

单位代码: 10359

学 号: 2021171532

密 级: 公开

分 类 号: TS201.2



合肥工业大学
Hefei University of Technology

硕士学位论文

MASTER'S DISSERTATION

(专业硕士)

论文题目:

发酵豆渣通过调节肠道菌群及其
色氨酸代谢减缓肥胖的机制

学科专业:

生物与医药

作者姓名:

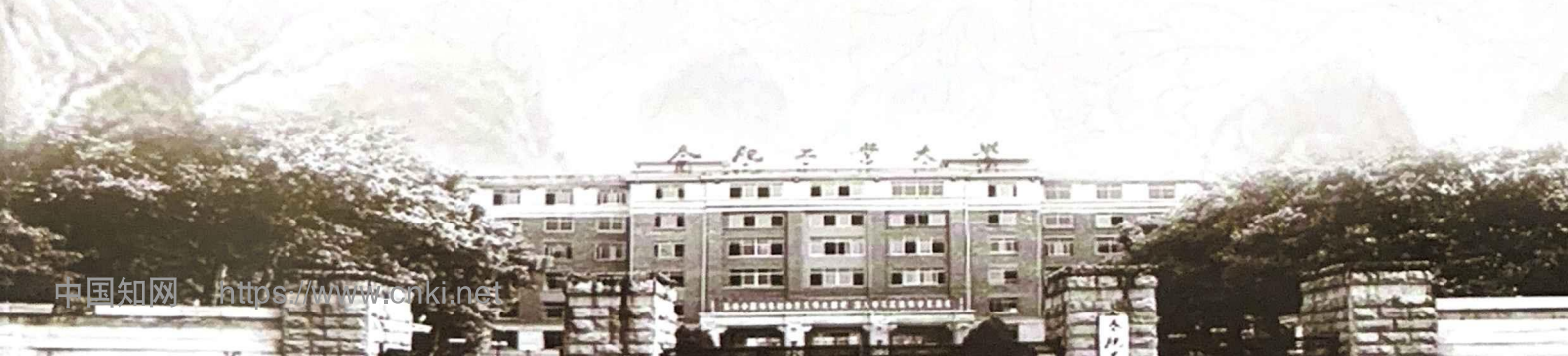
湛祺

导师姓名:

Kiran Thakur 副教授 王荣海 研究员

完成时间:

2024年5月



单位代码：10359

学 号：2021171532

密 级：公开

分类号：TS201.2

合肥工业大学

Hefei University of Technology

硕士学位论文

MASTER'S DISSERTATION

论文题目：发酵豆渣通过调节肠道菌群及其

色氨酸代谢减缓肥胖的机制

学位类别：专业硕士

专业名称：生物与医药

作者姓名：湛祺

导师姓名：Kiran Thakur 副教授

王荣海 研究员

完成时间：2024 年 5 月

合 肥 工 业 大 学

专业硕士学位论文

发酵豆渣通过调节肠道菌群及其色氨酸代谢减缓肥胖的机制

作者姓名： 湛祺

指导教师： Kiran Thakur 副教授

王荣海 研究员

专业名称： 生物与医药

研究方向： 食品工程

2024 年 5 月

A Dissertation Submitted for the Degree of Master

**Mechanism of fermented okara in reducing obesity by
modulating gut microbiota and tryptophan metabolism**

By

Zhan Qi

Hefei University of Technology

Hefei, Anhui, P.R.China

May, 2024

摘要

在当前社会背景下，肥胖危机正成为一个全球性的健康难题，迫切需要制定新的有效干预措施来应对这一挑战。本研究聚焦豆渣这一物质，探讨了通过微生物发酵改善其营养与功能性质，进一步研究了其在对抗高脂饮食诱导的小鼠肥胖及其通过调节肠道菌群和色氨酸代谢来缓解肥胖的潜力。研究的主要内容如下：

（1）基于 LC-MS 代谢组学分析 *Bacillus subtilis* DC-15 发酵豆渣的营养和功能特性。共鉴定出了 761 种差异代谢物，其中氨基酸、二肽、脂肪酸、小分子糖和维生素等有益健康的营养和功能成分的丰度最高。根据 KEGG 代谢途径分析，485 种代谢物被富集到代谢相关通路，包括 37 种碳水化合物代谢物，79 种氨基酸代谢物和 22 种脂质代谢物，涉及能量代谢、脂质代谢和氨基酸代谢。这表明通过发酵可以提高豆渣的营养和功能活性，彰显了其潜在的健康促进机制。

（2）通过建立小鼠高脂饮食诱导的肥胖模型，探索发酵豆渣对肥胖的干预效果。结果表明，与高脂饮食组相比，经过 10 周的豆渣和发酵豆渣膳食干预，显著改善了肥胖小鼠的体重、血糖、血脂及血液生化指标，保护了肝功能，调节了炎症因子，改善了肝脏组织形态，增加了短链脂肪酸的产生，提高了瘦素水平，显示出其对减轻肥胖及其并发症的强大潜力。

（3）深入分析了发酵豆渣干预肥胖的机制，尤其是其对肠道微生态系统和色氨酸代谢的影响。研究发现，肥胖导致的肠道菌群紊乱通过发酵豆渣膳食得到显著逆转。色氨酸代谢组学分析显示，高脂饮食干扰了色氨酸代谢，而发酵豆渣膳食干预能够调节色氨酸代谢通路，增加吲哚类物质（IAAld、IAld、IA、IAA、和 IEt）的水平。进一步探索表明，通过促进 IL-22 和 AhR 的表达，吲哚类化合物可能作为 AhR 的配体，从而有效对抗高脂饮食引起的炎症与代谢失衡。这种肠道菌群与色氨酸代谢物之间的相互作用为理解肠道微生态与宿主健康的复杂关系提供了新视角。

综上所述，本研究不仅为发酵豆渣在食品和营养学领域的应用提供了新的科学依据，也为通过膳食干预管理肥胖和提升健康提供了新策略，具有重要的理论意义和应用前景。

关键词：豆渣；发酵；肥胖；肠道菌群；色氨酸代谢

ABSTRACT

In today's world, the obesity crisis is becoming a global health challenge, urgently requiring the development of new and effective intervention measures to address this issue. This study focuses on okara, exploring the improvement of its nutritional and functional properties through microbial fermentation, further investigating its potential in combating high-fat diet-induced obesity in mice and alleviating obesity by regulating gut microbiota and tryptophan metabolism. The main contents of the study are as follows:

(1) Nutritional and functional characteristics of okara fermented with *Bacillus subtilis* DC-15 were analyzed based on LC-MS metabolomics. A total of 761 differential metabolites were identified, among which amino acids, dipeptides, fatty acids, small molecule sugars, and vitamins were the most abundant beneficial nutritional and functional components. According to KEGG metabolic pathway analysis, 485 metabolites were enriched in metabolic-related pathways, including 37 carbohydrate metabolites, 79 amino acid metabolites, and 22 lipid metabolites, involving energy metabolism, lipid metabolism, and amino acid metabolism. This indicates that fermentation can enhance the nutritional and functional activity of okara, highlighting its potential health promotion mechanisms.

(2) The intervention effect of fermented okara on obesity was explored by establishing a mice model of high-fat diet-induced obesity. Results showed that after 10 weeks of intervention with soybean dregs and fermented okara diets, significant improvements were observed in the body weight, blood glucose, blood lipids, and blood biochemical markers of obese mice, protecting liver function, regulating inflammatory factors, improving liver tissue morphology, increasing short-chain fatty acid production, and raising leptin levels, demonstrating its strong potential in reducing obesity and its complications.

(3) The mechanism of fermented okara intervention in obesity was analyzed in depth, especially its impact on the intestinal microecosystem and tryptophan metabolism. The study found that the intestinal microbial disorder caused by obesity was significantly reversed by the fermented okara diet. Tryptophan metabolomics analysis showed that the high-fat diet disturbed tryptophan metabolism, while fermented okara diet intervention could regulate the tryptophan metabolism pathway, increasing the levels of indole compounds (IAAld, IAld, IA, IAA, and IET). Further exploration revealed that

indole compounds, possibly acting as AhR receptor ligands by promoting the expression of IL-22 and AhR, could effectively combat inflammation and metabolic imbalance caused by a high-fat diet. This interaction between gut microbiota and tryptophan metabolites offers a new perspective for understanding the complex relationship between the gut microbiome and host health.

In conclusion, this study not only provides new scientific evidence for the application of fermented okara in the field of food and nutrition but also offers new strategies for managing obesity and enhancing health through dietary intervention, bearing significant theoretical significance and application prospects.

KEYWORDS: Okara; Fermentation; Obesity; Gut microbiota; Tryptophan metabolites

目 录

第一章 引言.....	1
1.1 大豆豆渣的资源化利用.....	1
1.1.1 大豆及豆渣.....	1
1.1.2 豆渣资源的传统利用方式.....	1
1.1.3 豆渣资源的新型利用方式.....	2
1.2 肠道菌群与宿主肥胖.....	3
1.2.1 肥胖的流行病学背景与影响.....	3
1.2.2 肠道菌群代谢与肥胖的关系.....	4
1.2.3 色氨酸代谢在肠道菌群中的角色.....	6
1.3 代谢组学技术及其应用.....	8
1.4 课题研究内容与意义.....	9
1.4.1 研究意义.....	9
1.4.2 主要研究内容.....	10
第二章 基于 LC-MS 代谢组学分析发酵豆渣的营养和功能特性	11
2.1 材料与仪器设备.....	11
2.1.1 材料与试剂.....	11
2.1.2 仪器和设备.....	11
2.2 实验方法.....	11
2.2.1 <i>B. subtilis</i> DC-15 菌悬液的制备	11
2.2.2 豆渣发酵.....	12
2.2.3 代谢组学分析的样品制备.....	12
2.2.4 LC-MS 代谢组学分析	12
2.2.5 代谢组学分析方法.....	13
2.3 结果与讨论.....	14
2.3.1 发酵豆渣代谢概况分析.....	14
2.3.2 发酵豆渣差异代谢物分析.....	14
2.3.3 豆渣发酵过程中次生代谢物的差异分析	18
2.3.4 <i>B. subtilis</i> DC-15 发酵豆渣代谢途径分析	23
2.4 本章小结.....	25
第三章 发酵豆渣对高脂饮食诱导小鼠肥胖的干预作用	27
3.1 材料与仪器设备.....	27
3.1.1 实验动物与饲料.....	27
3.1.2 材料与试剂.....	29
3.1.3 主要实验仪器.....	30

3.2 实验内容与方法.....	30
3.2.1 肥胖小鼠模型构建.....	30
3.2.2 体重和体重增量的测定.....	31
3.2.3 初始血糖和最终血糖的测定.....	31
3.2.4 血脂指标的测定.....	31
3.2.5 脏器指数的测定.....	31
3.2.6 血液生化学指标的测定.....	31
3.2.7 肝脏组织切片.....	32
3.2.8 肝功能的测定.....	32
3.2.9 炎症因子、瘦素的测定.....	32
3.2.10 短链脂肪酸含量测定.....	32
3.3 结果与分析.....	33
3.3.1 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠体重的干预效果	33
3.3.2 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠血糖浓度的干预效果	33
3.3.3 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠血脂的干预效果	34
3.3.4 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠中脏器指数的干预效果 ..	35
3.3.5 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠血液生化指标的干预效果	36
3.3.6 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠肝功能的干预效果	37
3.3.7 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠炎症因子的干预效果	38
3.3.8 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠肝脏组织学形态的干预效果	39
3.3.9 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠粪便 SCFAs 的影响 ..	40
3.3.10 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠瘦素的干预效果	41
3.4 本章小结.....	42
第四章 发酵豆渣对高脂小鼠的肠道菌群及其色氨酸代谢物的调节作用	44
4.1 材料与仪器设备.....	44
4.2 实验内容与方法.....	45
4.2.1 肠道菌群 16s RNA 技术分析.....	45
4.2.2 色氨酸靶向代谢组分析方法.....	46
4.2.3 生化分析.....	47
4.3 结果与分析.....	47
4.3.1 发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠肠道菌群的影响	47
4.3.2 发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠色氨酸代谢物的影响	53
4.4 本章小结.....	59
第五章 结论与展望	61
5.1 结论.....	61

5.2 展望.....	62
参考文献.....	63
附录 1 文中出现的缩略词列表	75

插图清单

图 1.1 肥胖症中肠道菌群活性与宿主代谢相关的作用机制	4
图 1.2 肠道菌群调控下的宿主生理中的色氨酸代谢	7
图 1.3 色氨酸代谢途径：犬尿氨酸、吲哚/AhR 和血清素代谢途径	7
图 2.1 所有代谢物在负离子模式（A）和正离子模式（B）下的 PCA 评分图	14
图 2.2 差异代谢物火山图	15
图 2.3 负离子和正离子模式下代谢物 KEGG 注释图	18
图 2.4 氨基酸、二肽及其类似物的热图（A），氨基酸、二肽类代谢物的丰度（B）	19
图 2.5 脂质及其类似物的热图（A），脂肪酸类代谢物的丰度（B）	21
图 2.6 碳水化合物及其类似物的热图（A），碳水化合物类代谢物的丰度（B）	22
图 2.7 KEGG 富集因子图	24
图 2.8 发酵豆渣特定代谢物与 KEGG 通路之间的代谢网络	24
图 3.1 小鼠造模方法	31
图 3.2 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠体重（A）和体重增量（B）的影响	33
图 3.3 豆渣和发酵豆渣膳食干预后小鼠的初始血糖（A）和最终血糖（B）	34
图 3.4 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠血清中 TC（A）、TG（B）、HDL-C（C）和 LDL-C（D）含量的影响	35
图 3.5 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠 ALT(A)和 AST(B)的影响	38
图 3.6 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠炎症因子的影响	39
图 3.7 小鼠肝脏组织的油红 O 染色图片（×20，×63）	40
图 3.8 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠肠道激素的影响	42
图 4.1 发酵豆渣膳食干预对小鼠肠道菌群 α -多样性的影响	48
图 4.2 发酵豆渣膳食干预对小鼠肠道微生物 β -多样性的影响	49
图 4.3 各组小鼠肠道菌群门水平堆积图	49
图 4.4 各组小鼠肠道菌群属水平堆积图	50
图 4.5 发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠肠道微生物差异菌属的热图	51
图 4.6 四组小鼠的肠道菌群基于 ASV 的 LDA 值分布柱状图(A)和进化分支图(B)	53
图 4.7 四组小鼠色氨酸代谢物 PCA 图	54
图 4.8 四组小鼠中色氨酸代谢物的丰度热图	55
图 4.9 三条色氨酸代谢途径及相关代谢物的 FC 和 P 值热图	56
图 4.10 发酵豆渣膳食干预对差异色氨酸代谢物和结肠 AhR/IL-22 表达的影响	57

图 4.11 肠道菌群与色氨酸代谢物的 spearman 相关性分析	59
--	----

表格清单

表 1.1 豆渣中营养物质的含量	1
表 2.1 未发酵豆渣组与发酵豆渣组的差异代谢物	15
表 3.1 AIN-93 普通饲料成分表	27
表 3.2 高脂饲料成分表	28
表 3.3 材料及试剂表	29
表 3.4 仪器设备一览表	30
表 3.5 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠脏器指数的影响	36
表 3.6 血液学参数	36
表 3.7 4 组小鼠粪便中 SCFAs 含量 (mg/g)	41
表 4.1 仪器与设备	44

第一章 引言

1.1 大豆豆渣的资源化利用

豆渣发酵是指利用微生物将豆渣中的有机成分进行生物转化的一种过程。这种方法可以提高豆渣的营养价值和消化率，同时减少某些抗营养因子，使其成为一种更加适合人类和动物消费的产品。发酵后的豆渣可以用作动物饲料、土壤改良剂或作为食品的成分。

1.1.1 大豆及豆渣

大豆（*Glycine max*）是一种重要的油料作物和蛋白质来源，含有大量的必需氨基酸、不饱和脂肪酸、维生素和矿物质^[1, 2]。在大豆加工过程中，通过提取豆油和豆浆，可以产生大量的副产品，即豆渣^[3]。如表 1.1，豆渣含有丰富的膳食纤维、蛋白质以及其他有益成分，其中豆渣中的蛋白质含量较高，达到 18.20 g/100 g，这使得豆渣成为植物性蛋白的良好来源，对于素食者和寻求替代动物蛋白源的人来说尤为重要；另外脂肪含量为 6.81 g/100 g，这表明豆渣含有一定量的脂肪，但其含量并不高；同时豆渣的膳食纤维含量非常高，达到 64.8 g/100 g，粗纤维含量较高，为 19.7 g/100 g^[4]。高纤维含量使得豆渣成为增强饱腹感、改善肠道健康的优质食材^[5]。同时也含有一些抗营养素，如植酸盐、胰蛋白酶抑制剂等^[6]。现代研究表明通过各种物理和酶处理方法揭示豆渣（大豆残渣）中隐藏的营养成分，并结合微生物发酵技术以扩展其食品应用，可以促进豆渣的回收利用^[7]。

