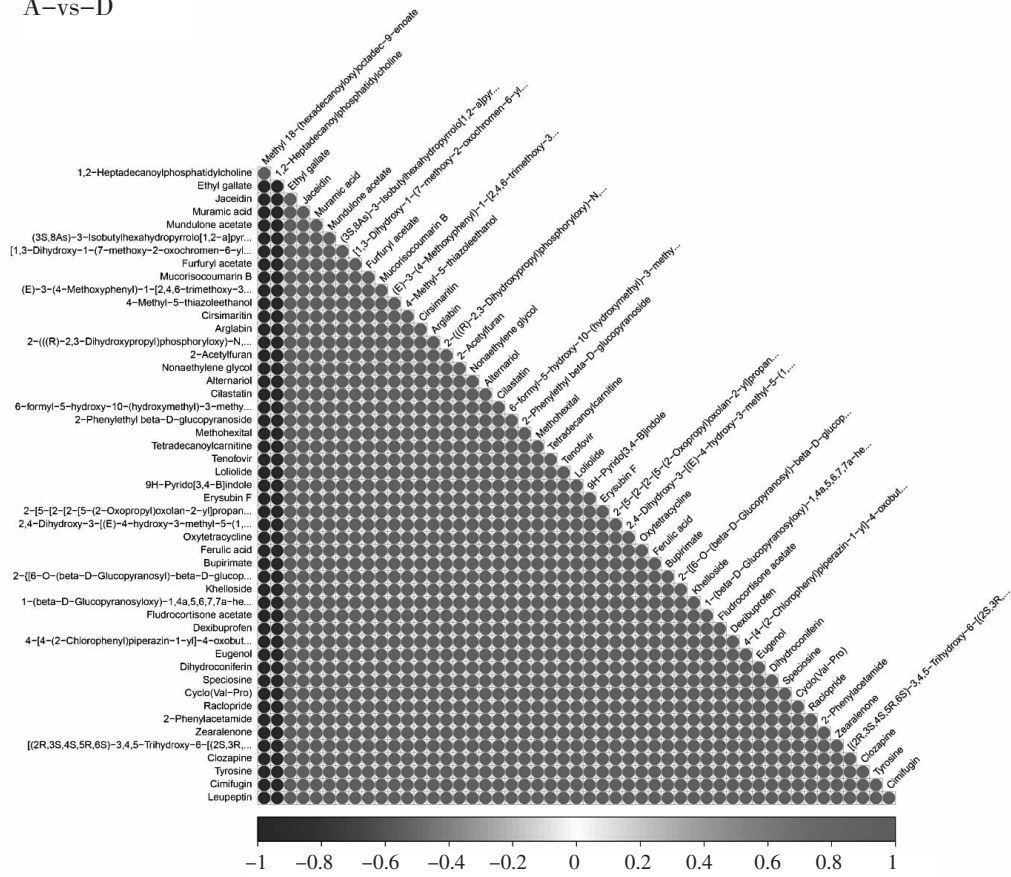
A-vs-B



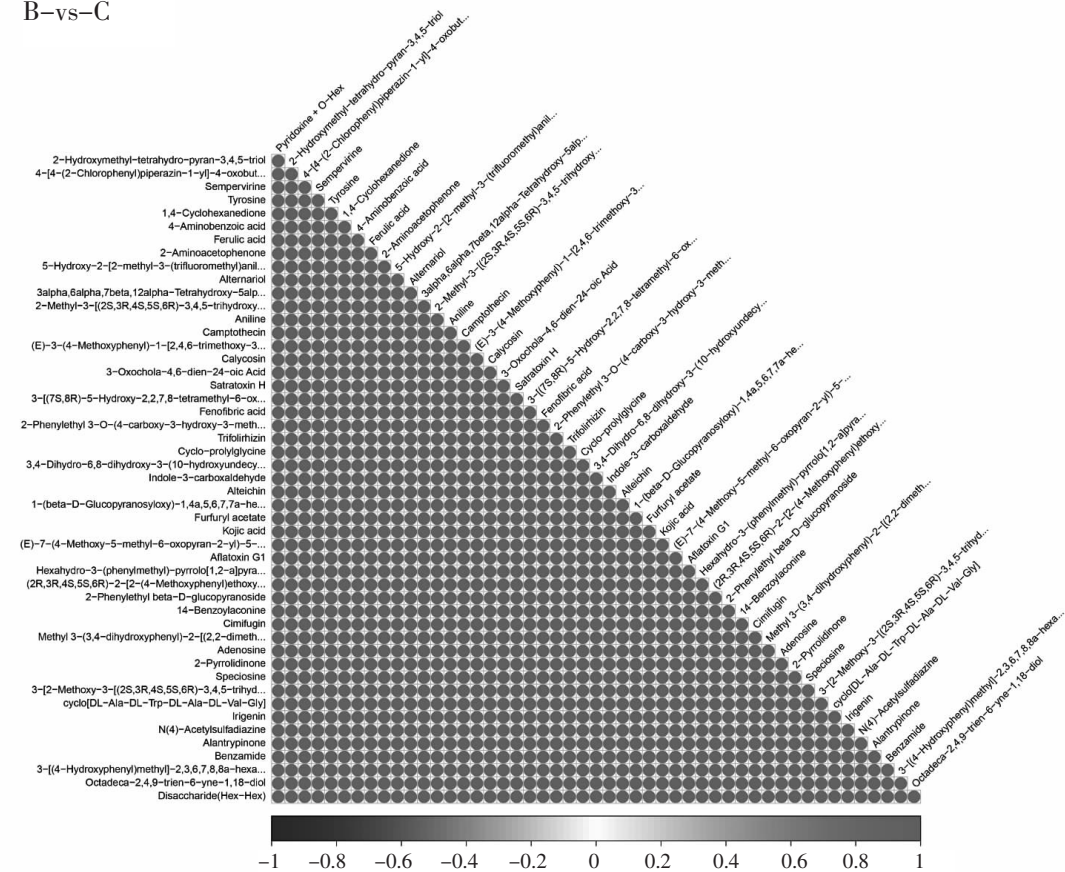
A-vs-C



续图 A-vs-D



B-vs-C



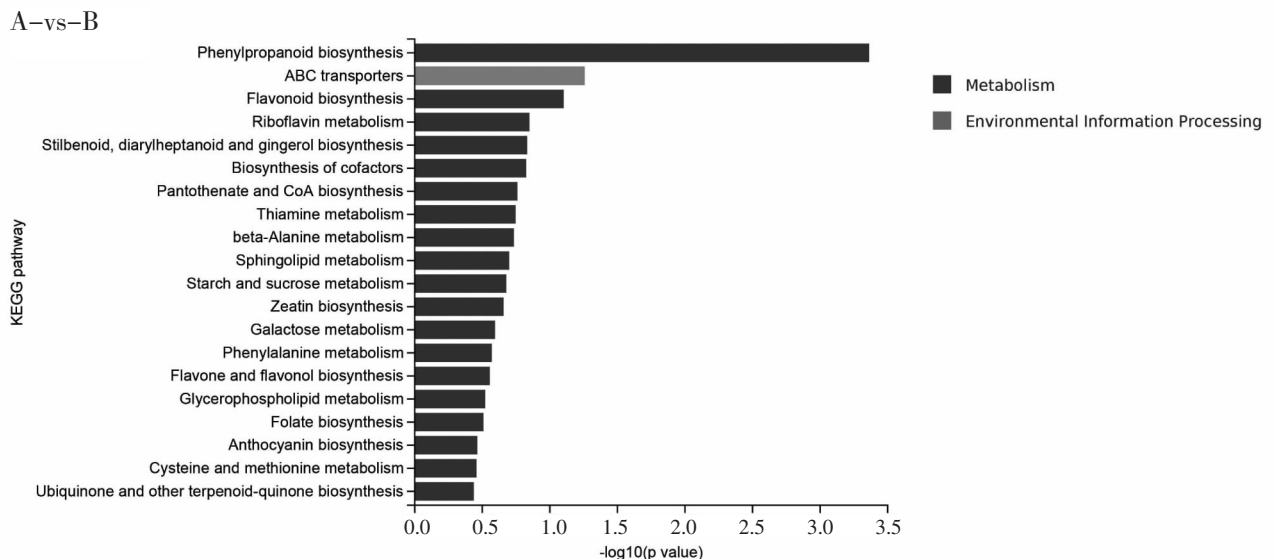




的转变, 代谢物间的相互作用也发生了显著变化 ( $P < 0.05$ )。从未添加乳酸菌发酵状态到乳酸菌发酵的早期阶段 (A-vs-B), 观察到多个代谢物间的正相关性显著增强, 表明在发酵前期, 新的代谢途径被激活, 代谢活动开始加速。随着乳酸菌发酵进入中期 (A-vs-C) 和末期 (A-vs-D) 时, 这种正相关性进一步加强, 达到顶峰, 这可能与苹果对高温环境的响应以及代谢物的调整有关, 反映了代谢过程中对环境变化的适应性。