小叶苦丁枝条提取物的植物乳杆菌发酵代谢组分析

吴雨炯[1,2,3]，周礼红[*1,2,3]，方月月[1,2,3]，解文利[4]，白 雪[1,2,3]

（1. 贵州大学 生命科学学院，贵州 贵阳 550025；2. 贵州大学 农业生物工程研究院，贵州 贵阳 550025；3. 贵州大学 山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室，贵州 贵阳 550025；4. 贵州泰和现代生态农业科技有限公司，贵州 遵义 564400）

摘要：小叶苦丁枝条是小叶苦丁茶生产过程中的废弃物，数量巨大，一般以焚烧的方式处理，造成了不可忽视的环境污染和资源浪费。为实现小叶苦丁枝条资源化利用，作者以益生菌植物乳杆菌对小叶苦丁枝条水提物进行发酵，用 LC-MS 非靶向代谢组方法研究了小叶苦丁枝条提取物发酵前后物质的构成、分布与变化。通过 PCA、PLS-DA 等多元统计方法分析发现，小叶苦丁枝条提取物经植物乳杆菌发酵前后存在显著差异的代谢物共 175 种，其中发酵后上调的 100 种，下调的 75 种。单变量统计排名前 25 的差异代谢物中包含肽类 3 种，碳水化合物 1 种，核酸类 4 种，脂类 1 种，有机酸 1 种，黄酮 1 种，其他 14 种，这些差异代谢物涉及 11 条差异显著的代谢途径，其中 6 条为氨基酸代谢途径。差异代谢物中，发酵后相对含量提高 915 倍的川皮苷、提高 11 倍的鹅肌肽等具有抗氧化、抗炎、抗癌、降血糖等生理活性。同时抗生素庆大霉素 C1a、林卡霉素发酵后分别提升 22 672 倍和 62 倍，表明采用乳酸菌发酵技术资源化利用小叶苦丁枝条具有一定的可行性，但还需进一步的安全评估。

关键词：小叶苦丁；枝条；植物乳杆菌；发酵；非靶向代谢组

中图分类号：TQ 920.1　**文章编号**：1673-1689(2023)06-0104-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.06.013

Analysis of Extracts of *Ligustrum robustum* (Rxob.) Blume Twigs Fermented by *Lactobacillus plantarum* Based on Metabolomics

WU Yutong[1,2,3]，*ZHOU Lihong*[*1,2,3]，*FANG Yueyue*[1,2,3]，*XIE Wenli*[4]，*BAI Xue*[1,2,3]

(1. College of Life Sciences, Guizhou University, Guizhou 550025, China; 2. Institute of Agrobioengineering, Guizhou University, Guizhou 550025, China; 3. Key laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region, Ministry of Education, Guizhou University, Guizhou 550025, China; 4. Guizhou Taihe Modern Ecological Agriculture Technology Co., Ltd, Guizhou 564400, China)

Abstract: The twigs of *Ligustrum robustum* (Rxob.) Blume are the waste generated during the production of small leaf Kuding tea. The large quantity of waste is typically incinerated, resulting in significant environmental pollution and resource waste. To promote the resource utilization of the twigs of *Ligustrum robustum* (Rxob.) Blume, *Lactobacillus plantarum* was used to ferment its water extract, and then the composition, distribution and changes of the substances before and after the fermentation were detected by LC-MS non-targeted metabolomics technology. Multivariate statistical analysis methods including PCA and PLS-DA identified 175 different metabolites that demonstrated

收稿日期：2021-08-30

* **通信作者**：周礼红(1975—)，女，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事微生物发酵及肠道微生物方面的研究。E-mail：564755876@qq.com

significant changes in metabolites before and after the fermentation of *Ligustrum robustum* (Rxob.) Blume twigs extracts, with 100 up-regulated and 75 down-regulated. The top 25 differential metabolites in univariate statistics included 3 peptides, 1 carbohydrate, 4 nucleic acids, 1 lipid, 1 organic acid, 1 flavonoid, and 14 other metabolites, involving 11 significantly different metabolic pathways, of which 6 were amino acids metabolic pathways. The differential metabolites included 915-fold increased Nobiletin and 11-fold enhanced Anserine, both of which have physiological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, and hypoglycemic effects. Meanwhile, the content of antibiotics Gentamicin. C1a and Lincomycin after fermentation were increased by 22 000 times and 66 times, respectively. The results demonstrate that *Lactobacillus plantarum* fermentation technology for the resource utilization of *Ligustrum robustum* (Rxob.) Blume twigs is feasible, but further safety assessment is required.