表 1.1 豆渣中营养物质的含量

Tab 1.1 Nutrient content of okara

水分/ (g/100 g)	灰分/ (g/100 g)	蛋白质/ (g/100 g)	脂肪/ (g/100 g)	膳食纤维/ (g/100 g)	粗纤维/ (g/100 g)	碳水化合物/ (g/100 g)	能量/ (KJ/100 g)
5.67 ± 0.13	3.11 ± 0.10	18.20 ± 0.30	6.81 ± 0.30	64.8 ± 0.30	19.7 ± 0.40	1.42 ± 0.11	1126.00 ± 9.00

1.1.2 豆渣资源的传统利用方式

1.1.2.1 豆渣充当食品/饲料

豆渣由于其高蛋白质和膳食纤维含量，可以被直接加工成各种食品，如豆渣饼干^[8]、豆渣面包^[9]等，这些食品不仅营养丰富，而且豆渣作为食品添加可以增加

食物的多样性，为人们的餐桌带来更多选择和风味。

此外，豆渣作为一种低成本的蛋白质来源，常被用作畜禽饲料，提高了饲料的营养价值和消化率^[10]。在某些农场，豆渣直接用作牲畜的粗饲料，或与其他饲料混合提供，既减少了饲料成本，又提升了资源的循环利用率。

1.1.2.2 豆渣的微生物发酵

豆渣的发酵利用是一种传统且有效的方式，通过微生物发酵过程不仅可以进一步提升豆渣的营养价值，还能够产生新的食品或饲料产品。发酵过程通常涉及微生物的活动，这些微生物可以分解豆渣中的纤维素、蛋白质等大分子物质，转化为更易于人体吸收的形式，同时也可以产生一些具有特殊风味或健康益处的代谢产物。

豆渣的微生物发酵通过选用特定的微生物菌株来促进豆渣中营养物质的转化和分解，进而产生具有营养价值或功能性的新型产品。发酵过程中常用的微生物包括乳酸菌、枯草芽孢杆菌、酵母菌和曲霉等等，它们各自有着特定的作用和优势。乳酸菌是发酵豆渣中最常用的一类细菌，能够产生乳酸，降低 pH 值，从而抑制有害微生物的生长。此外，乳酸菌还能够分解豆渣中的植物纤维和蛋白质，提高其营养价值和可消化性^[11]。枯草芽孢杆菌能够产生大量的蛋白酶，促进豆渣中蛋白质的分解，增加发酵产品的氨基酸含量^[12]。酵母菌可以利用豆渣中的糖分进行发酵，产生乙醇、二氧化碳和一系列风味物质，酵母菌发酵的豆渣可用于生产发酵面包、饲料添加剂等^[13]。曲霉在亚洲传统发酵食品中使用广泛，如酱油和豆豉等，能够产生一系列的酶，如蛋白酶和淀粉酶，促进豆渣中复杂营养成分的分解，提高最终产品的风味和营养价值^[14]。

1.1.3 豆渣资源的新型利用方式

随着科技进步和对可持续发展的追求，豆渣的利用方式正在发生变革，人们探索出多种新型利用方式，以提升其经济和环保价值。以下是几种创新的利用路径：

1.1.3.1 大豆膳食纤维的开发

高纤维食品添加剂：王昌陵和李盛有^[15]利用豆渣中丰富的膳食纤维，开发其作为高纤维成分的食品添加剂，用于烘焙食品、肉制品等，旨在提高食品的营养价值和健康效益。

功能性膳食纤维：Fan 等^[16]研究发现，经过特定处理的豆渣膳食纤维具有改善肠道健康、控制血糖等功能性特点，可以作为健康食品或营养补充剂，满足市场对健康营养产品的需求。

1.1.3.2 发酵豆渣作功能食品

益生元和益生菌载体：发酵豆渣中富含的营养成分可以作为益生元，促进肠道有益菌群的增长^[17]；同时，它也可以作为益生菌的载体，用于制备功能性酸奶、饮料等产品^[18]。

生物活性肽的来源：Zhu 等^[19]通过微生物发酵，将豆渣中的蛋白质分解成具有抗氧化、降血压等生物活性的小肽，这些生物活性肽可以进一步用于开发新型功能食品或药品。

1.1.3.3 生物质能源的生产

豆渣作为一种生物质资源，可以通过厌氧消化等方式转化为生物燃气，如甲烷，为生产可再生能源提供原料。通过酶解和发酵过程，豆渣中的碳水化合物可以转化为生物乙醇，可作为一种绿色能源，有助于减少对化石燃料的依赖^[20]。

1.1.3.4 生态包装材料

杜磊等人^[21]利用豆渣中的纤维素和其他有机物质，开发生物降解塑料，这种新型材料可以在自然环境中快速分解，减少塑料污染，对环境友好。

通过这些新型利用方式，豆渣的价值得到了充分的挖掘和提升，不仅促进了农业副产品的高值化利用，还为环境保护和可持续发展做出了贡献。

1.2 肠道菌群与宿主肥胖

1.2.1 肥胖的流行病学背景与影响

在过去几十年内，与肥胖相关的健康问题已经从一个被局限于高收入国家的现象，转变为一个全球性的难题^[22]。根据世界卫生组织（WHO）的统计，自 1975 年以来，全球肥胖率近乎激增三倍^[23]。2016 年数据显示，全球有超过 19 亿成年人超重，其中超过 6 亿人被归类为肥胖^[24]。不仅成年人，儿童肥胖的增加也令人忧心，这预示着肥胖可能对下一代人的健康造成长期影响^[25]。

肥胖之所以成为公众关注的焦点，其中一个重要原因是它与多种非传染性疾病之间存在的密切关联^[26]。研究表明，体质指数（BMI）的增加与心血管疾病、2 型糖尿病和多种癌症的风险呈现明显正相关^[27-29]。2021 年的一项研究报告显示，肥胖与早死率增加有关，肥胖患者的平均寿命明显缩短。此外，最近的研究发现，肥胖增加了发生严重精神健康问题的概率，包括抑郁和焦虑。

肥胖带来的经济负担也不容忽视。根据国际健康经济学会（iHEA）公布的报告，肥胖直接相关的医疗费用成为全球卫生开支的一个大比例。进一步地，由于肥胖造成了不良的身体健康状况影响工作效率，产生了每年数十亿美元的间接花费，例如病假和生产力损失^[30, 31]。

尽管这种趋势具有普遍性，但肥胖流行的原因却是复杂多样的。近年的研究揭示了除传统的饮食习惯和运动不足之外的多种因素。例如，一个由美国国立卫生研究院（NIH）资助的研究提示，肠道微生物群的组成可能在决定个体对食物代谢的方式上发挥作用，进而影响到肥胖的发生率^[32, 33]。此外，正在进行的多中心研究正试图绘制肥胖人群的全基因组关联图谱，以识别与肥胖相关的遗传标记^[34-36]。

综上所述，肥胖在全球范围内已成为不容忽视的健康问题。随着肥胖病例的不断上升，对其流行病学背景的深入研究变得至关重要。通过这些研究不仅可以加深我们对肥胖病理学的理解，更为公共卫生政策制定提供了数据支持，有助于制定有效的预防和治疗策略，以应对这一令人忧虑的全球健康挑战。

1.2.2 肠道菌群代谢与肥胖的关系

肠道菌群与肥胖的关系是一个复杂但紧密相连的领域，涉及多个机制和代谢途径。通过对肥胖症中肠道菌群活性与宿主代谢相关的作用机制的分析，我们可以更深入地理解其间的联系。以下是几个关键点：

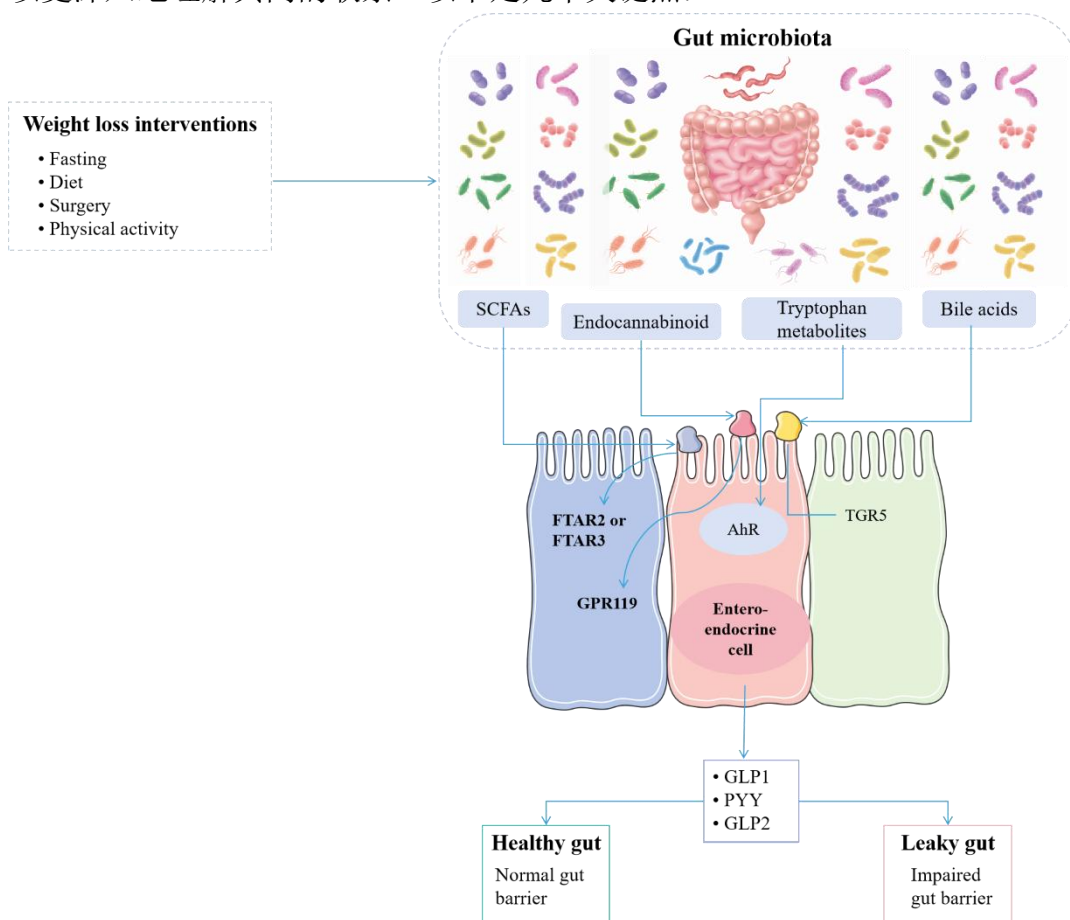


图 1.1 肥胖症中肠道菌群活性与宿主代谢相关的作用机制

Fig 1.1 Mechanisms of action of gut flora activity in obesity related to host metabolism

（1）短链脂肪酸（SCFAs）

短链脂肪酸（SCFAs）是由某些肠道细菌通过碳水化合物发酵过程产生的。乙酸、丙酸和丁酸是主要的 SCFAs 产物，其大致的摩尔比例为 60 : 20 : 20^[37]。这些 SCFAs 调节肠腔 pH 值和粘液的产生，为上皮细胞提供燃料，并调节黏膜免疫功能。此外，它们还可以进入全身循环，并直接影响代谢或外周组织的功能^[38]。尽管 SCFAs 提供了直接的额外卡路里来源，但 SCFAs 的增加被认为通过减少肝脏的葡萄糖和脂质产生有益于体系的能量调节。此外，SCFAs 可在结肠中刺激厌食激素 PYY 和 GLP1 的分泌，通过激活游离脂肪酸受体 2（FFAR2）和游离脂肪酸受体 3（FFAR3）来促进肠-脑轴信号传导，从而调节免疫、肠道传输时间、炎症和代谢（图 1.1）^[39-41]。

在啮齿类动物中进行的给药研究显示，SCFAs 对于减轻体重、预防体重增加或减缓体重增加的有益效果；且一系列研究表明，增加结肠中的丙酸可以通知调节超重成人的食欲防止体重增加，这表明增加 SCFAs 的产生可作为预防肥胖的一种有价值的策略^[42, 43]。

（2）胆汁酸

当食物被摄入时，初级胆汁酸，如胆酸和鹅去氧胆酸，被释放到小肠中，促进饮食脂肪和脂溶性维生素的吸收^[44]。此外，胆汁酸作为信号分子，被认为是全身代谢的关键调节因子，例如它与核激素受体^[45]、维生素 D 受体^[46]、孕激素 X 受体^[47]、组成型雄烷受体^[48]和膜受体^[49]的相互作用可以调节 PYY、GLP1 和成纤维细胞生长因子的分泌，促进胆固醇代谢和全身能量消耗。

在肠腔中，胆汁酸作为肠道菌群生物转化的底物，通过胆盐水解酶（BSH）去除氨基酸残基，以及通过去羟基化、氧化或外聚化进行进一步代谢为次级胆汁酸，包括脱氧胆酸、石胆酸和熊脱氧胆酸（人类的次级胆汁酸，啮齿动物的初级胆汁酸）^[44, 50, 51]。肠道菌群代谢改变了胆汁酸的生物利用度和生物活性，从而影响胆汁酸参与的代谢反应。故此，肠道菌群与胆汁酸的相互作用被认为是限制卡路里摄入后体重反弹的原因之一。此外，极低热量饮食引起的减肥已被证明可以增加肥胖和胰岛素抵抗个体的餐后脱氧胆酸水平，减少静息能量消耗^[52, 53]。

（3）内源性大麻素

内源性大麻素系统由不同的生物活性的脂质组成，这些脂质在几乎所有细胞和器官中都有表达。它们具有多种调节作用，包括控制能量、葡萄糖和脂质代谢，同时也通过激活多种受体，在免疫和炎症中发挥作用^[54, 55]。2010 年，内源性大麻素系统和其他相关的生物活性脂质和受体首次被证明受肠道微生物群的调节，从而代表了肠道菌群通过另一机制对肠道屏障施加控制（图 1.1）^[56, 57]。此外，无菌小鼠或常规小鼠，无论是瘦型还是肥胖和 T2DM 模型，都显示出具有特定的肠道菌

群和内源性大麻素系统。反过来,宿主的内源性大麻素系统也可以调节肠道菌群的组成和活性,并通过肠-脑轴调节脂肪组织褐变、能量消耗和食物摄入^[58, 59]。

(4) 色氨酸代谢物和 AhR 配体

肠道菌群衍生的色氨酸分解代谢物在几个模型中与食欲调节有关(图 1.1)。色氨酸是一种必需氨基酸,用于蛋白质合成^[60]。此外,色氨酸在肠道菌群对体重和代谢的影响中起着关键作用,有研究表明,色氨酸和相关代谢物能够向局部(肠粘膜)和远处器官(包括大脑)发出信号^[61, 62]。几种肠道菌群衍生的色氨酸代谢物,如色胺、吲哚-3-乙酸和吲哚-3-丙酸,是芳烃受体(AhR)的天然配体,是环境和生理信号的传感器,也是肠道屏障完整性、免疫和代谢的有效调节剂^[63]。

代谢综合征患者的粪便样本显示色氨酸代谢物水平低,这种表型与 AhR 活性降低有关。肠道菌群产生 AhR 配体的能力下降导致粘膜屏障完整性缺陷和 GLP1 分泌减少(图 1.1),最终可能促进代谢综合征、T2DM、BMI 升高和高血压的发生^[64, 65]。

(5) 脂多糖(LPS)

2007 年,在肥胖的背景下,特定的细菌成分如脂多糖(LPS)被确定为源自肠道菌群的循环炎症因子^[66]。脂多糖在高脂饮食小鼠中引起的低度炎症和胰岛素抵抗的能力导致了代谢性内毒素血症的概念^[67]。

重要的是,代谢性内毒素血症现在被认为是一系列慢性疾病的病理特征,包括肥胖、2 型糖尿病、非酒精性脂肪性肝病、慢性肾病和动脉粥样硬化^[68]。随后,来自某些细菌的 LPS 被发现通过拮抗 toll 样受体促进代谢有益的内毒素血症状态,从而抵消代谢有害的内毒素血症^[69]。且来自不同类型细菌的 LPS 可以相互作用,因此,在评估对宿主代谢的影响时,应考虑这些相互作用。

1.2.3 色氨酸代谢在肠道菌群中的角色

色氨酸是一种必需的芳香氨基酸,由一个 β 碳连接到一个吲哚基团的 3 位。在 20 种常见的典型氨基酸中,色氨酸是分子量最大的。虽然色氨酸是蛋白质和细胞中含量最少的氨基酸,但它是大量微生物和宿主代谢产物的生物合成前体^[70]。

膳食色氨酸可被肠道微生物群直接转化为 AhR 配体,能够调节局部和远处宿主功能,包括免疫稳态和屏障生理。肠道微生物群也影响产生犬尿氨酸的通路,该通路在炎症机制、免疫反应和神经生物学功能中起关键作用^[71]。外周肠嗜铬细胞产生的血清素也受到肠道微生物群的影响。肠道产生的血清素有许多局部作用,比如刺激肠道运动,而且,即使它没有穿过血脑屏障,肠道菌群也会通过调节色氨酸和色胺的可用性间接影响中枢血清素途径^[71](图 1.2)。