然而, 随着发酵过程的延长, 负相关性有所减少, 这可能与某些代谢通路的阻断或者代谢物积累相关。从乳酸菌发酵前期到中期 (B-vs-C), 代谢物间的协作持续增强, 而竞争关系逐步消退, 显示了代谢过程从竞争性向合作性转变, 表明代谢网络在自我优化以提高效率。当从乳酸菌发酵前期到末期 (B-vs-D), 虽然正相关性有所下降, 负相关性可能略有上升。最终从乳酸菌发酵中期到末期 (C-vs-D), 代谢物间的正负相关性趋于平稳, 表明代谢路径已经成熟, 代谢活动达到了一种稳定状态, 这与脱水苹果的研究结果类似<sup>[26]</sup>, 显示了代谢过程在长期发酵中的稳定性。此外, 研究中还识别出了一些在整个发酵过程中普遍存在的代谢物, 如糠醇乙酸酯、草蒿素以及酪氨酸等, 它们可能对苹果发酵产品的整体品质有重要贡献。同时, 也发现了一些特定阶段特有的代谢物, 例如 1, 2-十七烷酰磷脂酰胆碱在乳酸菌发酵末期 (A-vs-D) 阶段特有; 而 4-羟基香豆素和 6-羟基麦角甾-4, 22-二烯-3-

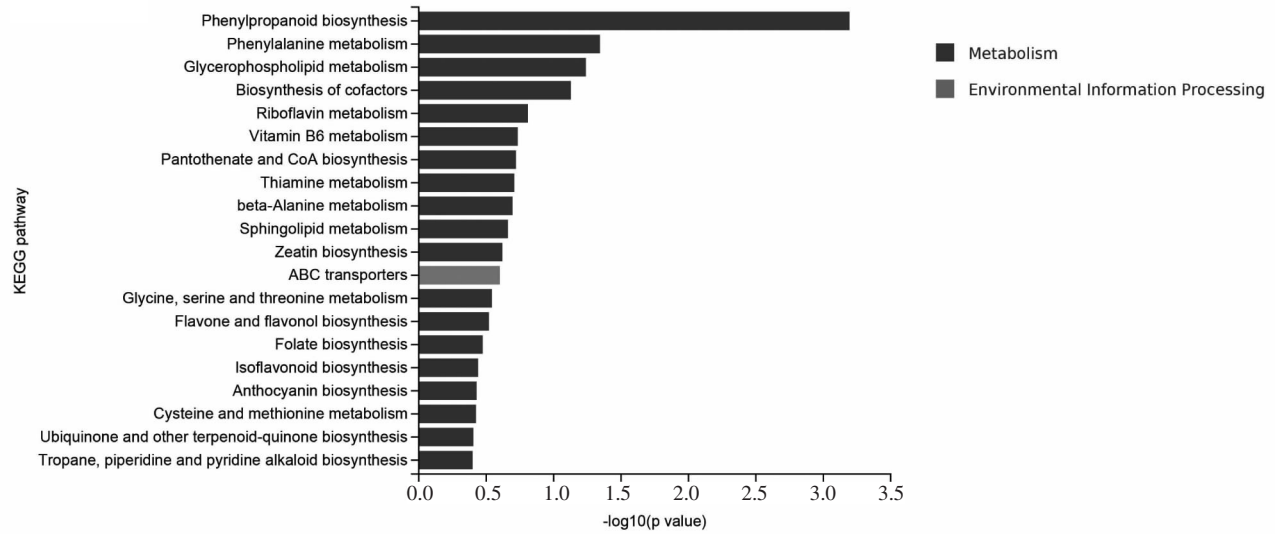
酮分别在乳酸菌发酵中期到末期 (C-vs-D) 和乳酸菌发酵的早期 (A-vs-B) 阶段特有; 红藻素 F 的出现则在乳酸菌发酵的早期 (A-vs-B) 和乳酸菌发酵进入中期 (A-vs-C) 阶段, 这可能暗示了这些代谢物在特定发酵阶段的生物学功能和重要性。