Keywords: *Ligustrum robustum* (Rxob.) Blume, twigs, *Lactobacillus plantarum*, fermentation, non-targeted metabolomics

我国拥有悠久的别样茶饮用历史,其中小叶苦丁最早载于《贵州民间方药集》[1],由于其含咖啡因较少,口感层次丰富,饮后不影响睡眠,能清热解毒,在夏季颇受人们喜爱。小叶苦丁为木樨科植物,包括粗壮女贞、丽叶女贞、日本毛女贞等属,本研究中贵州小叶苦丁属粗壮女贞,在中国、孟加拉国、柬埔寨、越南诸国均有分布。其在我国分布颇广,主要在海拔 400~2 000 m,分布地区主要有贵州、云南、四川、安徽南部等[2],其中贵州余庆县及四川筠连县产业规模较大。

小叶苦丁茶中黄酮、多酚、苯乙醇苷类等生物活性成分在各项研究中表现出优异的药理作用。氧化应激是衰老和许多疾病的诱因,会给细胞造成难以修复的损伤,而小叶苦丁茶在体外抗氧化模型和动物模型中效果显著[3]。在 Caco-2 细胞肠道模型中能有效保护细胞免受 H_2O_2 诱导的氧化应激损伤[4],调节肠道微生态,增强肠道屏障抵御能力,减轻肠道炎症[5-6],而肠道微生态又通过脑肠轴与肥胖症、糖尿病、心血管疾病等代谢失调类疾病相关联。研究还发现,小叶苦丁茶能降低血糖浓度和预防高血压[7]、降低血脂[8]和改善肥胖人群心血管疾病的相关指标[9]、抑菌抗炎和抗肿瘤活性[10],可作为功能性食品开发的原料、天然的食品添加剂和药用成分的提取原料。

贵州省余庆县小叶苦丁茶量大质优,深受市场青睐,远销日、法、东南亚,被称为“中国小叶苦丁之乡”。2020 年,贵州省余庆县小叶苦丁茶投产 8.4 万亩,销售产值超过 5 亿元,市场需求量超过 6 500 t,在全国 37 个中大城市开设了 300 余个销售网点[11]。采茶后剩余的大量枝条一般作为废料焚烧,环境不友好的同时还忽略了其可能存在的食用或者药用价值。

我们前期研究发现,小叶苦丁枝条在体外抗氧化模型中表现优异,而抗氧化性与多种生理活性相关联,表明小叶苦丁枝条中存在多种生理活性成分,且小叶苦丁枝条活性成分水提率较为理想,同时提取后残渣可用于有机肥生产。乳酸发酵可以提高基质的生理活性和功能特性,作者所在实验室已经建立了植物乳杆菌发酵提取物的工艺,故采用植物乳杆菌对小叶苦丁枝条提取物进行发酵,通过 LC-MS、NRM 非靶向代谢组了解其发酵前后物质构成和分布。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂 菌种:*Lactobacillus plantarum* LP-15,专利号 ZL 2016 1 0278159;小叶苦丁 *Ligustrum robustum*(Rxob.) Blume 枝条:取自贵州省遵义市余庆县,北纬 27°16′29″,东经 107°48′19″;甲醇、乙腈:纯度≥99.9%,Thermo 公司;2-氯苯丙氨酸:纯度 98.5%,Aladdin 公司;甲酸:LC-MS 级,TCI 公司;甲酸铵:纯度≥99.9%,Sigma 公司;H_2O:Milli-Q 公司。

1.1.2 仪器与设备 离心机 H1850-R:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;混匀仪 QL-866:上海巴玖实业有限公司;真空浓缩仪 5305:艾本德股份有限公司;滤膜 0.22 μm PTFE:天津市津腾实验设备有

限公司;液相色谱仪 UltiMate 3000:赛默飞世尔科技公司;质谱仪 Q Exactive Focus:赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

1.2.1 发酵样品制备 枝条前处理:余庆县的小叶苦丁枝条洗净,切成约 2 cm 长小段后烘干至恒质量待用。

枝条水提物制备:称取 200 g 枝条置于 1 000 mL 蒸馏水中煮沸 20 min,过滤,补齐蒸发水分至 1 000 mL,即得小叶苦丁枝条提取物。提取物用 100 mL 锥形瓶分装,装样量为 70 mL,在 110 ℃下灭菌 10 min,取发酵前样品,编号 LS1、LS2、LS3、LS4、LS5、LS6,记为 GPLS1 组。

枝条水提物发酵方法:取作者所在实验室保藏菌种植物乳杆菌 LP-15,在斜面上活化 2 次后用无菌水冲洗,调整菌悬液 OD_{600} 值为 0.700±0.002,以 10%的接种体积分数接种于 MRS 液体培养基中,37 ℃培养 24 h。该种子液以 5%的接种体积分数接入上述灭菌提取液中,37 ℃下培养 24 h,取发酵后样品,编号 FLS1、FLS2、FLS3、FLS4、FLS5、FLS6,记为 GPLS2 组。

1.2.2 代谢组检测样本制备 上述样品分别取 100 μL 加入 400 μL 甲醇中,振荡混匀 60 s,4 ℃下于 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行真空浓缩。所得样品加入 120 μL 的 2-氯苯氨酸 (4 μg/g)80%甲醇溶液复溶,经 0.22 μm 膜过滤后进行代谢组检测。