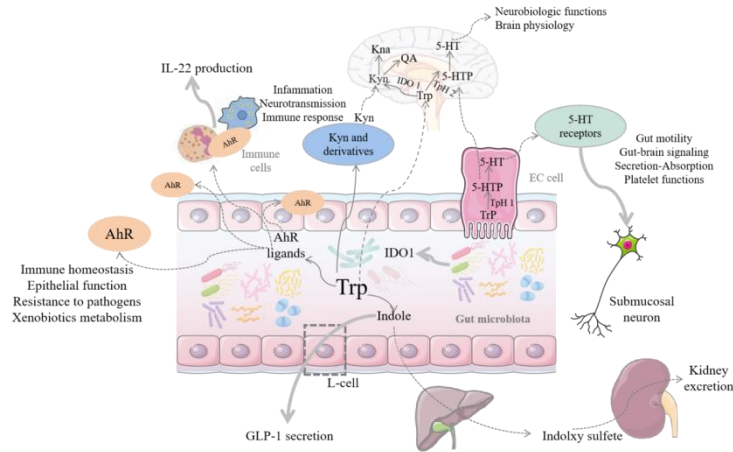


图 1.2 肠道菌群调控下的宿主生理中的色氨酸代谢

Fig 1.2 Tryptophan metabolism in host physiology regulated by intestinal flora

色氨酸在肠道中的代谢主要有三种途径（图 1.3）。①肠道微生物群将色氨酸直接转化为几种分子，包括 AhR 的配体；②免疫细胞和上皮细胞通过吡啶胺 2,3-双加氧酶 1 (IDO 1) 的犬尿氨酸途径；③肠染色质细胞通过色氨酸羟化酶 1 (TpH1) 产生血清素的途径^[72]。

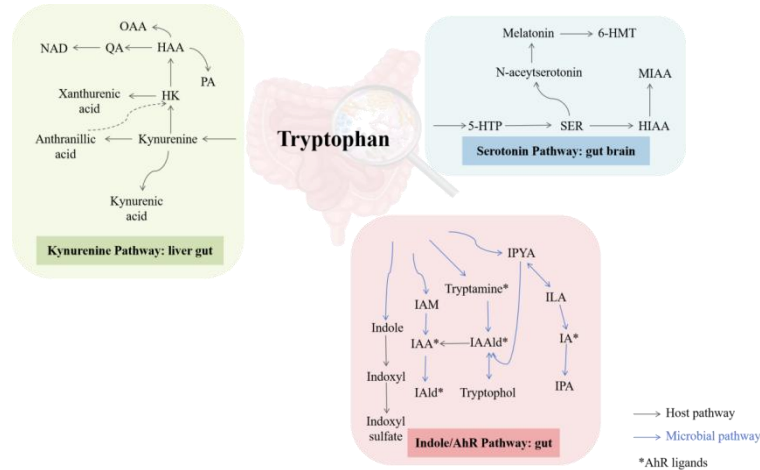


图 1.3 色氨酸代谢途径：犬尿氨酸、吡啶/AhR 和血清素代谢途径

Fig 1.3 Tryptophan metabolic pathways: kynurenine, indole/AhR and serotonin pathways

（1）微生物对色氨酸的直接代谢

色氨酸在肠道中的代谢包括肠道微生物将色氨酸直接转化为多种分子，如吡啶及其衍生物。许多吡啶衍生物，如吡啶-3-甲醛 (IAld)、吡啶-3-乙酸 (IAA)、吡啶-3-丙酸 (IPA)、吡啶-3-乙醛 (IAAld) 和吡啶丙烯酸 (IA)，都是 AhR 的配体。AhR 信号被认为是屏障部位免疫反应的关键组成部分，因此通过作用于上皮

细胞更新、屏障完整性和许多免疫细胞类型，如上皮内淋巴细胞、Th17 细胞、先天淋巴样细胞、巨噬细胞、树突状细胞和中性粒细胞，对肠道内稳态至关重要^[73]。AhR 可由膳食分子和异种生物制剂直接激活。此外，许多 AhR 配体被细胞色素 P450 家族蛋白加工和失活，如 Cyp1A1，它是 AhR 的直接转录靶标，构成了 AhR 信号传导的反馈回路^[74]。

（2）犬尿氨酸途径

在肠道中，通过犬尿氨酸途径的色氨酸代谢由限速酶双加氧酶 1（IDO1）介导，并导致犬尿氨酸（Kynurenine, KYN）和下游产物如喹啉酸（QA）、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）和犬尿酸（kynurenic acid, KYNA）的产生^[74, 75]。肠道菌群在刺激 IDO1 活性方面具有关键作用，已被应用在无菌和抗生素治疗的小鼠中。犬尿氨酸途径终产物参与许多宿主生物过程的调节，包括神经传递、炎症和免疫反应^[75]。

（3）5-羟色胺（5-HT）通路

神经递质 5-HT 在大脑中通过色氨酸羟化酶 2（TpH2）产生，在其中起着重要作用。然而，人体 90% 以上的 5-HT 是在肠道中产生的，尤其是肠色素细胞(肠上皮细胞的一种特殊亚型)。这个过程是通过 TpH1 发生的，它产生 5-羟色氨酸，5-羟色氨酸进一步代谢成 5-HT^[76]。

肠道菌群是肠道 5-HT 产生的主要参与者^[77]。它的作用已在无菌小鼠中得到证实，这些小鼠在结肠表现出 5-HT 的产生受损，血液中 5-HT 的浓度较低。肠道菌群调节 5-HT 产生的机制尚不完全清楚，但已经提出了短链脂肪酸在刺激 TpH1 表达中的作用^[77]。此外，一些次生胆汁酸，如微生物对胆酸的生物转化产生的脱氧胆酸，也可以刺激 5-HT 的生物合成^[78]。

1.3 代谢组学技术及其应用

代谢组学是一门快速发展的研究领域，它涉及对生物样品中的低分子量代谢物（通常 ≤ 1500 Da）的全面分析^[79]。这些代谢物包括中间代谢产物和最终代谢产物，是生命活动的直接反应，并反映了生物体对环境变化的动态响应^[80]。代谢组学通常被分为两个主要类别：非靶向代谢组学和靶向代谢组学^[81]。靶向代谢组学专注于对特定化学类别的一种或几种预选代谢物进行定量分析，而非靶向代谢组学则旨在进行综合分析，鉴定并表征尽可能多的代谢物^[82, 83]。

代谢组学的应用非常广泛，它在临床分析、药物开发、营养学、环境检测、法医毒理学以及对微生物的代谢分析等众多领域中发挥着关键作用^[84-87]。通过代谢组学研究，科学家们可以了解疾病机理、发现疾病生物标志物、评估药物治疗的效果和安全性、优化作物品质以及评价环境污染对生物体的影响等。

代谢组学研究常用的技术包括：（1）气相色谱-质谱法（GC-MS）：利用气

相色谱进行代谢物的分离并通过质谱进行检测^[88]。(2)液相色谱-质谱法(LC-MS):借助液相色谱进行分离和质谱进行鉴定,适用于不能挥发的大分子化合物^[89]。(3)核磁共振(NMR):利用核磁共振特性进行代谢物的鉴定和定量,优点是样品准备简单且不破坏样品^[90]。(4)毛细管电泳-质谱:适用于极性和带电代谢物的分析^[91]。(5)二维色谱-质谱法:结合了两种色谱分离机制,提供了更完善的分离能力^[92]。(6)基于稳定同位素示踪剂的代谢组学:通过标记特定的代谢物来追踪其代谢过程^[93]。

当今,代谢组学已被用于分析和全面分析复杂生物或发酵系统中的代谢物^[94]。在发酵过程中,次生代谢物可能会影响细菌生长,从而影响整体代谢^[95]。这些代谢物的变化有助于建立代谢网络并推测其功能。Klevorn & Dean^[96]已经使用代谢组学来分析代谢谱,并探索发酵豆浆和豆渣提取物的重叠代谢物。在最近的研究中,Gao 等^[97]采用 NMR 技术和 UHPLC-Triple-TOF-MS/MS 技术检测枯草芽孢杆菌 BSNK-5 发酵豆浆的代谢谱以及探索高重叠代谢产物。Gupta & Chen^[98]采用定性 LC-QTOF-MS 代谢组学分析了发酵豆渣提取物中检测到的异黄酮苷元形式的转化。Yang 等^[99]应用 GC-MS 代谢组学分析了乳酸菌厌氧固态发酵板栗后营养成分的提高。

此外,代谢组学在疾病相关研究中也广泛应用。Xu 等^[100]通过非靶向代谢组学探讨补充燕麦对轻度高胆固醇血症成人血脂的影响,研究结果表明燕麦可能是通过调节甘油磷脂、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸、鞘磷脂和视黄醇的代谢进而改善高胆固醇血症病人的血脂水平;Zhao 等^[101]使用超高效液相色谱-四极飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)探究了全谷物燕麦对高脂饮食诱导的胰岛素抵抗(IR)大鼠的干预作用,揭示了与病情改善相关的代谢产物和路径。这些研究展示了代谢组学在揭示食物成分对人体健康影响中的巨大潜力。

综上所述,代谢组学技术及其在多学科领域内的应用,不仅为深入理解各种疾病的分子机制提供了工具,还对个体化医疗和精准营养学的实现做出了重要贡献。随着技术的进步,代谢组学在预测、诊断和治疗疾病方面的作用将会更加突出。

1.4 课题研究内容与意义

1.4.1 研究意义

随着生活水平的提升,肥胖已成为全球范围内的重大公共健康问题。肠道菌群不仅影响着食物消化和营养吸收,还与免疫调节、代谢平衡紧密相关。通过调节肠道菌群,可能为治疗或预防肥胖及相关代谢疾病提供新的策略。色氨酸是一种必需氨基酸,不平衡的色氨酸代谢可能与肥胖等疾病的发生发展有关。

豆渣是豆制品加工过程中产生的副产品，通常被低估。本研究通过对豆渣进行发酵处理，可能提高其营养价值，同时为农业副产品的高效利用提供了范例，有助于推动食品工业的可持续发展。通过在小鼠模型上的研究，可以为未来的人类临床研究提供理论基础和初步数据。动物模型研究是理解疾病机制和评估潜在治疗方法的重要步骤。

综上所述，本研究不仅有助于深入理解肠道菌群和色氨酸代谢在肥胖发病机制中的作用，而且可能为开发新型的防治肥胖策略提供科学依据。同时，该研究还可能促进农业副产品的价值提升和环境的可持续发展。

1.4.2 主要研究内容

本研究主要包括以下几个方面：

(1) 发酵豆渣的制备及基于 LC-MS 代谢组学检测豆渣发酵前后代谢物质的检测。本研究使用的发酵豆渣的菌种是 *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) DC-15，来自北京生物保藏中心。首先制备发酵豆渣，干燥的豆渣磨碎后，通过 100 目筛分，然后使用 *B. subtilis* DC-15 发酵，3% *B. subtilis* DC-15 (10^9 CFU/mL) 接种无菌的豆渣底物，在摇床 (180 rpm) 上 37℃ 孵育 48 h。随后对发酵前后的代谢物进行提取，基于 LC-MS 代谢组学对豆渣发酵前后的代谢物进行分析，首先对发酵前后的代谢产物进行总体分析，接着基于 $P < 0.05$, VIP (Variable Importance in Projection) ≥ 1 筛选差异代谢物，随后对发酵与未发酵豆渣的次生代谢物进行差异分析，最后对 *B. subtilis* DC-15 发酵豆渣的代谢途径进行分析。

(2) 建立肥胖小鼠模型，将小鼠分为四组，包括正常组 (Con)、高脂组 (HF)、高脂+20%的豆渣 (HFO) 和高脂组+20%发酵豆渣组 (HFFO)，探讨发酵豆渣对小鼠肥胖的减缓作用，小鼠饲养 10 周后取样，测定肥胖相关的指标，包括体重、血糖、血脂、肝功能、血液生化指标、肝脏组织学分析、炎症因子和肠道激素的测定，以及对小鼠粪便中短链脂肪酸的含量进行测定。

(3) 对小鼠肠道菌群-色氨酸代谢物进行分析，通过 16sRNA 研究不同组小鼠肠道菌群的差异，利用靶向代谢组学分析色氨酸代谢通路中代谢物的变化，进而将肠道菌群和色氨酸代谢物进行 spearman 相关性分析，探讨肠道菌群和色氨酸代谢物的相互影响，并对色氨酸代谢中 AhR/IL-22 信号介导通路进行分析，测定了 AhR 和 IL-22 的表达量。

第二章 基于 LC-MS 代谢组学分析发酵豆渣的营养和功能特性

豆渣，作为豆制品加工的副产品，虽然富含蛋白质、纤维以及其他生物活性成分，但其直接利用受限，主要是因为营养成分的可利用性不高和口感问题。微生物发酵技术，作为一种提高食品营养和功能性的有效方法，为豆渣的再利用开辟了新路径。其中，枯草芽孢杆菌作为一种广泛认可的安全微生物，在食品发酵中展现出了强大的代谢能力，能有效改善底物的营养和功能特性。

基于液相色谱-质谱（LC-MS）的代谢组学技术在代谢物的鉴定和监测变化方面展现出了独特的优势，尤其是其高灵敏度和揭示代谢物及其生物合成途径的能力。在此项研究中，我们运用了基于 LC-MS 的非靶向代谢组学分析，旨在全面探索关注的代谢物。通过比较 *B. subtilis* DC-15 在豆渣发酵过程中不同时间点（0 h 与 48 h）的代谢物变化，我们以相对定量的方式分析了其代谢模式。进一步地，将这些变化的代谢物对应到它们的生物化学路径上，主要目的是识别生物发酵过程中被激活的关键代谢路径，如碳水化合物、氨基酸和脂肪酸等的代谢过程。

2.1 材料与仪器设备

2.1.1 材料与试剂

大豆购买于当地超市（安徽合肥）。LC-MS 级甲醇、甲酸和乙酸铵购自 Thermo Fisher（Waltham, MA, USA）。*B. subtilis* DC-15 购自北京保藏生物科技有限公司（中国北京）。LB 肉汤培养基购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

2.1.2 仪器和设备

名称	型号	生产厂家
高分辨率串联质谱仪	Q-Exactive	Thermo Scientific
全波长酶标仪	Infinite 2000 Pro	Ecan
全自动豆浆机	DJ12B-EASY101	美的（Midea）
小型粉碎机	RS-FS150	荣事达
离心机	HC-3018R	安徽中科中佳
真空冷冻干燥机	LGJ-12	北京四环

2.2 实验方法

2.2.1 *B. subtilis* DC-15 菌悬液的制备

用接种环从保藏的 *B. subtilis* DC-15 菌种斜面上取一环纯培养物接种于 100

mL LB 液体培养基中, 180 rpm 37 °C 过夜培养。取 50 mL 培养液, 4 °C、6000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加 10 mL 无菌蒸馏水打匀沉淀, 4 °C、6000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 重复两遍, 加入等体积的无菌蒸馏水恢复成菌悬液, 备用。之后配置成浓度为 10^9 CFU/mL 的菌悬液, 用于豆渣发酵^[102]。

2.2.2 豆渣发酵

在我们之前的研究和方法基础上^[18], 首先将干燥后的豆渣粉碎, 筛选通过 100 目的筛子。然后使用 *Bacillus subtilis* DC-15 发酵。随后, 使用 *B. subtilis* DC-15 对这些筛选后的豆渣进行发酵处理。具体操作是用浓度为 3% 的 *B. subtilis* DC-15 溶液 (大约 10^9 CFU/mL) 接种到无菌的豆渣基质中, 在 37 °C 的条件下, 用摇床 (转速为 180 rpm) 孵化 48 h。完成发酵处理 (48 h) 和未处理 (0 h) 的豆渣样本随后被冷冻保存在 -20 °C 冰箱中, 以待后续的代谢物提取工作。

2.2.3 代谢组学分析的样品制备

将发酵和未发酵的豆渣样本 (100 μ L) 放入 EP 管中, 然后在预冷的 80% 甲醇溶液中重悬后进行涡旋。将样品在冰上预冷 5 min 后, 以 560 rpm、4 °C 的条件下离心 20 min。取部分上清液, 用色谱纯水稀释至甲醇终浓度 53%。然后, 将样本转移到全新的 EP 管中, 在 560 rpm、4 °C 的条件下再次离心 20 min。最后, 将上清液注入液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 系统进行分析^[103]。质控 (QC) 样本: 将每个实验样本等体积混合作为 QC 样本。空白样本: 使用 53% 甲醇水溶液代替实验样品, 并且预处理程序与实验样本相同。