2.3.5 差异代谢物富集 通过全面分析苹果在不同发酵阶段的 KEGG 代谢路径, 揭示苹果在发酵过程中显著的代谢适应性和变化规律。由高温发酵苹果的差异代谢物富集分析 (图 8) 可知, 在整个发酵过程中, 苹果通过激活或抑制特定的生物合成和代谢通路来应对环境的变化, 尤其对高温环境的适应和特殊风味的形成起到了关键作用。特别是苯丙素的合成路径在发酵过程的多个阶段都表现出高活性, 说明它对苹果的适应性至关重要。这一路径不仅助于苹果抵抗高温压力, 还直接贡献于其风味和香气的形成。另一方面, 苯丙氨酸的代谢涉及生成多种生物活性分子, 进而促进苹果风味的形成。在发酵的不同阶段, 还有其他几个关键路径显示出活性变化。例如, 代谢过程中甘油磷脂和辅酶的生物合成路径保持活跃, 这对于维护细胞结构的稳定性和基本的代谢功能至关重要。此外, 环境信息处理机制也显示了苹果能够感知并响应发酵过程中的环境变化。和未添加乳酸菌的苹果相比, 乳酸菌发酵过程中特定的代谢路径如玉米素生物合成在发酵前期 (A-vs-B) 和中期阶段 (A-vs-C) 得到了激活, 这可能与其在苹果适应高温环境紧密相关。同样, 鞘脂代谢路径