每个待测样本各取 20 μL 混合成质量控制(Quality Control,QC)样本,用于跟踪校正信号漂移的情况,分别在数据采集过程中的开始、过程中和结束时插入 QC 样本。

色谱条件:采用 ACQUITY HUPLC® HSS T3 1.8 μm(2.1 mm×150 mm)色谱柱,自动进样温度为 8 ℃,流量 0.25 mL/min,柱温 40 ℃,进样量 2 μL,流动相正离子为 0.1 g/dL 甲酸水和 0.1 g/dL 甲酸乙腈,负离子为 5 mmol/L 甲酸铵水和乙腈。

质谱条件:电喷雾离子源电压分别为正离子喷雾电压 3.5 kV,负离子喷雾电压 2.5 kV,鞘气 5.25 MPa,辅助气 1.75 MPa。毛细管温度 325 ℃,以分辨率 70 000 进行全扫描,扫描范围 81~1 000,并采用 HCD 进行二级裂解,碰撞电压为 30 eV,同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息。

1.2.3 数据处理 使用 Proteowizard 软件将检测到的原始数据转换成 mzXML 格式后,通过 R 语言的 XCMS 程序包进行峰识别、峰过滤、峰对齐,得到包括质核比和保留时间及峰面积等信息的数据矩阵;进而得到正负离子模式下的前体分子,导出数据至 excel,使用 R 语言 MetaboanalystR 程序包 3.0 版进行主成分分析、偏最小二乘法判别分析等多元统计分析。

表 1 洗脱程序

Table 1 Elution procedure

洗脱时间/min	正离子(0.1 g/dL 甲酸乙腈)体积分数	负离子(乙腈)体积分数
0~1.0	2%	2%
1.0~9.0	2%~50%	2%~50%
9.0~12.0	50%~98%	50%~98%
12.0~13.5	98%	98%
13.5~14.0	98%~2%	98%~2%
14.0~17.0	—	2%
14.0~20.0	2%	—

2 结果与分析

2.1 质量控制

QC 样本用于跟踪和校正数据采集过程中产生的信号漂移,如图 1~2 所示,在正负离子模式下 QC 样本均包含于 95%置信区间内,聚集良好,说明检测方法稳定,数据可靠。

2.1 主成分分析

通过主成分分析(Principal Component Analysis, PCA),样本自然聚集成明显分离的 2 组,即发酵前样本组与发酵后样本组,与研究者的人为分组吻合。样本均被包含在 95%的置信区间内,不存在离群值,在 66.7%的概率上解释了小叶苦丁枝条提取物在植物乳杆菌发酵前后物质变化上存在的差异。

2.2 偏最小二乘法判别分析

PCA 适用于组间差异大的情况,当组间差异较小时,用偏最小二乘法判别分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis,PLS-DA)补充分析,可以更好地确定样本关系。GPLS1 和 GPLS2 样品均包含于 95%置信区间内,无离群值,两组点云明显分离,说明发酵前后代谢物有显著差异,Compnent1 能在 54.7%的概率上解释 GPLS1 和GPLS2 的组间差

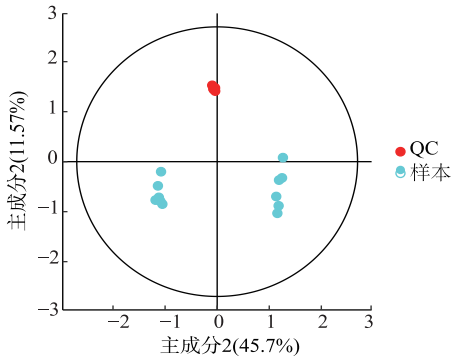


图 1　正离子模式 QC 样本 PCA 得分

Fig. 1　PCA score of QC sample in positive ion mode

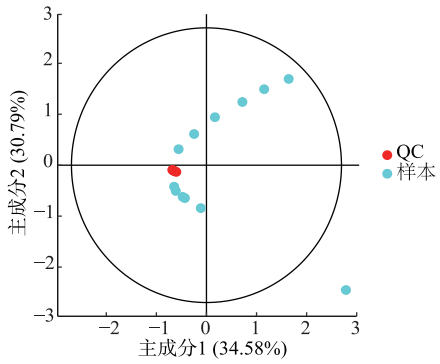


图 2　负离子模式 QC 样本 PCA 得分

Fig. 2　PCA score of QC sample in negative ion mode

异,Compnent1 和 Compnent2 累计贡献率为 61.3%,见图 3。用置换检验 n=100 来判断 PLS-DA 模型的区分效果,结果见图 4。观测检验统计量在随机分布右侧,说明对 GPLS1 和 GPLS2 的判别结果并不完全由随机导致。P>0.05,说明模型判别效果不显著,有必要进行正交偏最小二乘法判别分析减少噪音干扰,见图 5。