2.2.4 LC-MS 代谢组学分析

2.2.4.1 液相参数描述

豆渣组和发酵豆渣组样本样品分析通过使用 ACQUITY UPLC T3 使用高效液相色谱-质谱联用系统 (LC-MS) 进行。色谱柱规格为 100 mm \times 2.1 mm, 粒径 1.8 μ m。采用的流动相包含 0.1% 甲酸的水 (A 相) 和 0.1% 甲酸的乙腈 (B 相), 设定流速为 0.3 mL/min, 色谱柱温度维持在 50 °C。梯度洗脱程序设置如下: 初始至 0.8 min, B 相含量为 2%; 0.8 至 2.8 min 内, B 相从 2% 渐变至 70%; 2.8 至 5.6 min, B 相增至 90%; 5.6 至 8 min, B 相达到 100%; 之后在 8 至 8.1 min 内迅速降至 2% 并保持至 10 min。为保证数据准确性, 每 10 个测试样本中间置入一个质控 (QC) 样本, 在序列开始前放置 3 到 4 个 QC 样本, 并在最后附加 2 个 QC 样本以监测系统稳定性。在整个样本序列的最前端, 还加入了 1 到 2 个清洗 (WASH) 样本以消除交叉污染。

2.2.4.2 质谱参数描述

高分辨率串联质谱仪 Q-Exactive 用于记录洗脱代谢物的初级和次级质谱图。对于初级质谱，扫描涉及 70 至 1050 m/z 的质荷比区间，设定分辨率为 70000，自动增益控制（AGC）目标值为 $3e6$ ，注射时间最长为 100 ms。根据母体离子的强度，选取信号最强的三个离子进行进一步分裂，并收集产生的二级离子信号。

次级质谱图的分辨率定为 17500，AGC 目标设为 $1e5$ ，注射时间限制在 50 ms 以内，而碎裂能量采用阶梯式设置，依次为 20、40、60 eV。

电喷雾离子源（ESI）的参数如下调整：喷雾电压设定为 4000，无论是在正离子还是负离子模式下均是如此。此外，鞘气和辅助气流速分别设置为 35 和 10，并将传输管的温度控制在 320 °C。通过这些细致的参数设置，确保了数据的稳定性和准确性，以便执行深入的代谢分析。

2.2.5 代谢组学分析方法

质谱数据（以 raw 格式保存）上传至 Compound Discoverer 3.1.0 软件，经过一系列预处理步骤，其中包括峰值检测、校准样本之间的保留时间、合并多充电离子峰、填补数据空缺、移除背景峰和代谢物定位。依据保留时间（RT）以及质荷比 m/z ，代谢物的离子被成功鉴定。记录了每个被检出离子峰的强度，并输出相关的数据，例如分子量、保留时间、峰面积等。

进一步对照在线 KEGG 数据库，在对分子量（误差范围限于小于 10 ppm）、物质名和分子式进行精确匹配后进行化合物注释。

使用 metaX 软件来对代谢物的检出强度进行处理，消除在小于半数的质控样本或者大部分测试样本中未被检出的离子。采用 k 近邻法填补缺失的峰值数据，从而改善数据的完整性。对经过初步处理的数据进行主成分分析（PCA），以为偏差检出和批量效应的评价奠定基础。数据通过 Probabilistic Quotient Normalization（PQN）方法进行归一化处理，并采用基于质量控制样品的稳健 LOESS 信号校正（QC-RLSC）算法校正批次效应，最大限度地减少信号随时间漂移的影响。同时，评估所有质控样品中离子变异系数，淘汰变异系数 CV 超过 30% 的数据。

Student t-tests 用于识别两组样品之间在代谢物丰度方面的差异，对 Student t-tests 产生的 P 值进行假设检验率（FDR）校正以控制错误发现率（采用 Benjamini-Hochberg 法）。metaX 进一步执行监督性的偏最小二乘判别分析（PLS-DA），并通过计算变量的 VIP 值来识别组间差别。对那些显著差异的代谢物（同时满足 $ratio \geq 2$ 或者 $ratio \leq 1/2$ 、 $P \leq 0.05$ 和 $VIP > 1$ ）进行 KEGG 富集分析 [97]。

2.3 结果与讨论

2.3.1 发酵豆渣代谢概况分析

在无监督模型中，主成分分析（PCA）被采用以评估未发酵豆渣组与发酵豆渣组样本之间的整体差异性。通过 PCA 分析，我们不仅能够观察到两组样本总体分布的趋势，而且能够识别出可能存在的离群点。在 PCA 图中，每个样本被表示为一个点，样本间的聚集度和分散度通过这些点的相互位置来揭示差异性：点越聚集，表明样本间观察到的变量相似性越高；点越分散，则变量相似性越高。如图 2.1 所展示，负模型和正模型下的样本间 PCA 关系图根据第一主成分（PC1）和第二主成分（PC2）将未发酵豆渣与发酵豆渣样品分隔到不同的区域，明确突显出发酵过程的效果。在负离子模式下（图 2.1 A），PC1（63.66%）和 PC2（9.4%）共解释了 73.06% 的总方差；而在正离子模式下（图 2.1 B），PC1（58.51%）和 PC2（7.53%）共解释了 66.04% 的总方差。正离子和负离子模式下，每组样本均展现出良好的区分度，为代谢组学的生物信息学分析提供了基础。更为重要的是，发酵与未发酵豆渣组之间的显著分离，表明发酵过程显著地改变了豆渣的代谢物。

此外，Gupta 和 Chen^[98]使用代谢组学方法评估了用 *Rhizopus oligosporus* 固态发酵的豆渣提取物中大豆苷元和染料木素的增强作用。其结果表明，PC1 和 PC2 的方差分别达到了 99.64% 和 0.34%，其中 PC1 占主导地位，这表明未发酵与发酵豆渣提取物中代谢物的分布模式存在显著差异，这与我们的研究结果相一致。

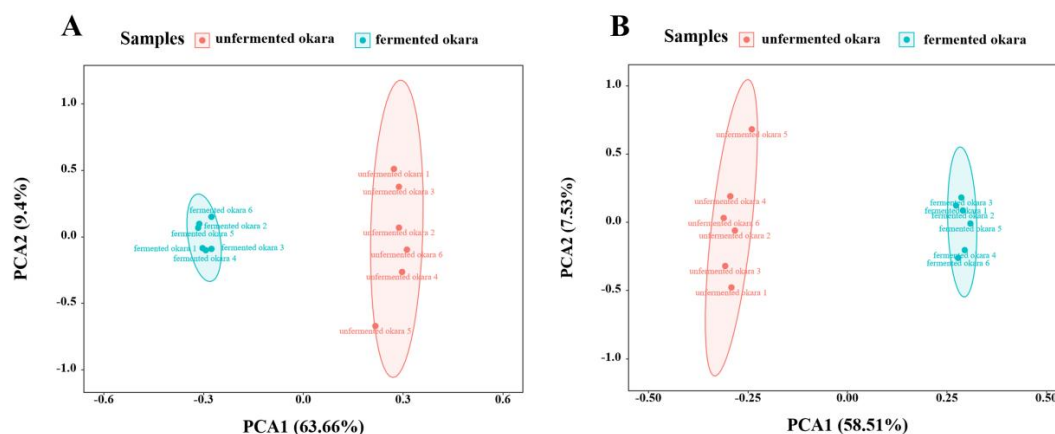


图 2.1 所有代谢物在负离子模式（A）和正离子模式（B）下的 PCA 评分图

Fig 2.1 PCA scoring plots of all metabolites in negative ion mode (A) and positive ion mode (B)

2.3.2 发酵豆渣差异代谢物分析

为了筛选差异代谢物，基于 $VIP > 1$ 和 $P < 0.05$ 被认为是显著的。火山图可以清晰地描绘出代谢物在不同样品组中差异表达的显著情况，如图 2.2 所示。共检测到 761 种差异代谢物，其中 318 种代谢物表达上调，表明发酵豆渣中代谢物含量

增加，339 种代谢物表达下调，表明发酵豆渣中代谢物含量减少。在阴性模式下，检测到 305 种差异代谢物，其中 106 种代谢物上调，157 种代谢物下调；在阳性模式下，检测到 456 种差异代谢物，其中 212 种代谢物上调，182 种代谢物下调。

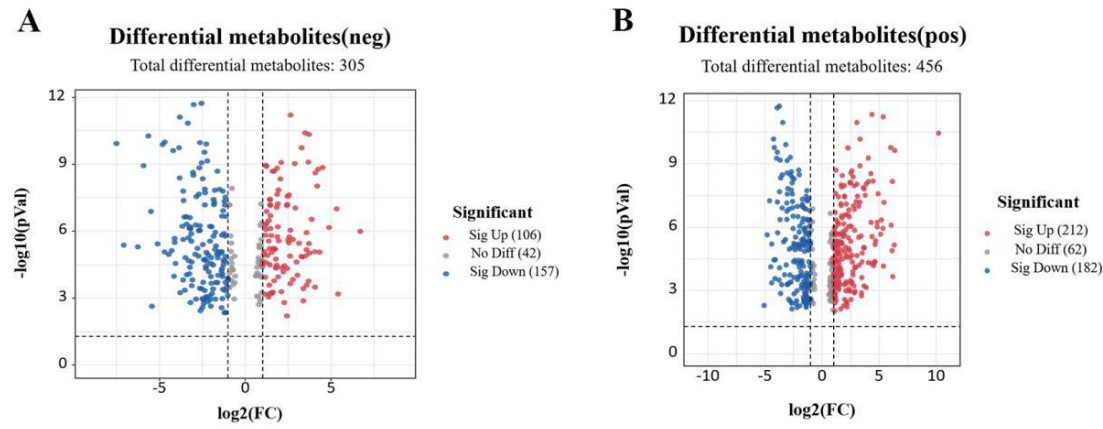


图 2.2 差异代谢物火山图

Fig 2.2 Volcano maps of differential metabolites

此外，类似的研究方法也被其他研究者应用于不同的发酵产品，如 Zhang 等人^[104]采用广泛靶向的代谢组学方法，深入分析了发酵前后蜂花粉化学成分的变化。通过火山图分析的结果显示，发酵蜂花粉和未发酵蜂花粉之间存在 668 种显著不同的代谢物，其中 444 种代谢物的表达水平上调，而 224 种的表达水平下调，从而实证了发酵组和未发酵组之间在代谢物水平上的显著差异。此外，Zhang 等人^[105]通过对比纳豆和大豆样品的差异代谢物，发现乙醇胺在大豆中具有显著较高的含量（ $P = 7.63 \times 10^{-9}$ ， $FC = 0.2$ ），他们进一步推测这可能是因为在发酵过程中，乙醇胺被 *B. subtilis* 作为碳源和氮源所利用。

通过综合利用变异显著性分析（VIP）、倍数变化（fold change，FC）和 P 值，我们筛选并鉴定了对照组与发酵组之间的差异代谢物。如表 2.1 所示，（↑）代表发酵后上调，（↓）代表发酵后下调，这些差异代谢物包括氨基酸、二肽、脂肪酸、小分子糖类物质和维生素等。此外，动态分析揭示了包括 L-组氨酸、L-赖氨酸和 L-苯丙氨酸在内的氨基酸类物质的上调，这一现象可能是由于 *B. subtilis* DC-15 产生的胞外蛋白酶活动，将大分子的粗蛋白质有效分解成更易被吸收的小分子氨基酸所致。

表 2.1 未发酵豆渣组与发酵豆渣组的差异代谢物

Tab 2.1 Differential metabolites between the unfermented and fermented okara

Metabolites	m / z	RT	Log ₂ (FC)	VIP	P	Change
L-Histidine	154.06	1.31	1.20	1.22	1.12E-09	↑

表 2.1 未发酵豆渣组与发酵豆渣组的差异代谢物 (续表)

Metabolites	m / z	RT	Log ₂ (FC)	VIP	P	Change
Ala-Ile	201.12	3.24	-5.50	1.23	1.30E-07	↓
L-lysine	145.10	1.19	1.37	1.19	3.34E-07	↑
L-Phenylalanine	164.07	4.79	0.95	1.20	4.21E-07	↑
Leu-Pro	227.14	6.85	0.75	1.16	2.36E-05	↑
5-Aminovaleric acid	116.07	1.89	2.62	1.15	2.25E-04	↑
L-Tyrosine	180.07	2.54	4.06	1.15	3.20E-04	↑
DL-Arginine	173.10	1.32	-3.19	1.10	1.57E-03	↓
Asp-Glu	263.09	1.46	-4.25	1.28	6.63E-11	↓
Gly-Phe	223.11	4.98	-3.07	1.27	6.94E-10	↓
L-Pyroglutamic acid	130.05	1.37	-2.61	1.27	4.39E-09	↓
Ala-Val	189.12	2.16	-2.62	1.27	7.85E-09	↓
Ala-Leu	203.14	3.21	-4.60	1.28	5.59E-08	↓
Nicotianamine	304.15	2.31	1.02	1.10	3.69E-04	↑
Verbascose	827.27	1.48	-2.34	1.22	1.89E-08	↓
D-(+)-Glucose	225.06	1.36	2.54	1.21	2.38E-08	↑
Stachyose	665.21	1.47	-1.37	1.19	1.49E-06	↓
D-(-)-Mannitol	181.07	1.36	4.32	1.21	8.70E-06	↑
Sucrose	341.11	1.38	0.99	1.13	4.12E-05	↑
Fumaric Acid	115.00	2.16	-3.34	1.23	1.46E-11	↓
Citric acid	191.02	2.17	-7.50	1.23	1.18E-10	↓
trans-Aconitic acid	173.01	2.80	-5.93	1.23	1.16E-09	↓
D-Mannose	198.10	1.36	3.69	1.27	1.53E-08	↑
D-Glucosamine	180.09	1.16	1.58	1.16	2.01E-04	↑
Corchorifatty acid F	327.22	6.35	-1.31	1.22	1.60E-08	↓
Sebacic acid	201.11	6.36	1.46	1.21	6.96E-08	↑
Mevalonic acid	147.07	2.88	5.31	1.22	1.00E-07	↑
Azelaic acid	187.10	5.91	1.14	1.21	5.35E-07	↑
14-Methylhexadecanoic Acid	269.25	8.20	6.69	1.20	1.03E-06	↑
Hexadecanedioic acid	285.21	6.41	0.82	1.21	4.03E-06	↑
3-Hydroxyvaleric acid	117.06	4.89	0.76	1.15	1.58E-05	↑
2-Hydroxycaproic acid	131.07	5.76	1.55	1.12	5.59E-04	↑
Sinapinic Acid	223.06	8.03	1.59	1.22	2.06E-09	↑

表 2.1 未发酵豆渣组与发酵豆渣组的差异代谢物 (续表)

Metabolites	m / z	RT	Log ₂ (FC)	VIP	P	Change
Orotic acid	155.01	1.77	-2.85	1.21	2.83E-08	↓
Vitamin C	175.02	2.44	-1.85	1.21	3.80E-08	↓
Raffinose	549.17	1.61	1.37	1.08	6.40E-04	↑
Salvianolic acid C	491.10	3.91	-2.01	1.15	1.08E-04	↓
Cucurbitacin E	279.16	2.07	1.17	1.22	2.37E-06	↑
Ganoderic acid H	573.30	5.38	2.30	1.22	3.10E-06	↑
Huperzine B	257.16	5.05	1.15	1.15	4.75E-04	↑
L-Aspartic acid	132.03	1.31	-1.72	1.08	2.00E-04	↓
L-Glutamic acid	148.06	1.36	-3.73	1.27	2.07E-08	↓
Miyabenol C	679.19	1.77	-3.25	1.21	7.42E-07	↓
Palmitoleic acid	255.23	7.88	1.17	1.08	7.72E-04	↑
Bilobalide	325.09	1.44	-2.71	1.22	2.18E-08	↓

进一步对这些鉴定出的代谢物进行 pathway 分析, 并将这些代谢物提交到 KEGG 网站进行代谢 pathway 分析, 结果如图 2.3 所示。图 2.3 显示, 485 种代谢物富集到代谢相关通路, 涉及能量代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、核苷酸代谢、萜类和多酮类代谢、辅助因子和维生素代谢等。其中 37 种代谢物被标注为碳水化合物代谢, 79 种代谢物被标注为氨基酸代谢, 22 种代谢物被标注为脂质代谢。因此, 我们主要分析了碳水化合物代谢、脂质代谢和蛋白质代谢这三条我们感兴趣的生物合成途径。