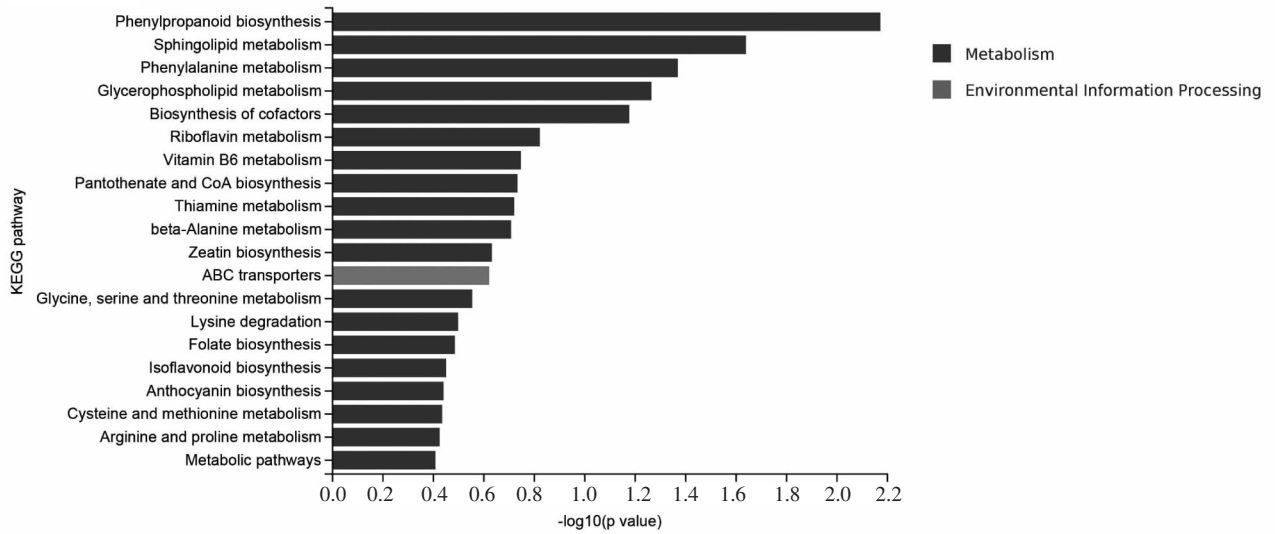


续图

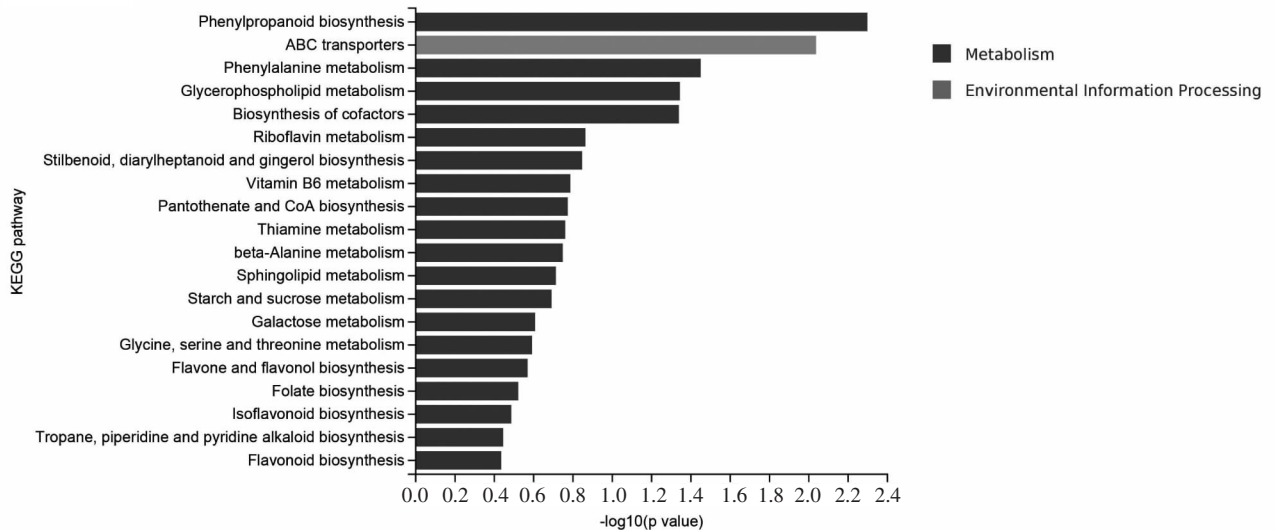
A-vs-C



A-vs-D



B-vs-C



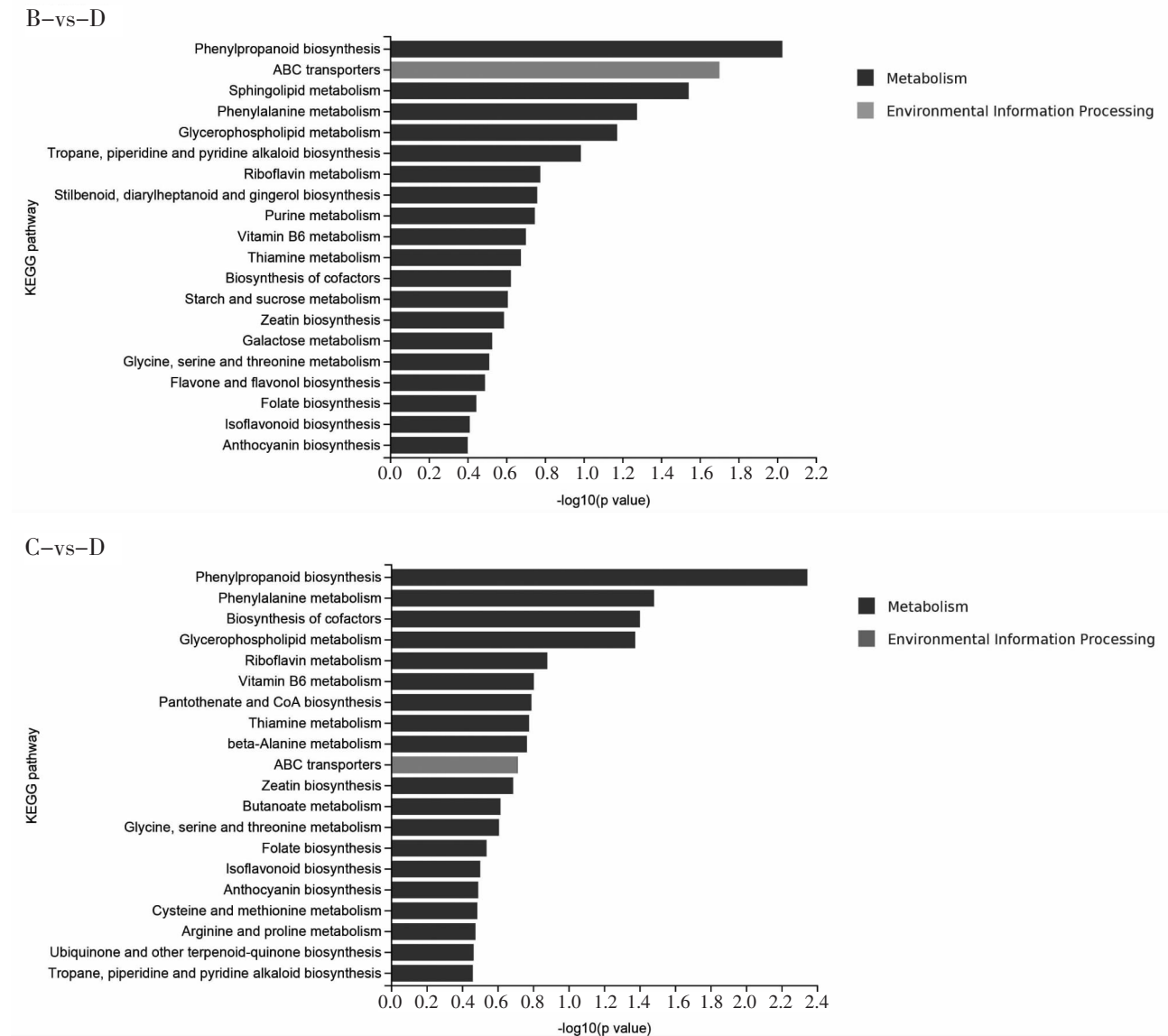


图 8 苹果高温发酵过程中差异代谢物富集

在乳酸菌发酵的末期阶段(A-vs-D)特别活跃,表明它在细胞信号传递中可能发挥重要作用。在经过乳酸菌发酵前期转变到中期阶段(B-vs-C)时,特定的抗氧化化合物如芪类和二苯庚烷类的活性表现出明显增强,表明这些成分可能在苹果的防御体系中具有重要的保护功能。同时,嘌呤代谢路径在乳酸菌发酵前期转变到末期阶段(B-vs-D)得到显著提升,这关系到嘌呤类物质的生产与分解,推测与DNA的合成和能量转换过程紧密相关。此外,丁酸代谢在乳酸菌发酵中期转变到发酵末期阶段(C-vs-D)也有明显上升,这可能与DNA合成及细胞内信号的传递机制关联。这些发现与其他发酵食品如发酵茶、发酵红豆、刺梨汁、苹