2.3　正交偏最小二乘法判别分析

与 PLS-DA 结果一致,GPLS1 和 GPLS2 所有样本点均被包含于 95%的置信区间内,无离群点,2 组点云明显分离,在 61.3%的概率上可以解释 2 组代谢物变化上的差异。交叉检验 R^2Y=0.995,Q^2=0.983,均接近于 1,说明模型稳定可靠。对正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal Partial Least Squares Discrimination Analysis,OPLS-DA)模型进行频次 100 次的置换检验,结果见图 6~7。观测检验统计量位于随机分布右尾后,且 P<0.05,说明 OPLS-DA 模型能够有效判别不同分组,小叶苦丁枝条发酵前后存在差异显著的代谢物。

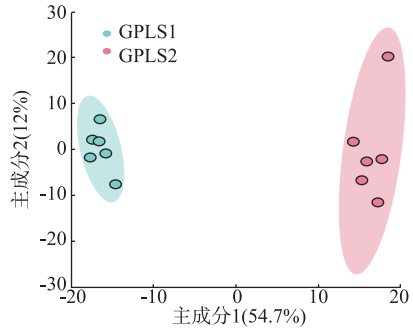


图 3　PCA 得分图

Fig. 3　Score plot of PCA

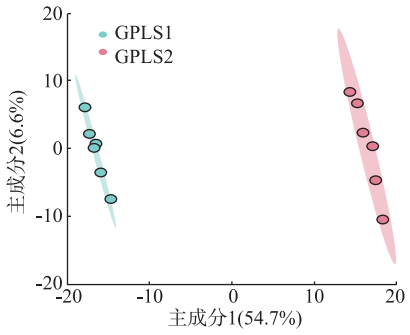


图 4　PLS-DA 得分图

Fig. 4　Score plot of PLS-DA

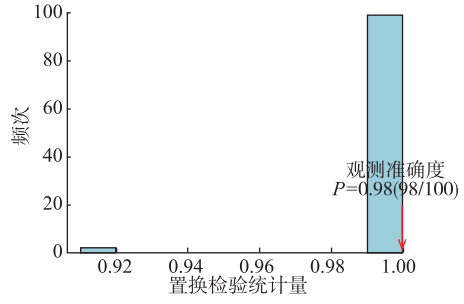


图 5　PLS-DA 置换检验统计量分布及 P 值

Fig. 5　PLS-DA permutation test statistics distribution and P value

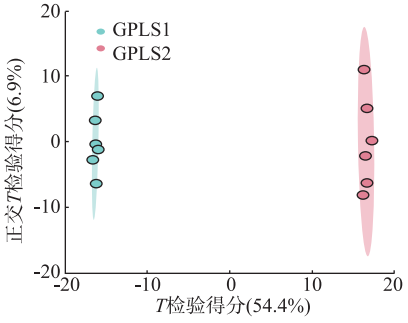


图 6　OPLS-DA 得分图

Fig. 6　Score plot of OPLS-DA

2.4　单变量分析

多元分析结果显示,GPLS1 和 GPLS2 间存在显

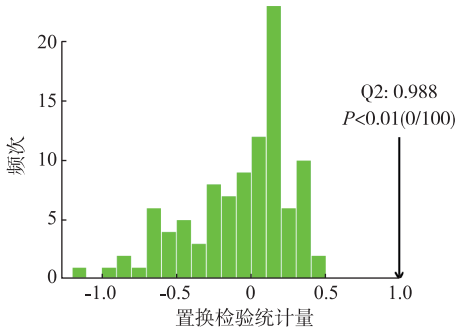


图 7　OPLS-DA 置换检验统计量分布及 *P* 值

Fig. 7　OPLS-DA permutation test statistics distribution and *P* value

著差异，单变量分析通过代谢物变化倍数来衡量差异的大小。如图 8 所示，粉色点代表了变化倍数（Fold Change,FC）绝对值大于 2 且 $P<0.05$ 的代谢物，这些代谢物在发酵前后变化较大，发酵后显著上调的代谢物 106 种，显著下调的代谢物 92 种。为了筛选出重要代谢物并直观显示其发酵前后的变化，我们以 FC≥2 或 FC≤0.5 且 $P<0.05$ 为标准，筛选出单维统计排名前 25 的代谢物作箱式图，见图 9。发酵后相对含量大幅度上调的 16 种，下调的 9 种，这些代谢物在 GPLS1 组和 GPLS2 组的组间差异极显著。