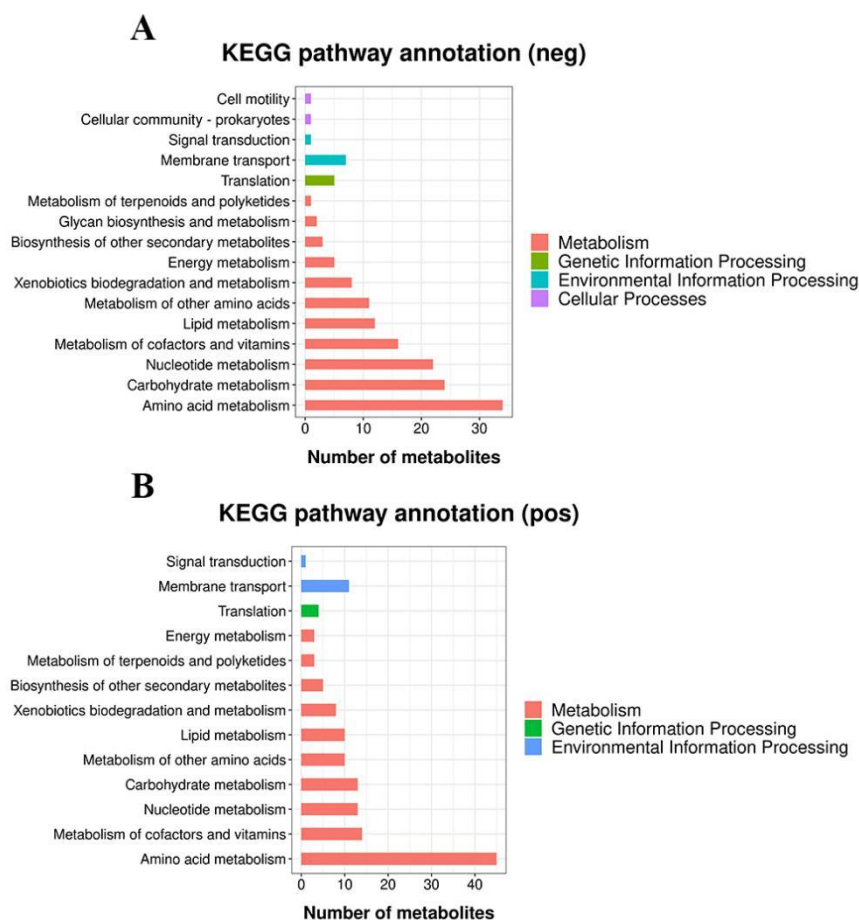


图 2.3 负离子和正离子模式下代谢物 KEGG 注释图

Fig 2.3 Metabolite KEGG annotation maps in negative and positive ion mode

2.3.3 豆渣发酵过程中次生代谢物的差异分析

2.3.3.1 豆渣发酵过程中的氨基酸、多肽及其类似物的代谢产物分析

通过应用数据挖掘和统计学中的分层聚类分析方法，我们进一步探究了发酵组和未发酵豆渣组样品间的代谢物差异，并对所有获得的热图进行了 z 评分处理。图 2.4 展现了发酵前后氨基酸、多肽及其类似物的变化情况，共计 50 种物质。特别地，如图 2.4 A 所示，一些氨基酸（例如 L-组氨酸、L-赖氨酸、L-苯丙氨酸）以及某些二肽（如 Leu-Pro）的含量，在经 *B. subtilis* DC-15 发酵处理的豆渣中得到了显著提升。这一发现与 Gao 等人^[97]在 2022 年关于 *B. subtilis* BSNK-5 发酵豆浆导致氨基酸和肽含量增加的研究结果相吻合。随着发酵时间的延长，细胞外酶的作用使豆浆中的粗蛋白质分解成更容易被人体吸收的小分子形式。进一步的，Mok 等人^[106]在 2019 年的研究中发现，*B. subtilis* WX-17 发酵后的豆渣中赖氨酸、缬氨酸、亮氨酸和谷氨酸的含量有所提高。这些研究均表明，发酵作用能够通过分解大分子并改变特定功能因子，从而促进食材的消化吸收，同时通过增加营养和功

能性小分子的含量，改善食材的营养和功能特性。

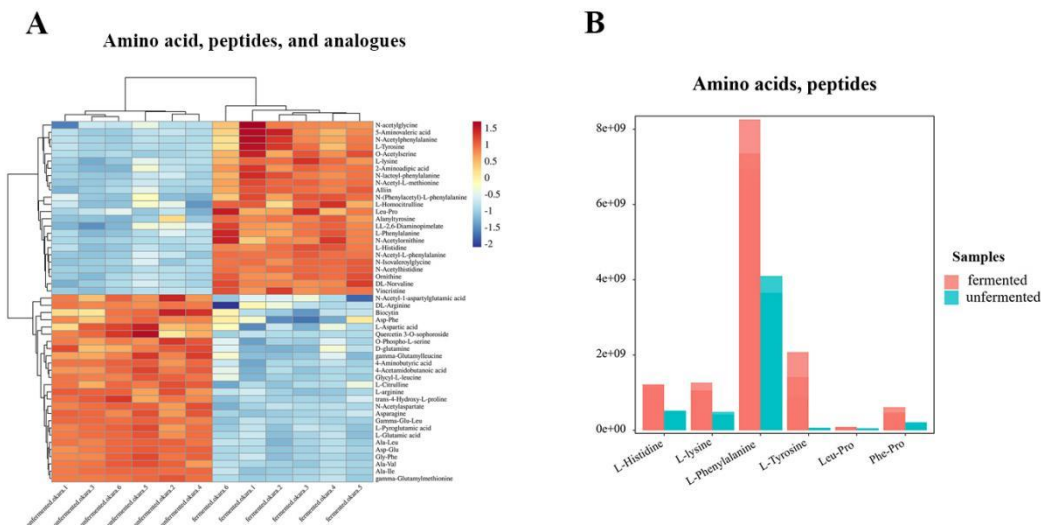


图 2.4 氨基酸、二肽及其类似物的热图 (A)，氨基酸、二肽类代谢物的丰度 (B)

Fig 2.4 Metabolite KEGG annotation maps in negative and positive ion mode

在发酵过程中，部分二肽，例如 Ala-Ile、Ala-Leu、Gly-Phe、4-氨基丁酸和 4-乙酰氨基丁酸的含量有所减少，这可能是因为它们被分解成了更小的分子—氨基酸。这种现象可能发生是因为这些二肽转化成氨基酸的速率超过了它们的生成速度。特别是对于 4-氨基丁酸和 4-乙酰氨基丁酸，它们的含量下降可能还与这些化合物被用于参与三羧酸循环（TCA），以提供 *B. subtilis* DC-15 生长所需的能量有关。

同时，图 2.4 B 展示了在发酵过程中，包括 L-组氨酸、L-赖氨酸、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸以及 Leu-Pro 和 Phe-Pro 等氨基酸和二肽含量的显著增加。具体来说，在发酵豆渣中 L-组氨酸的含量增加了 1.68 倍，L-赖氨酸增加了 2.59 倍，L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸则均增加了 1.94 倍，而 Leu-Pro 的含量增加了 1.9 倍。值得注意的是，L-组氨酸不仅拥有诸多生理功能，比如心脏保护作用，还参与到了神经系统的调节和免疫调节中，同时也参与清除代谢过程中的氧化物，并且是细胞组成成分的重要构成之一。而 L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸作为芳香族氨基酸，其中 L-酪氨酸更是可以作为治疗遗传性疾病苯丙酮尿症（PKU）的营养补充剂。本研究发现，通过发酵处理，可以有效增加豆渣中这些具有重要生理功能的氨基酸的含量。

Leu-Pro 和 Phe-Pro 作为典型的 ACE 抑制肽，具有显著的调节血压作用，这一点已被 Zhang 等人^[104]所证实。在之前的研究中，Pihlanto 等人^[107]在使用 *Lactobacillus janus* 发酵牛奶的过程中发现了这两个具有 ACE 抑制活性的活性肽。基于这些发现，本研究进一步探究了通过 *B. subtilis* DC-15 发酵豆渣可以增加降压

二肽 Leu-Pro 和 Phe-Pro 的含量,这一发现对于本研究的重要性不言而喻。

紧接着,本研究还发现通过 *B. subtilis* DC-15 发酵处理的豆渣能够显著地提高降压二肽 Leu-Pro 和 Phe-Pro 的含量。这一结果使得我们可以推测,*B. subtilis* DC-15 发酵豆渣不仅增加了含有重要生理功能的重要氨基酸和降压二肽的含量,而且还为利用发酵方法从自然资源中获取功能性氨基酸和二肽提供了坚实的理论基础。

2.3.3.2 豆渣发酵过程中的脂肪酸代谢产物分析

图 2.5 A 通过热图形式,展示了豆渣发酵前后脂肪酸及其类似物的表达模式,一共展示了 50 种脂肪酸代谢物,包括癸二酸、3-甲基戊二酸、壬二酸、14-甲基十六碳酸等,进一步揭示了不同样品中代谢物的多样性。通过对不同生物重复之间的聚类分析,发现其具有高度相似性,这强调了生物重复实验之间所达到的良好一致性。根据 Gupta 等人^[108]的研究,豆渣的脂肪含量大约在 9.3%至 10.9%之间。此外,许多研究,如 Mok 等^[12]所示,已经证明了 *B. subtilis* 能够产生脂肪酶,这种酶具有催化脂肪酸水解的能力。

图 2.5 B 呈现了几种重要脂肪酸在发酵过程中的显著变化。具体来说,癸二酸、3-甲基戊二酸、壬二酸、14-甲基十六碳酸以及棕榈油酸在发酵后的含量显著增加,其中,癸二酸增加了 2.76 倍、3-甲基戊二酸增加了 39.79 倍、壬二酸增加了 2.21 倍、14-甲基十六碳酸增加了 103.38 倍,棕榈油酸增加了 2.25 倍。这些发现与 Mok 等人^[12]的研究结果相呼应,在他们的研究中,使用 *B. subtilis* WX-17 进行固态发酵加工豆渣后,观察到总脂肪酸含量的显著增加。这些观察结果共同强调了发酵对豆渣中脂肪酸及其类似物表达模式影响的重要性,揭示了通过生物技术手段可有效改善和增强豆渣中有价值的代谢物的可能性。

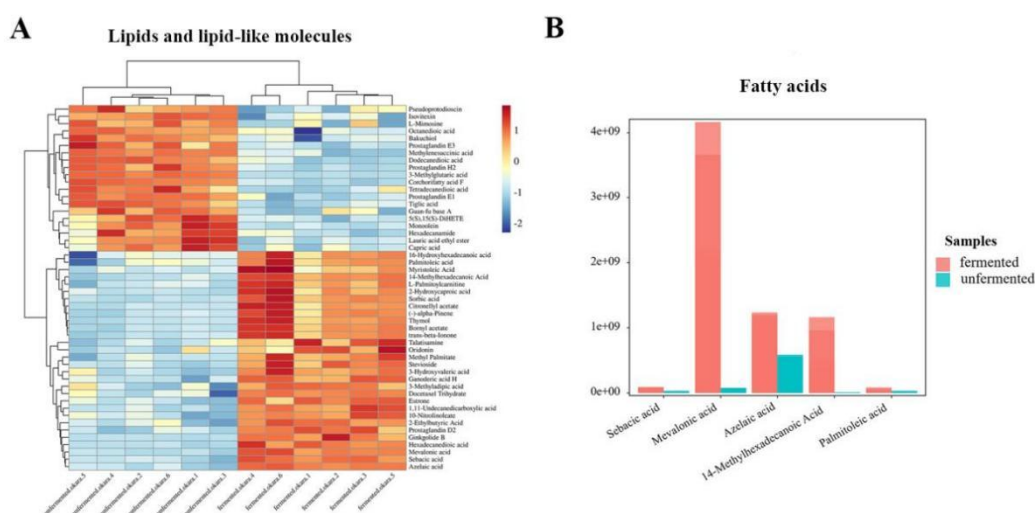


图 2.5 脂质及其类似物的热图 (A)，脂肪酸类代谢物的丰度 (B)

Fig 2.5 Heat map of lipids and lipids analogs (A), abundance of fatty acid metabolites (B)

众多研究已经揭示了通过益生菌发酵可以有效改善脂肪酸的组成和含量。例如，Zha 等^[109]运用非靶向质谱代谢组学方法，对 *Lactobacillus plantarum* P9 发酵牛奶中的大分子物质变化进行了评估。他们的发现表明，3-苯乳酸，10-酮硬脂酸，和 10-羟基硬脂酸的相对浓度在发酵后有所提高。此外，Ichikawa 等人^[14]的研究报告指出，将麦角曲霉和大豆曲霉发酵豆渣补充给高脂饮食诱导的肥胖小鼠，可以显著改善小鼠的脂质代谢。

棕榈油酸，作为 16 碳的单不饱和脂肪酸，具有突出的稳定性^[110]，并且对于多种代谢性疾病，如高脂血症、高血糖、心血管疾病和炎症等，展现出治疗潜力。Yang 等人^[111]的研究报告显示，摄入棕榈油酸的小鼠，观察到动脉粥样硬化斑块面积显著减少约 45%，甘油三酯水平下降约 40%。据 Yang 等^[112]的研究发现，高膳食棕榈油酸摄入量能够有效地控制血脂水平，预防心血管疾病的发生。而 Duckett 等人^[113]通过研究发现，棕榈油酸可以通过调节葡萄糖摄取和脂肪酸氧化相关的基因表达，从而降低循环胰岛素水平，改善胰岛素抵抗状态，对预防和减轻糖尿病的发生起到作用。本研究中，豆渣发酵后棕榈油酸的含量提高了 2.25 倍，表明芽孢杆菌处理豆渣可以显著改善豆渣的营养功能。

2.3.3.3 豆渣发酵过程中的碳水化合物及其类似物的代谢产物分析

图 2.6 A 通过热图的形式，直观地展示了豆渣发酵前后，碳水化合物及其类似物的表达模式之间的显著差异。这种对比清晰地揭示了两组样本之间在碳水化合物及其类似物表达上的变化。进一步地，图 2.6 B 突出了特定几类碳水化合物的变化情况，尤其是蔗糖、D-甘露糖和棉籽糖的含量呈现了明显的增加。我们认为，这种现象可能与豆渣中丰富的膳食纤维有关，发酵过程中产生的纤维素酶具备将复杂的大分子分解成更小的糖分子的功能。此外，豆渣的高纤维素含量是造成其口感粗糙、风味不佳的一个重要原因^[114]。通过发酵过程，将膳食纤维分解成小分子糖类，这一过程能有效地改善这个问题。而毛蕊糖和水苏糖含量的降低，可能是在发酵过程中，它们被菌株 *B. subtilis* DC-15 作为碳源进行了利用。这些发现进一步证实了发酵过程在改善豆渣营养成分方面的重要作用，尤其是在提升其碳水化合物质量和可食用性方面扮演了关键角色。

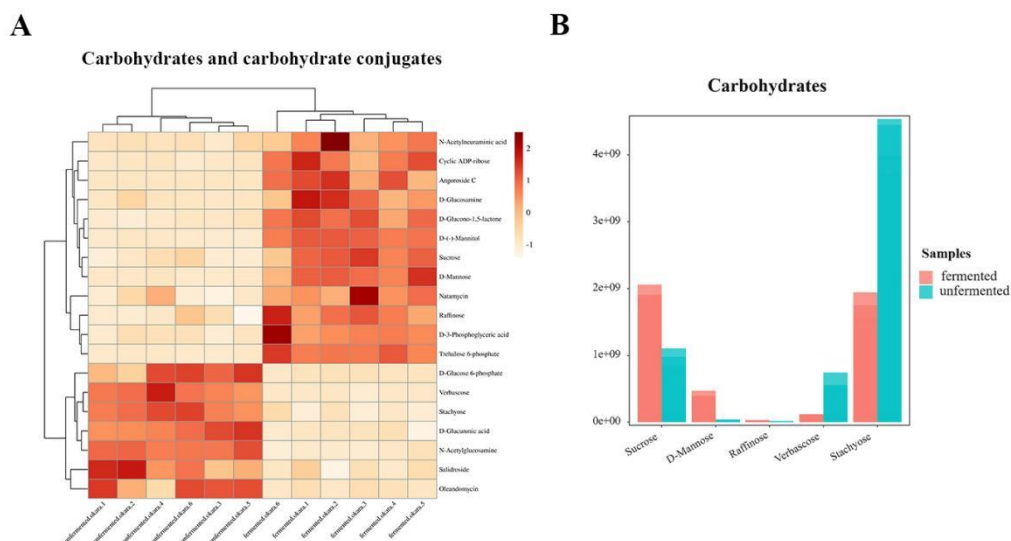


图 2.6 碳水化合物及其类似物的热图 (A)，碳水化合物类代谢物的丰度 (B)

Fig 2.6 Heat map of carbohydrates and carbohydrates analogs (A), abundance of carbohydrate-like metabolites (B)

在 Mok 等^[12]的研究中，通过对 *B. subtilis* WX-17 发酵后的豆渣进行代谢组学分析，他们报道了一个发现，即所有种类的碳水化合物含量均有所下降。这一结果与我们的发现存在差异，这种不同可能源自于使用的发酵菌株和发酵方法的差异。

D-甘露糖是一个在人体代谢过程中扮演重要角色的中间产物，它参与到某些分泌蛋白和糖蛋白的合成过程中^[115, 116]。据研究显示，人体中大约 2% 的 D-甘露糖会被转化为糖原，作为能量存储的一种方式^[116]，而剩余的 D-甘露糖则作为产生 D-果糖六磷酸的基础物质。因此，当人体摄入 D-甘露糖时，血糖浓度并不会出现升高^[115]。此外，D-甘露糖已经被用于治疗多种常见疾病，比如代谢紊乱、糖尿病、胃肠炎和尿路感染^[117]。在我们的研究中，我们发现，通过 *B. subtilis* DC-15 进行发酵能够显著增加 D-甘露糖的含量。

低聚半乳糖，是一种具有促进双歧杆菌增殖效果的功能性低聚糖，同时属于水溶性膳食纤维。我们推测，在 *B. subtilis* DC-15 的发酵过程中，低聚半乳糖可能是由豆渣中的水不溶性膳食纤维转化而来的^[118]。