果渣等的研究结果相似<sup>[26-29]</sup>,反映了某些代谢路径在多种发酵食品间的一致特征,表明食品在不同生长环境中的适应性以及风味的多样性。

### 3 结论与讨论

为揭示发酵对苹果品质影响的内在机制,为苹果功能成分及代谢调控机制提供科学依据,本研究通过非靶向代谢组学技术,对高温高湿条件下未添加乳酸菌的发酵苹果(对照组)以及添加乳酸菌的发酵前期(1~30 d)、中期(30~60 d)和末期(60~90 d)的苹果样本在发酵过程产生的各类差异代谢化合物进行了深入的代谢途径分析,通过精确的实验设计与严格的质量监控,保障了分析结果的准确性。利用主成分分析(PCA),揭示了苹

果在不同发酵阶段的代谢活动存在显著差异。通过代谢物的鉴定,发现在整个高温高湿发酵过程中,共识别出 334 种代谢物,其中脂质和类脂分子所占比例最大,占比高达 44.61%。采用聚类热图和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)更进一步有效地区分了不同发酵阶段的苹果样本和不同发酵阶段间的显著代谢差异,特别是在乳酸菌发酵的末期阶段苹果样本的代谢物水平明显高于未发酵样本。通过 KEGG 代谢途径分析发现,苯丙素的生物合成和苯丙氨酸的代谢在苹果的整个发酵过程中非常活跃,并且在高温条件下激活了玉米素生物合成和鞘脂代谢的特定途径,推测与苹果适应高温环境以及最终产品的风味形成密切相关。特别指出,高温发酵有助于激活特定的代谢途径,如玉米素的生物合成及鞘脂的代谢,这可能与发酵过程中的高温应激响应有关,这对苹果的高温适应性和风味的形成具有重要影响。本研究不仅拓展了对苹果在高温发酵过程中的代谢变化的理解,还提供了通过代谢工程优化苹果发酵产品品质和功能的理论依据。未来的研究将可能深入探讨脂质代谢在苹果发酵中的角色,以及如何通过调节这些关键代谢途径以提升苹果发酵产品的风味和营养价值。

#### 参考文献:

- [1] ZHONG P, WEI X Q, LI X M, et al. Untargeted metabolomics by liquid chromatography-mass spectrometry for food authentication: A review [J]. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 2022, 21(3): 2455-2488.
- [2] 田慧勇, 李晓娜, 杨宇燕, 等. 现代分析技术在食品添加剂检测中的应用[J]. *食品界*, 2023(7): 67-69.
- [3] LI R T, ZHANG Z G, SU X X, et al. Nontargeted metabolomics study and pharmacodynamic evaluation of bidirectional fermentation for *Ganoderma lucidum* with *Marsdenia tenacissima* [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 1012063.
- [4] 陈帅博. 5-羟甲基糠醛液相催化氧化反应过程研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- [5] AN T T, CHEN M X, ZU Z Q, et al. Untargeted and targeted metabolomics reveal changes in the chemical constituents of instant dark tea during liquid-state fermentation by *Eurotium cristatum* [J]. *Food Research International*, 2021, 148: 110623-110657.
- [6] WANG J H, LI F J, ZHANG X Y, et al. Combined transcriptomic and targeted metabolomic analysis reveals the mechanism of flesh browning in cold stored 'Fuji' apple fruit [J]. *Scientia Horticulturae*, 2023, 320: 112195.
- [7] SALAZAR-ORBEA G, GARCÍA-VILLALBA R, SÁNCHEZ-SILES L M, et al. Untargeted Metabolomics Reveals New Markers of Food Processing for Strawberry and Apple Purees [J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7275.
- [8] MARKKINEN N, PARIYANI R, JOKIOJA J, et al. NMR-based metabolomics approach on optimization of malolactic fermentation of sea buckthorn juice with *Lactiplan-tibacillus plantarum* [J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130630.
- [9] 彭玉娇, 崔学宇, 邵元元, 等. 利用 LC-MS 技术解析黑果枸杞、红果枸杞代谢物的差异[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(9): 56-63.
- [10] 陈云丽, 颜仁梁, 卢雪花, 等. 基于广泛靶向代谢组学技术分析陈化 7 至 11 年广陈皮化学成分的差异 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(21): 1-9.
- [11] 周春娜, 陈磊, 卞艳芳, 等. 墨旱莲代谢产物的 GC-MS 分析 [J]. *药学服务与研究*, 2019, 19(3): 205-209.
- [12] 董春涛, 魏棒棒, 曹怿玮, 等. 基于非靶向代谢组学的促乳腺癌曲妥珠单抗耐药代谢产物分析 [J]. *药学与临床研究*, 2022, 30(5): 385-390; 464.
- [13] CORTADA-GARCIA J, HAGGARTY J, MOSES T, et al. On-line untargeted metabolomics monitoring of an *Escherichia coli* succinate fermentation process [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2022, 119(10): 2757-2769.
- [14] 魏梦媛. 鲜食葡萄疏除幼果营养分析及应用探究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [15] WANG R H, YIN Y D, ZHU Z J. Advancing untargeted metabolomics using data-independent acquisition mass spectrometry technology [J]. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411: 4349-4357.
- [16] 瞿岩俨, 杨子嘉, 李军, 等. 人工采摘和管理对普洱茶化学成分的影响分析 [J]. *食品科学*, 2022, 43(24): 287-295.
- [17] WANG Y Q, NIE S, LI C S, et al. Application of untargeted metabolomics to reveal the taste-related metabolite profiles during mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) fermentation [J]. *Foods*, 2022, 1(7): 944.
- [18] LEBORGNE C, MEUDEC E, SOMMERER N, et al. Untargeted Metabolomics Approach Using UHPLC-HRMS to Unravel the Impact of Fermentation on Color and Phe-