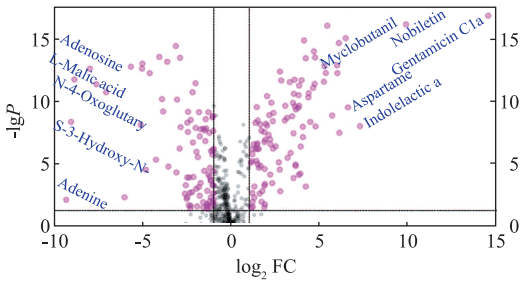


图 8　变化倍数火山图

Fig. 8　A volcano map of multiple variations

2.5　差异代谢物筛选

根据 OPLS-DA 的分析结果，变量重要性（Value Importance in Projection）VIP>1 且 $P<0.05$ 的代谢物共 286 种，这 286 种代谢物对 OPLS-DA 判别结果有重要作用。为了进一步筛选差异显著的代谢物，结合 OPLS-DA 和单变量分析结果，以 FC≥2 或 FC≤0.5 且 $P<0.05$、VIP>1 为指标，共筛选出 175 种代谢物，其中显著上调的 100 种，显著下调的 75 种，筛选出单维统计排名前 25 的代谢物作为差异较大的代谢物，见表 1。其中肽类 3 种，碳水化合物 1 种，核酸类 4 种，脂类 1 种，有机酸 1 种，黄酮类 1 种，其他 14 种。庆大霉素 C1a、川皮苷、鹅肌肽、莽草酸分别上调 22 672 倍、915 倍、11 倍、20 倍；普鲁卡因、尿嘧啶、奥西那林分别下调 33 倍、16 倍、15 倍。

2.6　代谢通路分析

上述筛选出的差异代谢物作为关键代谢物通过富集分析和拓扑分析得到 11 条差异显著的代谢通路，其中氨基酸代谢通路 6 条，说明发酵过程中氨基酸代谢相关物质前后变化较为丰富。如图 10 蓝色区域所示，在显著富集的前 11 条通路中：丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢的气泡最大，通路中关键代谢物包括 *L*-谷氨酰胺，琥珀酸半醛等；其次是 *β*-丙氨酸代谢通路，关键代谢物包括差异代谢物鹅肌肽、尿嘧啶等。苯丙氨酸代谢包括苯乙醇、富马酸等；络氨酸代谢包括富马酸、4-羟基苯乙醇、琥珀酸盐等；泛酸盐和辅酶 A 的生物合成包括尿嘧啶、*L*-缬氨酸、维生素 b5 等。苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成包括莽草酸、*L*-苯丙氨酸、*L*-色氨酸等。TCA 循环是好氧生物体内各大代谢的重要枢纽部分，包括差异代谢物富马酸、顺乌头酸等；氮素代谢的关键代谢物包括 *L*-谷氨酰胺、一磷酸腺苷等；精氨酸和脯氨酸代谢通路中包括了显著差异的代谢物 *L*-谷氨酰胺、2-琥珀酰-*L*-谷氨酸-5-半醛、胍丁胺等；亚油酸代谢包括 *γ*-亚麻酸、12,13-DHOME 等；丁酸盐代谢途径包括关键代谢物富马酸、琥珀酸等。

3　讨　论

通过 LC-MS 非靶向代谢组检测手段，共检测出代谢物 543 种，其中多肽类相对含量在发酵后由 32.5%增加至 70.8%；碳水化合物由 39.2%减少至 7.8%；有机酸发酵前为 9.4%，发酵后为 9.1%；核酸由 7.9%下调至 1.9%；维生素和辅酶类发酵前为 5.6%，发酵后为 3.6%；脂类在发酵前为 4.2%，发酵后为 2.6%；类固醇发酵前为 0.63%，发酵后升高到 4.3%；激素由 0.046%降至 0.023%。

发酵后小肽相对含量大幅增加，通过微生物发酵产生的小肽可能表现出一系列亲代蛋白质不具有或效果一般的生理活性：如抗氧化活性、降低血液胆固醇、血管紧张素Ⅰ抑制活性[12]、*α*-葡萄糖苷酶和 *α*-淀粉酶抑制作用[13]，有在体内拮抗炎症、多种心脑血管疾病、糖尿病的潜能。肽类中鹅肌肽、*L*-亮氨酸、*L*-谷氨酰胺被鉴定为差异代谢物。鹅肌肽是