在本研究中，我们发现通过使用 *B. subtilis* DC-15 进行豆渣发酵显著改善了豆渣的营养和功能特性。具体而言，发酵过程增加了 D-甘露糖等关键碳水化合物的含量，这不仅有助于改善豆渣的口感和风味，还可能对人体健康产生积极影响。同时，发酵降低了一些不利于健康的成分含量，如毛蕊糖和水苏糖，进一步证实了发酵技术在提升豆渣作为功能性食品原料潜力方面的有效性。这些发现强调了利用微生物发酵技术对农业副产品进行生物转化的价值，为豆渣等农业副产品的

高值化利用提供了重要参考。

2.3.4 *B. subtilis* DC-15 发酵豆渣代谢途径分析

图 2.7 主要展示了涉及差异代谢物的前 20 条代谢途径的概况。紧接着，在图 2.8 中，我们可以看到与氨基酸代谢相关的途径得到了突出展示，尤其是围绕苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸以及最终涉及组氨酸代谢和精氨酸生物合成的氨基酸的代谢路径。在碳水化合物的代谢方面，涵盖了淀粉和蔗糖的代谢以及半乳糖的代谢途径。在这些过程中，我们注意到蔗糖被进一步代谢成 D-葡萄糖-6 磷酸并被运送进入糖酵解途径中，同时，D-甘露糖在半乳糖的代谢途径中被代谢成刺槐糖。此外，糖酵解过程中，通过 UDP-葡萄糖和蔗糖合酶的中间产物，蔗糖的含量得以增加。

TCA 循环，作为一系列反应，使好氧生物能够通过氧化过程释放乙酰辅酶 A 中储存的能量，产生 ATP 和二氧化碳。在本研究中，我们检测到了 TCA 循环的四个关键组成部分，包括柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸和育亨酸。值得注意的是，柠檬酸、 α -酮戊二酸和育亨酸的水平有所下降，而琥珀酸的水平却呈现上升。 α -酮戊二酸不仅参与 TCA 循环，还是氨基酸产生过程中的中间体，它产生 L-谷氨酸，并参与 D-谷氨酸和 D-谷氨酰胺的代谢。

此外，磷酸戊糖途径也显示出与若干氨基酸的代谢关联，包括苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的生物合成及组氨酸等。与未发酵豆渣组相比较，我们的数据揭示了发酵豆渣中代谢物的显著差异。这暗示着，使用 DC-15 发酵过程可以显著影响豆渣的代谢途径及其活性成分的含量。进一步地，代谢途径的差异关键地决定了发酵后代谢物的多样性。在发酵过程中，不同的代谢途径对细菌的增殖产生了一定影响，而细菌的增殖状态也相应决定了代谢物的变化情况。这种相互作用最终导致了发酵代谢物含量的增加或减少，展现了一个复杂的生物学相互作用网络。

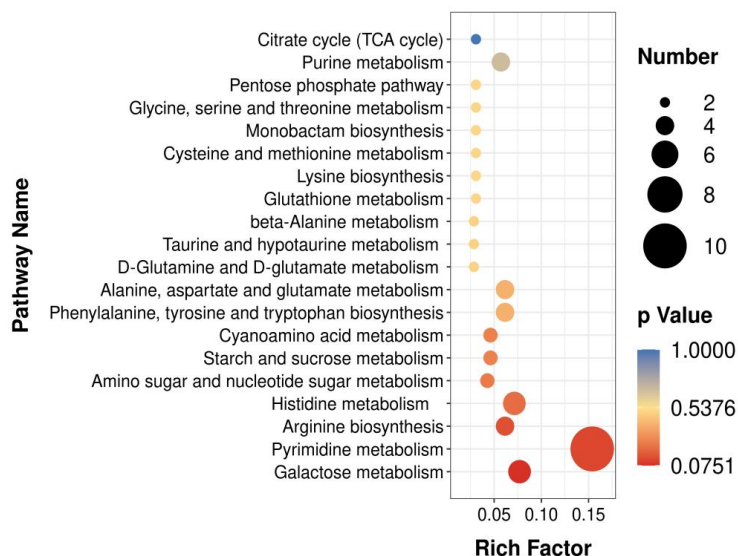


图 2.7 KEGG 富集因子图

Fig 2.7 KEGG enrichment factor map

在近年的研究中, 科学界对发酵豆渣、豆浆或牛奶中代谢途径的变化给予了特别关注。例如, Gao 等^[97]的研究对 *B. subtilis* BSNK-5 发酵豆浆进行了代谢组分析。通过 KEGG 分析, 研究富集了 14 个主要与脂质代谢和氨基酸相关的代谢途径, 这表明 BSNK-5 能够有效地将豆浆中的大分子物质降解成小分子物质。进一步地, Mok 等^[12]的工作通过研究 *B. subtilis* WX-17 发酵豆渣中的代谢途径, 报告了关于碳水化合物、氨基酸和脂肪酸的发现。他们的结果揭示了 *B. subtilis* WX-17 如何通过糖酵解的过程消耗碳水化合物, 从而为自身代谢过程产生能量, 并最终导致发酵豆渣中的氨基酸和脂肪酸含量增加。

同时, 在 Zha 等人^[109]的研究中, 探讨了 *L. plantarum* P9 发酵牛奶中的差异代谢物。他们的发现显示, 一系列化合物, 如硬脂酸、3-苯丙乳酸、10-酮硬脂酸、10-羟基硬脂酸以及其他一些生物活性分子, 在 P9 发酵牛奶中经历了显著的变化。

此外, Wang 等^[119]的研究着眼于利用 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN-3 对果汁进行发酵。通过绘制三个主要的 KEGG 代谢途径图, 他们发现总黄酮、黄酮醇和酚类化合物的含量显著增加, 从而强化了发酵果汁的抗氧化活性。这些研究共同构成了对发酵过程及其对食品成分影响的深入理解, 强调了发酵过程中代谢途径变化对提升食品营养价值和功能性的重要性。

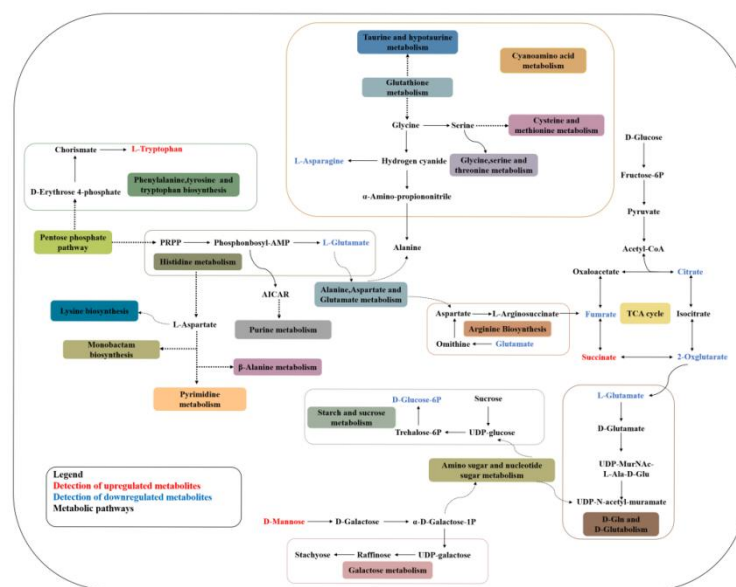


图 2.8 发酵豆渣特定代谢物与 KEGG 通路之间的代谢网络

Fig 2.8 Metabolic network between specific metabolites of fermented okara and KEGG pathway

B. subtilis DC-15 发酵豆渣的代谢途径分析提供了关于微生物发酵如何改变食

品成分的深入见解。通过详细地研究差异代谢物涉及的代谢途径,如氨基酸、碳水化合物的代谢,以及 TCA 循环和磷酸戊糖途径,该研究明确展示了发酵如何促进了特定营养和功能性成分的生物合成,同时也凸显了若干关键代谢物的含量变化。这些发现不仅揭示了代谢物多样性的增加,也指出了发酵过程中复杂的生物学相互作用网络。比较未经发酵与经过 DC-15 发酵的豆渣所显露出的显著差异,进一步证明了发酵过程的重要作用,特别是在增强食品的营养价值和功能性方面。

其他研究如 Gao 等^[97]、Mok 等^[12]、Zha 等人^[109]的工作,以及 Wang 等^[119]关于果汁发酵的研究,都进一步支撑了上述发现,即微生物发酵能显著影响食品的代谢途径,从而强化其营养和功能性特性。这些研究集体强调了微生物发酵在食品科学中的重要地位,尤其是在提升食品营养品质和生物可利用性方面,开辟了探索食品潜在健康效益的新途径。总而言之,对 *B. subtilis* DC-15 发酵豆渣代谢途径的研究,不仅丰富了我们对于食品微生物发酵过程的理解,也为进一步开发和优化具有高营养价值和功能性的发酵食品提供了科学依据。

2.4 本章小结

本章主要基于 LC-MS 代谢组学分析 *B. subtilis* DC-15 发酵豆渣的营养和功能特性。

(1) 基于 LC-MS 代谢组学数据,首先通过 PCA 分析,我们发现发酵可以显著改变豆渣的代谢物,其次基于 $VIP > 1$ 和 $P < 0.05$ 对差异代谢物进行筛选,共检测到 761 种差异代谢物,其中 318 种代谢物表达上调,339 种代谢物表达下调,对对照组和发酵组的差异代谢物进行筛选鉴定,分别为氨基酸、二肽、脂肪酸物质、小分子糖物质和维生素等物质。485 种代谢物富集到代谢相关通路,涉及能量代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、核苷酸代谢、萜类和多酮类代谢、辅助因子和维生素代谢等。其中 37 种代谢物被标注为碳水化合物代谢,79 种代谢物被标注为氨基酸代谢,22 种代谢物被标注为脂质代谢。

(2) 通过 KEGG 富集分析可以发现,差异代谢物主要涉及的前 20 条通路,包括半乳糖代谢、氨基酸代谢通路等。与氨基酸代谢相关的途径包括苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的生物合成,组氨酸的代谢,赖氨酸的代谢, β -丙氨酸的代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢以及精氨酸的生物合成。此外,还包括嘌呤代谢、嘧啶代谢和 TCA 循环。

(3) 发酵过程中使用 *B. subtilis* DC-15 可能会影响其代谢途径以及豆渣中有效成分的含量,而代谢途径的不同又决定了发酵后代谢物的不同。不同的代谢途径对发酵过程中细菌的增殖有一定的影响,而细菌的增殖也决定了代谢物的变化,二者相互作用,导致发酵代谢物的增减。

通过代谢组数据,我们的假设得到了初步的验证:使用 *B. subtilis* DC-15 进行

发酵可以显著提升豆渣中功能性物质的含量，这不仅增强了豆渣的营养品质和功能特性，而且提高了其生物可利用性。然而，尽管这些发现为我们提供了宝贵的见解，初步的代谢轮廓分析还未能揭示不同代谢物的合成或降解背后的潜在机制。这表明，我们对发酵豆渣的了解还需要进一步深化。因此，为了更全面地探究发酵豆渣对代谢的具体影响，我们将把研究视野扩展到动物模型上，具体地，将利用小鼠作为实验对象，研究发酵豆渣对其代谢的影响。这一步骤不仅是对前期研究成果的延伸，也是为了解发酵豆渣如何在生物体内发挥作用，开启深入探索其潜在机制的重要一环。

第三章 发酵豆渣对高脂饮食诱导小鼠肥胖的干预作用

在现代社会，肥胖已成为一项全球性的公共卫生问题，与多种慢性疾病如心血管疾病、2 型糖尿病（T2DM）以及某些形式的癌症等紧密相关。高脂饮食是导致肥胖的主要生活方式因素之一，因其能够促进过量脂肪积累并引起代谢紊乱。鉴于肥胖的发生与不良的饮食习惯密切相关，寻找能够调节体重和改善脂质代谢的营养干预措施成为了迫切需要解决的问题。

利用特定微生物发酵豆渣不仅能够改善豆渣的口感和营养吸收性，更重要的是，通过发酵过程可增加豆渣功能性成分，如功能性低聚糖、生物活性肽等，这些都被证明对改善肥胖和代谢问题具有积极作用。

因此，本章旨在探索发酵豆渣膳食干预对高脂饮食诱导的小鼠肥胖以及相关代谢紊乱的影响，以期为开发新型的抗肥胖食品干预策略提供科学依据。将通过研究豆渣和发酵豆渣膳食干预对小鼠体重、脂肪积累、血糖、血脂、血液生化指标、肝功能、短链脂肪酸、炎症因子和肠道激素的影响，评估其在调节脂质代谢、改善血糖血脂及抗炎作用方面的潜力，以期为发酵豆渣潜在应用提供理论支持。

3.1 材料与仪器设备

3.1.1 实验动物与饲料

实验饲料：普通合成饲料 AIN-93（Con 组饲料，江苏协同生物），饲料成分如表 3.1 所示；60%脂肪供能高脂纯化型饲料 D12492（HF 组饲料，江苏协同生物），饲料成分如表 3.2 所示。两种饲料都保存于-20 °C冰箱中。

实验动物：雄性 SPF 级的 C57BL/6J 小鼠 60 只，3 周龄，购买于江苏协同生物有限公司。

表 3.1 AIN-93 普通饲料成分表
Tab 3.1 AIN-93 General Feed Ingredient List

成分	含量
Casein（酪蛋白）	20.00%
L-Cystine（L-胱氨酸）	0.30%
Corn Starch（玉米淀粉）	39.75%
Dextrinized Cornstarch（麦芽糖糊精）	13.20%
Sucrose（蔗糖）	10.00%

表 3.1 AIN-93 普通饲料成分表（续表）

成分	含量
Alphacel, Non-Nutritive Bulk	5.00%
Soybean Oil（大豆油）	7.00%
AIN-93G Mineral Mix	3.50%
AIN-93-VX Vitamin Mix	1.00%
Choline Bitartrate（酒石酸气胆碱）	0.25%
tert-Butylhydroquinone（叔丁基对苯二酚）	0.0014%

表 3.2 高脂饲料成分表

Tab 3.2 High Fat Feed Ingredient List

成分	HF/HFO/HFFO	
	g	kcal
Casein,80Mesh（酪蛋白，80 目）	200	800
L-Cystine（L-胱氨酸）	3	12
Corn Starch（玉米淀粉）	0	0
Maltodextrin 10（麦芽糖糊精）	125	500
Sucrose（蔗糖）	68.8	275
Fructose（果糖）	0	0
CelluloseBW200（纤维素，BW200）	50	0
Soybean Oil（大豆油）	25	225
Lard（猪油）	245	2205
MineralMixS10026（混合矿物质）	10	0
DiCalcium Phosphate（磷酸氢钙）	13	0
Calcium Carbonate（碳酸钙）	5.5	0
Potassium Citrate,1H2O（柠檬酸钾）	16.5	0
VitaminMixV10001（混合维生素）	10	40

表 3.2 高脂饲料成分表（续表）

成分	HF/HFO/HFFO	
Choline Bitartrate（酒石酸气胆碱）	2	0
FD&C Blue Dye#1	0.05	0
Total（合计）	773.85	4057
	kcal%	
Protein（蛋白质）	20	
Carbohydrate（碳水化合物）	20	
Fat（脂肪）	60	

3.1.2 材料与试剂

材料及试剂如表 3.3 所示。

表 3.3 材料及试剂表

Tab 3.3 Materials and Reagents List

试剂名称	货号	生产公司
不锈钢耳标	000535	上海泽雅科教仪器有限公司
Sinocare 三诺血糖试纸	安稳+	三诺生物传感股份有限公司
Sinocare 三诺血糖仪	安稳+	三诺生物传感股份有限公司
丙氨酸氨基转移酶 ALT 测定试剂盒	BC1550	北京索莱宝科技有限公司
天冬氨酸氨基转移酶 AST 测定试剂盒	BC1565	北京索莱宝科技有限公司
甘油三酯测定试剂盒	R21740-100T	上海源叶生物科技有限公司
总胆固醇测定试剂盒	R21734-100T	上海源叶生物科技有限公司
高密度脂蛋白测定试剂盒	SNM224	北京百奥莱博科技有限公司
低密度脂蛋白测定试剂盒	GL1987	北京百奥莱博科技有限公司
通用型组织固定液	G1101	武汉塞维尔生物科技有限公司
短链脂肪酸（包括乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸和异戊酸）	SBR00030	西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司
IL-6、IL-1 β 、TNF- α 试剂盒	KFS230	北京百奥莱博科技有限公司
肠道激素试剂盒	CCM-81500	Crystal Chem

3.1.3 主要实验仪器

仪器设备相关信息如表 3.4 所示。

表 3.4 仪器设备一览表

Tab 3.4 List of Instruments and Equipment

仪器设备名称	型号	生产产家
迈瑞兽用全自动血液细胞分析仪	BC-2800 vet	迈瑞生物公司
气相色谱仪	安捷伦 7890A	安捷伦科技(中国)有限公司
石蜡包埋机	EG1160	德国莱卡
组织切片机	NVSLM1	美国 WPI 公司
电子称	CX2000	东莞南城长协电子制品厂
多功能酶标仪	SPARK	瑞士 Tecan 贸易有限公司