- nolic Composition of Rosé Wines[J]. *Molecules*, 2023, 28(15): 5748.
- [19] 卢 聪. 石榴汁特征呈香物质解析与异味形成机制研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2021.
- [20] 姜 丽. 黑糯米酒发酵过程中微生物多样性及风味品质研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- [21] HUANG P, YU L L, TIAN F W, et al. Untargeted metabolomics revealed the key metabolites in milk fermented with starter cultures containing *Lactobacillus plantarum* CCFM8610[J]. *LWT*, 2022, 165: 113768.
- [22] CHAN M Z A, LAU H, LIM S Y, et al. Untargeted LC-QTOF-MS/MS based metabolomics approach for revealing bioactive components in probiotic fermented coffee brews[J]. *Food Research International*, 2021, 149: 110656.
- [23] BARATHIKANNAN K, CHELLIAH R, VINOTHKANNA A, et al. Untargeted metabolomics-based network pharmacology reveals fermented brown rice towards anti-obesity efficacy[J]. *Npj Science of Food*, 2024, 8(1): 1-12.
- [24] 张 艳, 刘雪松, 薛沾枚, 等. 基于 LC-MS/MS 分析板芪清肺组方发酵代谢差异[J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(10): 4243-4251.
- [25] SAMMARCO G, CHIARA D A, MICHELE S. Untargeted metabolomics liquid chromatography-high resolution mass spectrometry approach for the geographical origin assessment of Italian dehydrated apples[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2023, 58(10): 4954.
- [26] ZENG Z X, JIN S, XIANG X L, et al. Dynamical changes of tea metabolites fermented by *Aspergillus cristatus*, *Aspergillus neoniger* and mixed fungi: A temporal clustering strategy for untargeted metabolomics[J]. *Food Research International*, 2023, 170: 112992.
- [27] SHAN L Y, TYAGI A, CHEN X Q, et al. Potential anti-obesity effect of fermented adzuki beans and their untargeted metabolomics using UHPLC-QTOF-MS[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52: 102380.
- [28] XU F Y, ZHU Y P, LU M T, et al. Exploring the mechanism of browning of *Rosa roxburghii* juice based on nontargeted metabolomics[J]. *Journal of Food Science*, 2023, 88(5): 1835-1848.
- [29] AYYASH M, TARIQUE M, ALARYANI M, et al. Bioactive properties and untargeted metabolomics analysis of bioaccessible fractions of non-fermented and fermented date fruit pomace by novel yeast isolates [J]. *Food Chemistry*, 2022, 396: 133666.