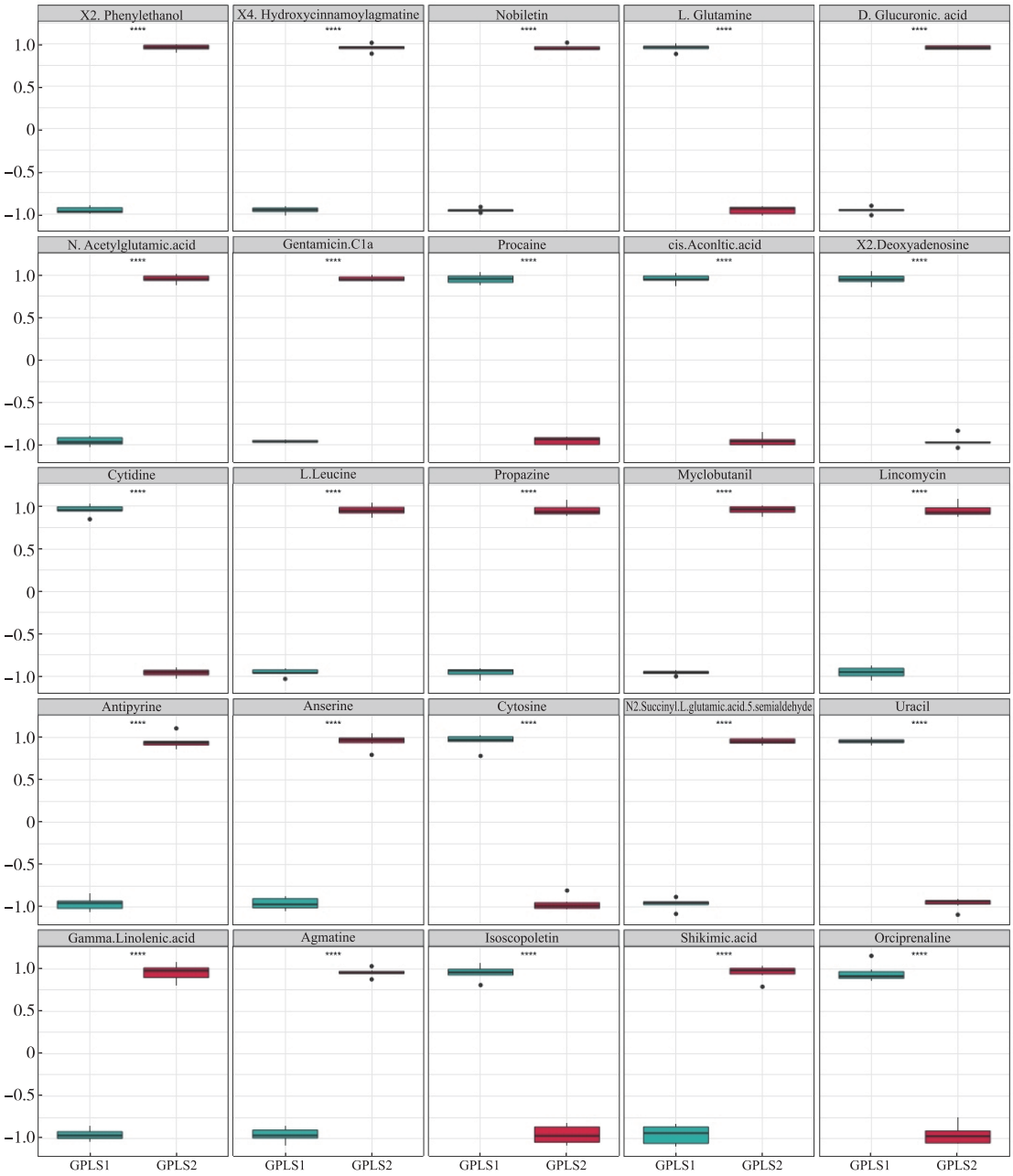


图 9　TOP25 代谢物差异箱式图

Fig. 9　Box plot of top 25 differential metabolites

一种组氨酸二肽,能有效降低高尿酸血症小鼠的尿酸水平[14],具有抗氧化活性,人体补充鹅肌肽对促进健康有着积极作用[15]。*L*-亮氨酸是人体必需的 21 种氨基酸之一,参与调节氨基酸和蛋白质代谢、改善糖代谢和脂代谢紊乱[16-17]。*L*-谷氨酰胺虽然是非必需氨基酸,但其参与蛋白质代谢,能够有效减轻肠道炎症和氧化应激[18]。植物乳杆菌的生理代谢活动消耗碳源,碳水化合物的相对含量大幅下降,产生有机酸。有机酸是发酵后枝条酸味的来源,代谢物中检测到 *L*-苹果酸、富马酸、顺乌头酸、没食子酸、奎尼酸等,研究表明有机酸具有多种生物活性[19]。鉴定到的有机酸中,顺乌头酸为三羧酸循环的中间产物,莽草酸是芳香族类物质生物合成途径的中间体,连接糖代谢和多酚代谢[20],具有抗炎、镇痛、抗血栓作用[21]。核酸相对含量明显下调,差异代谢物中几种核酸类物质降低倍数超过 2 倍,核苷酸参与体内许多代谢,嘌呤最终代谢物尿酸升高是疾病的生化基础。25 种差异代谢物中,川皮苷变化倍数为 915