3.2 实验内容与方法

3.2.1 肥胖小鼠模型构建

在该研究中,所有小鼠实验程序得到了合肥工业大学动物伦理委员会的正式授权,并遵循了规定的动物实验规范。动物养护条件符合 SPF 级标准,维持在合工大动物设施内,保持相对湿度控制在 60%左右,有 12 h 的交替光周期,并且环境温度维持在 22 °C 左右。研究采用了大约 3 周龄的 60 只雄性 C57 系小鼠,每个笼子内养育 4 只小鼠,并在实验开始前提供一周的时间以适应实验室环境。过渡期后,根据之前的研究方法,例如 Li 等人^[120]的方法,将这些小鼠随机分配到四个不同实验组,每组包括 15 只小鼠:分别为对照组(Con)、高脂组(HF)、高脂 + 20%豆渣组(HFO)、高脂 + 20%发酵豆渣组(HFFO)。实验期间,小鼠可以自由取水和食物,具体的分组细节、实验模型的构建以及数据收集方法见参考图 3.1。研究期间,持续监测小鼠的健康状况和生存情况,实验初测小鼠的初始血糖值,并在每周对小鼠体重变化和食物摄入量进行记录。经过 10 周的饲养,小鼠经 12 h 禁食后,重新测量血糖,并收集新鲜的粪便样品。最终,通过 CO₂ 方式对小鼠实施无痛死亡,迅速获取血液样本以评估全血常规和血清生化指标,并称量及记录五个主要器官(肝、肾、脾、肺、心脏)的重量。

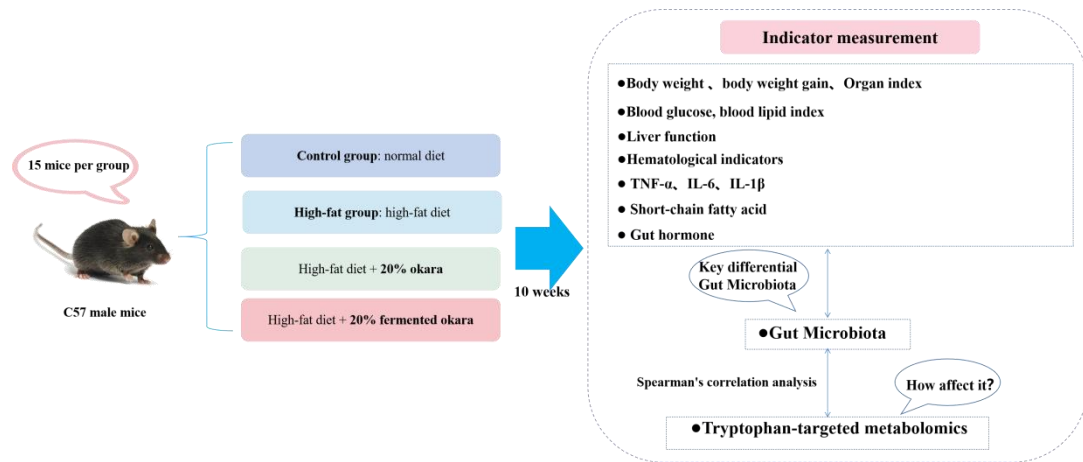


图 3.1 小鼠造模方法

Fig 3.1 Methods of mice modeling

3.2.2 体重和体重增量的测定

每周称量 4 组小鼠每只的体重，通过比较连续两次测量的体重，计算每只小鼠在此期间的体重增量。体重增量=后一次测量的体重-前一次测量的体重。

3.2.3 初始血糖和最终血糖的测定

小鼠的血糖测定使用三诺安稳免调码血糖测试仪及附带血糖试条，按照说明书进行测定。利用小刀在小鼠尾部划小口子取血，弃掉第一滴血，取第二滴血检测，记录 4 组小鼠的血糖值。

3.2.4 血脂指标的测定

室温下离心 2 h (3500 rpm, 15min) 获得小鼠血清，按照试剂盒说明书测定小鼠血脂指标，包括 TC (总甘油三酯)、TG (总胆固醇)、HDL-C (高密度脂蛋白)、LDL-C (低密度脂蛋白)。

3.2.5 脏器指数的测定

采集四组小鼠的心、肝、脾、肺、肾组织，用生理盐水清洗干净，滤纸吸干后称重。记录每只小鼠的各脏器重量，计算各脏器与体重的比值，记为脏器系数。例如：肝脏指数= (肝湿重/小鼠体重) × 100%。

3.2.6 血液生化学指标的测定

利用迈瑞兽用全自动血液细胞分析仪型号：BC-5000vet，对小鼠的全血液参数进行测定。检测指标包括：白细胞数目 (WBC)、中性粒细胞数目 (Neu)、淋巴细胞数目 (Lym)、单核细胞数目 (Mon)、嗜酸性粒细胞数目 (Eos)、嗜碱性粒细胞数目 (Bas)、中性粒细胞百分比 (Neu%)、淋巴细胞百分比 (Lym%)、单核细胞百分比 (Mon%)、嗜酸性粒细胞百分比 (Eos%)、嗜碱性粒细胞百分

比 (Bas%)、红细胞数目 (RBC)、血红蛋白 (HGB)、红细胞压积 (HCT)、平均红细胞体积 (MCV)、平均红细胞血红蛋白含量 (MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC)、红细胞分布宽度变异系数 (RDW-CV)、红细胞分布宽度标准差 (RDW-SD)、血小板数目 (PLT)、平均血小板体积 (MPV)、血小板分布宽度 (PDW) 和血小板压积 (PCT)。

3.2.7 肝脏组织切片

油红 O 染色参考 Li 等人^[120]的方法进行, 具体如下: 肝脏样本采用 4% 甲醛溶液进行固定后, 利用 15% 和 30% 的蔗糖溶液进行两段式脱水处理, 然后以冻结切片嵌入剂 OCT 进行封装, 并切制薄片。待片材复温并自然风干后, 使用 4% 甲醛溶液修复细胞涂片, 随后用 PBS 缓冲液冲洗并用油红 O 着色剂进行孵化。随后执行细胞膜破碎、清洗、油红 O 染色、染色分化并封闭制片过程。利用光学显微镜 (放大率为 20× 和 63×) 检查标本, 其中细胞核表现为蓝色, 而脂滴则显示为橙红色至鲜红色。

3.2.8 肝功能的测定

取小鼠血清, 按照试剂盒说明书进行测定。检测指标包括谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 的活性。

3.2.9 炎症因子、瘦素的测定

利用 ELISA 试剂盒测定血清中炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 和瘦素 (CCK、GLP-1、PYY) 的含量。

3.2.10 短链脂肪酸含量测定

将 1.2 mL 的 pH 值为 7.3 的磷酸盐缓冲溶液与 600 mg 冷冻干燥的粪便样本混合于 2 mL 的离心管中。在 100 r/min 的条件下搅拌 5 min 以混匀, 之后在 4 °C 下用速度为 10000 rpm 的离心机离心 5 min, 收集清液。取 200 μ L 的上层清液与 0.1 mL 的 50% 硫酸反应, 快速震荡 1 min, 静放 2 min。向该混合液中加入 0.4 mL 的高纯度乙醚, 以提取短链脂肪酸 (SCFAs), 之后通过 0.22 μ m 孔径的有机滤膜过滤液体, 进行下一步分析。为了制作标准曲线, 将六种标准的短链脂肪酸溶液进行不同浓度的稀释, 并使用气相色谱设备进行检测^[121]。SCFAs 的含量以 mg/g 粪便干重表示。

气相色谱的操作条件如下: 使用安捷伦 7980A 型气相色谱 (GC) 仪, 装有 HPINNOWAX GC 柱 (30mm \times 0.32mm, 0.5 μ m) 及配备火焰离子化检测器 (FID)。采用氮气作为载气, 氢气作为助燃气体, 设定检测器和进样口的温度为 220 °C。程序设置为: 初始温度 60 °C 维持 3 min, 然后以每分钟 3.5 °C 的升温速度加热至

190 °C，随后以每分钟 25 °C 的速度最后上升至 230 °C，总流量分流比为 5 : 1，进样体积设为 6.0 μL。

3.3 结果与分析

3.3.1 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠体重的干预效果

4 种饮食条件下，小鼠体重的变化趋势如图 3.2 所示。由图 3.2 可以看出，Con、HF、HFO 和 HFFO 组的体重和体重增加趋势相似，在 16.80 ± 0.57 g 左右，这说明实验开始时四组动物的体重相差不大。然而，经过 10 周的不同膳食干预后，各组的体重和体重增加存在显著差异。具体来说，Con 组的体重和体重增加最低，而 HF 组的体重和体重增加最高。这表明高脂饮食可能导致体重增加，这与大多数研究结果一致。

与 HF 组相比，经过豆渣和发酵豆渣的膳食干预后，HFO 和 HFFO 组的体重和体重增加均显著降低，HFO 和 HFFO 组小鼠体重分别降低了 25.10% 和 22.53% ($P < 0.05$)。这说明豆渣和发酵豆渣对高脂小鼠均有降低体重的作用，这可能与豆渣的高膳食纤维和植物蛋白特性有关。

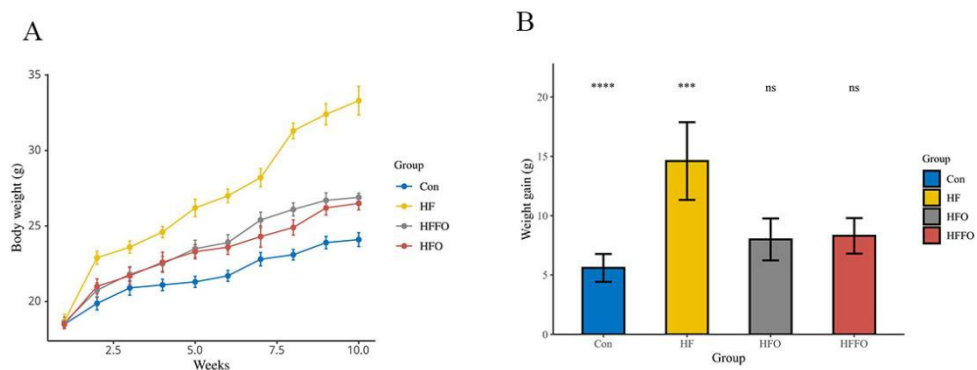


图 3.2 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠体重 (A) 和体重增量 (B) 的影响

Fig 3.2 Effect of dietary intervention with okara and fermented okara on body weight and body gain

3.3.2 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠血糖浓度的干预效果

4 种饮食条件下，小鼠的初始血糖浓度和最终血糖浓度如图 3.3 所示。由图 3.3 A 可以看出，Con、HF、HFO 和 HFFO 组小鼠的初始血糖水平无显著差异，在 7.10-7.80 mmol/L 之间 (图 3.3 A)，说明实验开始时 4 组动物的血糖水平基本相似。

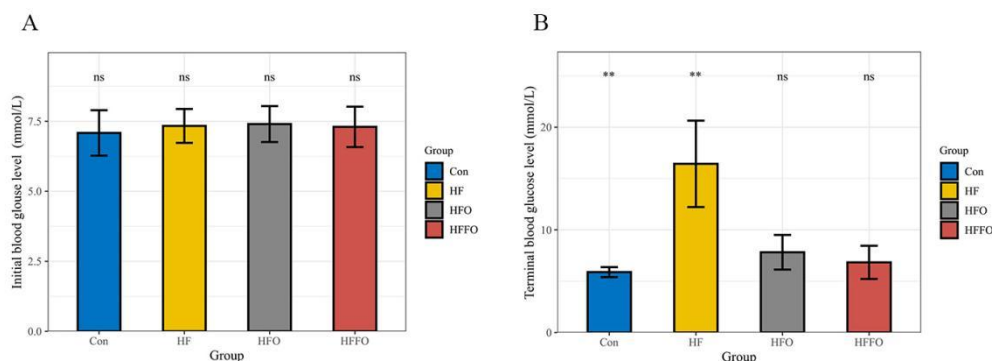


图 3.3 豆渣和发酵豆渣膳食干预后小鼠的初始血糖 (A) 和最终血糖 (B)

Fig 3.3 Effect of dietary intervention with okara and fermented okara on initial blood glucose level (A), terminal blood glucose level (B)

如图 3.3 B 所示, 经过 10 周的不同膳食干预后, HF、HFO 和 HFFO 组的终末血糖水平均显著升高, 与 Con 组相比存在明显差异。这表明高脂饮食会导致血糖水平的升高, 从而可能增加患糖尿病的风险。然而, 与 HF 组相比, 经过豆渣和发酵豆渣的膳食干预后, HFO 和 HFFO 组的血糖水平明显降低, 其中 HFO 组降低了 56.21%, HFFO 组降低了 60.90%。这表明豆渣和发酵豆渣对高脂小鼠有降低血糖的作用, 这可能是因为豆渣中含有丰富的膳食纤维和植物蛋白质, 这些成分可能有助于调节血糖水平。另外, 通过发酵, 豆渣中的一些生物活性物质可能被释放出来, 例如功能性多聚糖等, 具有更好的降血糖效果。

3.3.3 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠血脂的干预效果

4 种饮食条件下, 小鼠的血脂参数的变化如图 3.4 所示。由图 3.4 可以看出, 与 Con 组小鼠相比, HF 组的总胆固醇 (TC)、总甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平均显著升高。这表明高脂饮食会导致小鼠的血脂异常。

如图 3.4 A 和图 3.4 B 进一步分析发现, 与 HF 组相比, HFO 组和 HFFO 组的 TC 和 TG 水平显著降低, 这表明发酵豆渣与未发酵豆渣的膳食干预都可以降低高脂小鼠的 TC 和 TG 水平。

特别的是, 如图 3.4 C 和 3.4 D 所示, HDL-C 和 LDL-C 在四组小鼠中都出现相同的趋势, 即 HF 组水平最高, Con 组、HFO 组和 HFFO 组无显著差异。HDL-C 的主要作用是从血液中收集多余的胆固醇并将其输送回肝脏以进行分解。因此, HDL 被认为是“好”胆固醇, 可以帮助预防动脉粥样硬化和心血管疾病。相反, 低密度脂蛋白主要将胆固醇从肝脏输送到身体的各个部位。如果 LDL 水平过高, 它们可以在动脉壁上形成斑块, 并最终导致动脉粥样硬化和心血管疾病。在我们

的研究中，HDL-C 在 HF 组中水平最高，我们猜测这可能是高脂导致了胆固醇水平较高，使得 HDL 升高将血液中收集多余的胆固醇并将其输送回肝脏，导致脂代谢紊乱，这也与 Li 等^[120]的研究结果相一致。

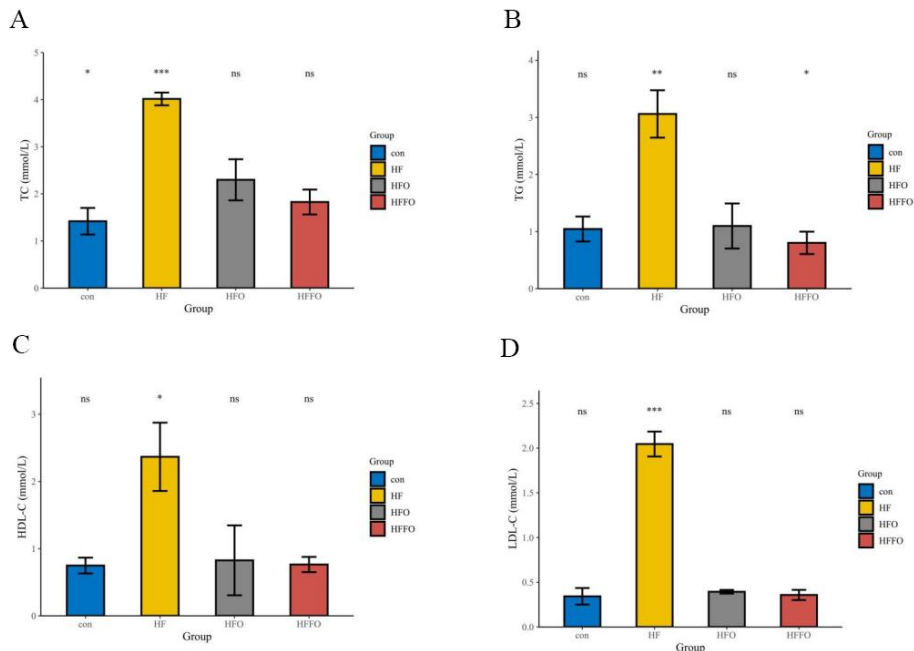


图 3.4 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠血清中 TC (A)、TG (B)、HDL-C (C) 和 LDL-C (D) 含量的影响

Fig 3.4 Effect of dietary intervention with okara and fermented okara on serum levels of TC (A), TG (B), HDL-C (C) and LDL-C (D) in hyperlipidemic mice