表 1　TOP 25 代谢物

Table 1　Top 25 metabolites

编号	代谢物	FC	*P* 值	VIP 值	相对含量变化
1	2-苯乙醇	16.974	1.82×10^{-15}	1.354 439 330	↑
2	4-羟基肉桂酰胍	66.140	2.01×10^{-15}	1.354 490 655	↑
3	川皮苷	915.21	2.74×10^{-15}	1.354 703 208	↑
4	*L*-谷氨酰胺	0.113 20	3.80×10^{-15}	1.355 180 503	↓
5	*D*-葡萄糖醛酸	42.743	9.14×10^{-15}	1.354 748 977	↑
6	N-乙酰谷氨酸	24.946	1.09×10^{-14}	1.353 884 901	↑
7	庆大霉素 C1a	22 672	3.67×10^{-14}	1.355 010 164	↑
8	普鲁卡因	0.030 600	9.05×10^{-14}	1.353 427 897	↓
9	顺乌头酸	0.080 809	1.49×10^{-13}	1.353 866 441	↓
10	2-脱氧腺苷	0.030 083	2.17×10^{-13}	1.353 911 462	↓
11	胞苷	0.133 97	2.81×10^{-13}	1.354 654 463	↓
12	*L*-亮氨酸	18.152	4.49×10^{-13}	1.353 024 756	↑
13	扑灭津	37.598	5.52×10^{-13}	1.352 481 909	↑
14	晴菌唑	86.765	6.08×10^{-13}	1.354 821 550	↑
15	林可霉素	62.481	1.03×10^{-12}	1.352 303 851	↑
16	安替比林	15.448	1.89×10^{-12}	1.350 742 914	↑
17	鹅肌肽	11.737	3.35×10^{-12}	1.352 166 565	↑
18	胞嘧啶	0.244 98	3.39×10^{-12}	1.352 326 325	↓
19	N2-琥珀酰-l-谷氨酸 5-半醛	26.209	1.09×10^{-11}	1.353 464 214	↑
20	尿嘧啶	0.059 328	2.02×10^{-11}	1.353 646 854	↓
21	γ-亚麻酸	9.763 2	2.45×10^{-11}	1.351 269 575	↑
22	胍丁胺	6.639 6	2.53×10^{-11}	1.352 390 748	↑
23	异莨菪素	0.217 91	5.10×10^{-11}	1.350 658 963	↓
24	莽草酸	20.361	7.39×10^{-11}	1.350 400 608	↑
25	奥西那林	0.065 781	7.65×10^{-11}	1.347 386 920	↓

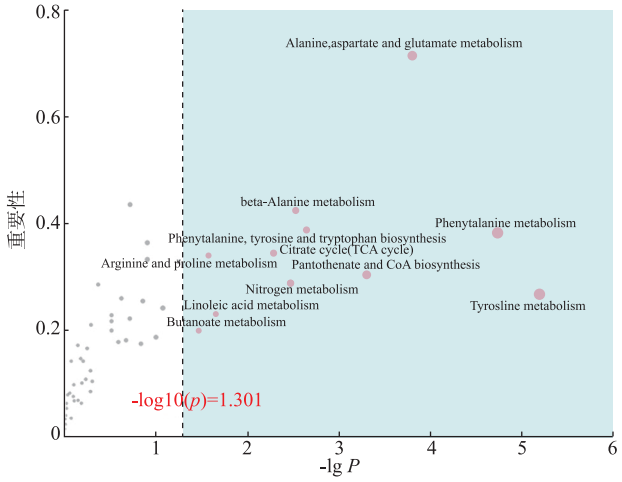


图 10　代谢通路富集分析和拓扑分析

Fig. 10　Enrichment analysis and topology analysis of metabolic pathway

倍，川皮苷是一种黄酮类脂分子，苦味化合物，具有抗氧化、抗炎、抗癌[22]及神经保护作用[23]。γ-亚麻酸变化倍数为 9 倍，同样具有抗炎、抗氧化、降低血糖[24-25]等一系列生理活性。2-苯乙醇是一种芳香化合物，有苦味、花卉味、蜂蜜味，与糖结合形成苯乙醇苷类，苯乙醇苷类具有很强的生物活性如抗氧化性[26]。

4　结　语

通过对植物杆乳杆菌发酵小叶苦丁枝条前后的代谢物进行统计学分析，发现发酵前后代谢物差异显著，说明发酵改变了小叶苦丁枝条提取物的物质构成，提高了某些生理活性代谢物的相对含量。而抗生素庆大霉素 C1a 与林可霉素及其他药用成分的大幅增加，也为植物乳杆菌发酵小叶苦丁枝条提取物的安全问题带来了不确定性。作者初步分析了小叶苦丁枝条提取物发酵前后的差异组成，证明了乳酸菌发酵对小叶苦丁枝条的资源化利用是可行的，而庆大霉素 C1a 等成分带来的安全风险和川皮苷等几种生物活性成分精确定量还需要进一步的评估和研究。

参考文献:

[1] 李丽,许利嘉,彭勇,等. 绿茶与其他 4 种别样茶的比较[J]. 中国中药杂志,2011,36(1):5-10.
[2] 赵斌,王华. 贵州小叶苦丁茶的生态学和生物学特性初报[J]. 农技服务,2014,31(3):10-11.
[3] LIU B H, MA R D, ZHANG J. et al. Preventive effect of small-leaved kuding tea (*Ligustrum robustum* (Roxb.) Bl.) polyphenols on *D*-galactose-induced oxidative stress and aging in mice[J]. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2019(2019):3152324.
[4] YU Z L, ZENG W C. Antioxidant, antibrowning, and cytoprotective activities of *Ligustrum robustum* (Rxob.) blume extract[J]. **Journal of Food Science**, 2013, 78(9) : C1354-C1362.
[5] LIU S J, HE F T, ZHENG T L. et al. *Ligustrum robustum* alleviates atherosclerosis by decreasing serum TMAO, modulating gut microbiota, and decreasing bile acid and cholesterol absorption in mice[J]. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2021, 65 (14): 2100014.
[6] 杨飞,罗姝菡,万思齐,等. 粗壮女贞改善高胆碱膳食小鼠结肠屏障功能及减轻肠道炎症反应[J]. 现代预防医学,2021,48(2): 316-320.
[7] YU Z Y, GAO H X, ZHANG Z, et al. Inhibitory effects of *Ligustrum robustum* (Rxob.) blume extract on α-amylase and α-glucosidase[J]. **Journal of Functional Foods**, 2015, 19 : 204-213.
[8] CHEN M, ZHENG J P, ZOU X J, et al. *Ligustrum robustum* (Roxb.) blume extract modulates gut microbiota and prevents metabolic syndrome in high-fat diet-fed mice[J]. **Journal of ethnopharmacology**, 2020, 268: 113695-113695.
[9] 徐佳伊,周涛,何方婷,等. 饮用粗壮女贞苦丁茶对心血管疾病相关指标的影响[J]. 现代预防医学,2018,45(15):2752-2755.
[10] ZOU H J, LIU S,YAN C, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antitumor activity of *Ligustrum robustum*, a Chinese herbal tea[J]. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, 2019, 25(6) : 425-430.
[11] 代鑫. 余庆:绿色食品工业助推乡村振兴[J]. 当代贵州, 2021(14):71.
[12] HADI P S, ZOHREH K, MIRIAN P, et al. A review on health-promoting, biological, and functional aspects of bioactive peptides in food applications[J]. **Biomolecules**,2021,11(5): 631.
[13] SHITAL P, GOSWAMI A, KALIA K, et al. Plant-derived bioactive peptides: a treatment to cure diabetes[J]. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 2019, 26(5):955-968.
[14] 张瑞雪,张江涛,方磊,等. 富含鹅肌肽的鸡胸肉酶解物对小鼠降尿酸作用初探[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(9):25-31.
[15] WU G Y. Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health[J]. **Amino Acids**, 2020, 52(1): 329-360.
[16] OCHUKO L E, VERONICA F S, OLIBUNMI A, et al. *L*-leucine stimulation of glucose uptake and utilization involves modulation of glucose-lipid metabolic switch and improved bioenergetic homeostasis in isolated rat psoas muscle *ex vivo*[J]. **Amino Acids**, 2021, 53: 1135-1151.
[17] ZENG Y X, HUANG T D, WANG N, et al. *L*-leucine improves metabolic disorders in mice with in-utero cigarette smoke exposure[J]. **Frontiers in Physiology**,2021,12:976.
[18] DE OLIVEIRA S R, DA SILVA C G, DA COSTA L L, et al. *L*-glutamine and physical exercise prevent intestinal inflammation and oxidative stress without improving gastric dysmotility in rats with ulcerative colitis[J]. **Inflammation**, 2021, 44(2): 617-632.
[19] 谭和平,叶善蓉,陈丽,等. 茶叶中有机酸的测试方法概述[J]. 中国测试技术,2008(6):77-80.
[20] 傅豪,魏旭,梁国鲁,等. 茶树莽草酸代谢途径相关基因研究进展[J]. 分子植物育种,2021,19(2):485-493.
[21] PARK J, LEE B, CHOI H, et al. Antithrombosis activity of protocatechuic and shikimic acids from functional plant *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc needles[J]. **Journal of Natural Medicines**, 2016, 70(3): 492-501.
[22] 谷乐,刘韶松,何丽娟,等. 台湾香檬果皮川陈皮素分离制备及其抗肿瘤活性研究[J]. 亚热带植物科学,2021,50(2):83-87.
[23] AMARSANAA K, KIM H J, KO E A, et al. Nobiletin exhibits neuroprotective effects against mitochondrial complex I inhibition via regulating apoptotic signaling[J]. **Experimental Neurobiology**, 2021, 30(1): 73-86.
[24] BAKER E J , VALENZUELA C A, DOOREMALEN W T M V,et al. Gamma-linolenic and pinolenic acids exert anti-inflammatory effects in cultured human endothelial cells through their elongation products[J]. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2020, 64(20):e2000382.
[25] 魏琳琳,孙建云,胡萍,等. γ- 亚麻酸对四氧嘧啶糖尿病模型大鼠的降糖作用研究[J]. 毒理学杂志,2019,33(4):298-301.
[26] 宋光西,马玲云,魏锋,等. 苯乙醇苷的分布及药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药,2011,7(4):169-171.