3.3.4 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠中脏器指数的干预效果

实验动物处死后进行解剖，称量以下器官重量：肝、肾、脾、心。相对器官重量为器官重量与体重的百分比。如表 3.5 所示，各组小鼠的心、脾、肾、肺占体重百分比差距不大，心脏为 0.56~0.58%，脾脏为 0.25~0.27%，肺部为 0.57~0.60%。但肝脏质量有所差异，HF 组小鼠肝脏指数明显高于其他组，达到了 4.60%，这意味着高脂饮食对于肝脏的影响较为显著。而与此相比，HFFO 组小鼠的肝脏指数为 3.33%。这表明通过发酵豆渣的膳食干预可以显著降低肝脏质量占比，从而减轻肝脏的负担，保护肝脏功能。这个结果对于我们进一步了解豆渣和发酵豆渣膳食对肝脏健康的影响提供了重要线索。

表 3.5 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠脏器指数的影响

Tab 3.5 Effect of dietary intervention with okara and fermented okara on organ index in hyperlipidemic mice

分组	心 (%)	肝 (%)	脾 (%)	肺 (%)	肾 (%)
Con	0.58 ± 0.05	3.07 ± 0.71	0.26 ± 0.07	0.60 ± 0.07	1.46 ± 0.20
HF	0.56 ± 0.08	4.60 ± 0.65*	0.25 ± 0.08	0.58 ± 0.07	1.40 ± 0.17
HFO	0.59 ± 0.11	3.53 ± 0.69	0.27 ± 0.08	0.59 ± 0.11	1.59 ± 0.11
HFFO	0.56 ± 0.11	3.33 ± 0.45	0.27 ± 0.04	0.57 ± 0.06	1.35 ± 0.12

3.3.5 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠血液生化指标的干预效果

表 3.6 展示了血液学指标测定结果，包括中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞的数量及其百分比分布，结果显示各实验组之间无显著差异，数值基本位于常规水平。这意味着高脂饮食对小鼠血液中血小板数量和不同类型的白细胞没有产生较大的影响。然而，高脂小鼠血液中红细胞数目、血红蛋白、红细胞积压下降明显，其中血红蛋白从 123.67 g/L 下降至 72.00 g/L，而白细胞数目提高明显，通过豆渣和发酵豆渣膳食的干预，观察到各项指标得到明显改善。这表明豆渣和发酵豆渣膳食可能具有一定的保护作用，有助于恢复小鼠的血液参数至正常水平，减轻高脂饮食带来的不良影响。

表 3.6 血液学参数

Tab 3.6 Blood biochemical parameters

血液学参数	Con	HF	HFO	HFFO
白细胞数目($10^9/L$)	7.68 ± 0.56	11.95 ± 1.29	6.46 ± 0.75	6.81 ± 1.39
中性粒细胞数目($10^9/L$)	7.01 ± 0.42	7.28 ± 0.24	7.13 ± 0.47	7.14 ± 0.60
淋巴细胞数目($10^9/L$)	1.69 ± 0.67	1.81 ± 0.83	1.60 ± 0.61	1.50 ± 0.19
单核细胞数目($10^9/L$)	1.36 ± 0.34	1.47 ± 0.25	1.26 ± 0.26	1.40 ± 0.35
嗜酸性粒细胞数目($10^9/L$)	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.04	0.05 ± 0.03	0.02 ± 0.01
嗜碱性粒细胞数目($10^9/L$)	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.07 ± 0.06	0.04 ± 0.02

表 3.6 血液学参数 (续表)

血液学参数	Con	HF	HFO	HFFO
中性粒细胞百分比(%)	1.63 ± 0.12	1.87 ± 0.71	1.53 ± 0.59	1.50 ± 0.30
淋巴细胞百分比(%)	18.27 ± 4.21	20.90 ± 3.87	19.97 ± 3.23	18.60 ± 4.40
单核细胞百分比(%)	81.70 ± 8.05	85.23 ± 4.44	80.10 ± 5.02	80.83 ± 4.10
嗜酸性粒细胞百分比(%)	0.57 ± 0.31	0.73 ± 0.31	0.60 ± 0.36	0.43 ± 0.15
嗜碱性粒细胞百分比(%)	1.07 ± 0.67	1.37 ± 0.23	1.13 ± 0.51	1.23 ± 0.81
红细胞数目($10^{12}/L$)	1.83 ± 0.61	0.55 ± 0.15	2.05 ± 0.31	1.98 ± 0.32
血红蛋白(g/L)	123.67 ± 4.04	72.00 ± 3.61	124.33 ± 6.81	124.00 ± 1.00
红细胞积压(%)	21.73 ± 1.53	2.40 ± 1.25	22.23 ± 1.69	21.93 ± 1.70
平均红细胞体积(fL)	57.60 ± 2.59	56.13 ± 5.62	53.07 ± 3.27	52.47 ± 3.65
平均红细胞血红蛋白含量(pg)	12.73 ± 3.23	16.27 ± 0.71	16.77 ± 0.96	13.63 ± 1.59
平均红细胞血红蛋白浓度(g/L)	1064.00 ± 107.95	1698.00 ± 126.11	1041.33 ± 109.10	1057.00 ± 146.24
红细胞分布宽度变异系数(%)	29.40 ± 3.44	33.17 ± 3.79	21.20 ± 1.54	30.47 ± 0.29
红细胞分布宽度标准差(fL)	71.07 ± 3.29	82.53 ± 1.71	83.77 ± 2.99	75.30 ± 1.60
血小板数目($10^9/L$)	2214.33 ± 331.93	2094.67 ± 212.49	2263.67 ± 55.90	2185.33 ± 188.61
平均血小板体积(fL)	8.93 ± 0.25	9.23 ± 0.31	8.90 ± 0.26	9.13 ± 0.06

3.3.6 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠肝功能的干预效果

小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)水平能够反映肝细胞功能的损害程度。如图 3.5 所示, Con 组的 ALT 和 AST 水平最低, 而 HF 组的 ALT 和 AST 水平则最高。这表明高脂饮食会导致肝细胞功能受损, 从而导致 ALT 和 AST 水平升高。

而经过豆渣和发酵豆渣的膳食干预后, 我们观察到 ALT 和 AST 水平明显降低, 相比于 HF 组, HFO 组 ALT 降低了 60.11%, HFFO 组 ALT 降低了 63.39% (图 3.5 A); HFO 组 AST 降低了 25.92%, HFFO 组 AST 降低了 23.11% (图 3.5 B)。这表明豆渣和发酵豆渣的膳食干预可以保护肝脏功能, 减轻对肝细胞的损害。然而,

HFO 组和 HFFO 组之间并未发现 ALT 和 AST 水平存在明显差异。这可能意味着在肝脏保护方面，豆渣和发酵豆渣的效果并没有显著差异，或者在所检测的实验条件下，发酵豆渣并没有为膳食干预增添额外的益处。

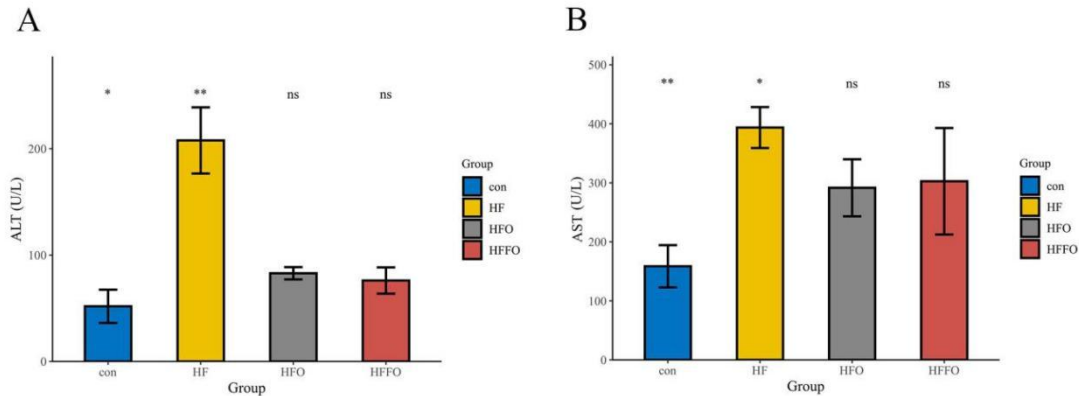


图 3.5 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠 ALT(A)和 AST(B)的影响

Fig 3.5 Effect of dietary intervention with okara and fermented okara on ALT(A) and AST(B) in hyperlipidemic mice

3.3.7 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠炎症因子的干预效果

4 种饮食条件下，小鼠的血清中炎症因子的含量如图 3.6 所示，由图 3.6 可以看出，高脂小鼠血清中炎症性细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的浓度显著增加。这一现象反映了肥胖状态下小鼠体内炎症反应的激活，揭示了肥胖与炎症之间存在直接的联系。炎症反应的持续存在，不仅促进了代谢紊乱的进一步发展，也是许多慢性疾病形成的基础。

本研究采用了 10 周豆渣和发酵豆渣的膳食干预，探究其对肥胖小鼠炎症状态的影响。结果发现，这种干预显著减轻了体内炎症因子的表达，在 HFFO 组中，炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平分别降低了 38.41%、25.09% 和 17.88%。这表明，豆渣和发酵豆渣膳食干预具有降低高脂小鼠炎症水平的作用，可能通过调节机体内的免疫反应，减少炎症因子的产生和释放。

此外，豆渣和发酵豆渣膳食，可能通过抑制炎症信号通路的激活，为减轻肥胖引发的慢性炎症状态提供了一种非药物的策略。在分子层面，我们推测豆渣及其发酵豆渣中的生物活性成分可能直接或间接地干预了 NF- κ B 等^[122]关键炎症途径的活化，从而发挥其抗炎作用。

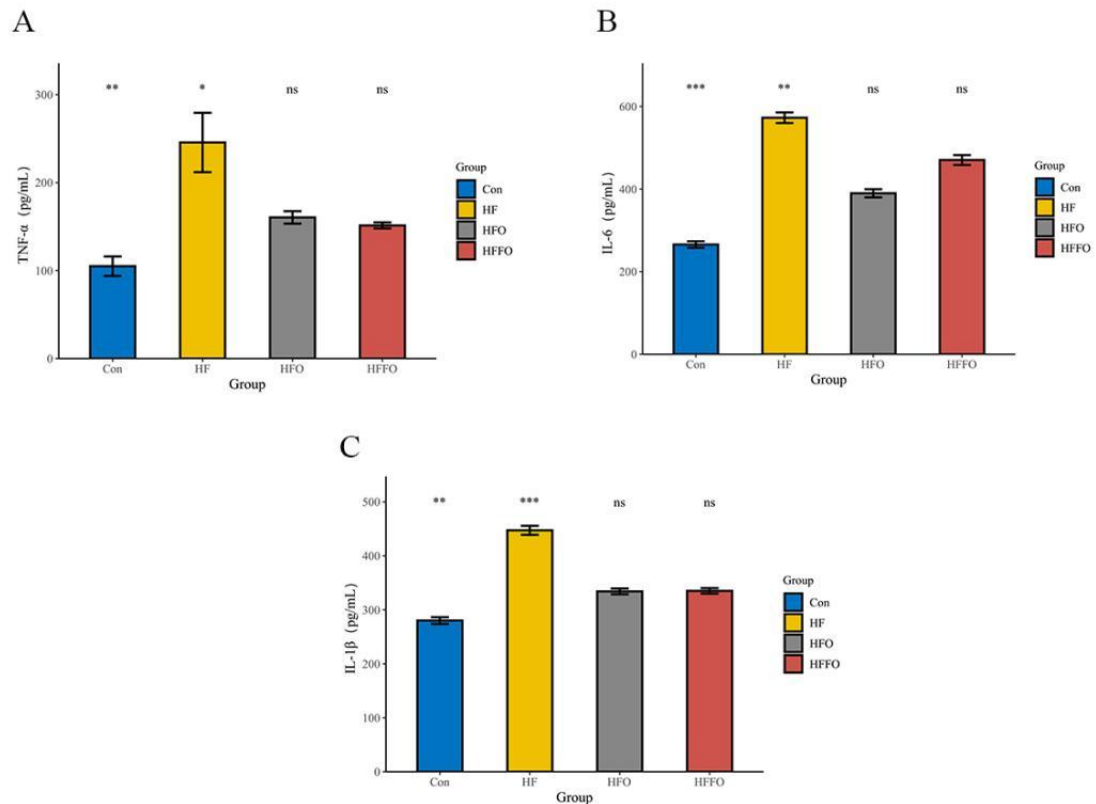


图 3.6 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠炎症因子的影响

Fig 3.6 Effect of dietary intervention with okara and fermented okara on inflammatory factors in hyperlipidemic mice

3.3.8 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠肝脏组织学形态的干预效果

本研究运用油红 O 染色技术深入探究了高脂膳食对小鼠肝脏组织脂滴积累的影响，并评估了豆渣和发酵豆渣在此过程中的干预效果。油红 O 染色是一种常用于检测和分析组织中脂质积聚状况的特异性染色方法，它能够直观地展现出脂滴的面积和数量，为我们评估脂质代谢状态提供了重要信息。

小鼠肝脏组织的油红 O 染色图片如图 3.7 所示，由图 3.7 可以看出，我们在光学显微镜（放大倍数 20 × 和 63 ×）对四组小鼠肝脏组织脂滴进行了观察，通过与 Con 组相比，HF 组小鼠的肝脏组织内显著增多的环状脂滴明确指出高脂饮食导致的显著脂质积累，这些脂滴的出现是非酒精性脂肪性肝炎（NAFLD）发病机制的关键环节之一。

进一步地，与 HF 组相比，HFO 和 HFFO 组小鼠肝脏中的脂滴面积和数量显著减少，这一发现说明了豆渣以及发酵豆渣膳食干预在减少肝脏组织脂滴积累方面的有效性。且 HFFO 组小鼠肝脏中的脂滴分布更加接近健康对照组，这表明发酵豆渣在此过程中可能具有更优异的干预效果。由此推断，发酵过程可能促进了

豆渣中生物活性成分的释放或增强了其生物可用性，从而更有效地抑制脂质在肝脏的积累，并对抗高脂饮食引起的肝损伤。

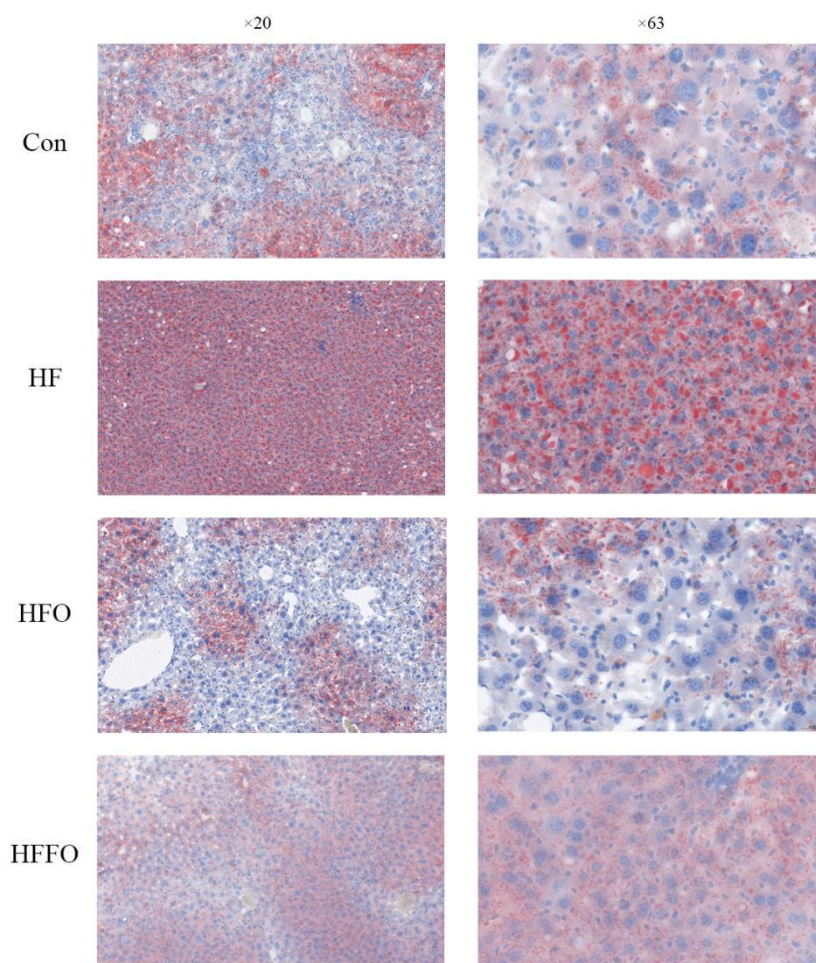


图 3.7 小鼠肝脏组织的油红 O 染色图片 (× 20, × 63)

Fig 3.7 Oil red O stained images of mice liver tissue (× 20, × 63)

3.3.9 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠粪便 SCFAs 的影响

表 3.7 描述了豆渣与发酵豆渣对高脂饮食小鼠粪便短链脂肪酸 (SCFAs) 含量 (涵盖乙酸、丙酸、己酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸和异戊酸) 的影响。数据显示, 与 Con 组相比, HF 组粪便中 SCFAs 水平显著降低 ($P < 0.05$), 其中, 乙酸、正丁酸、己酸、异丁酸、异戊酸、丙酸、正戊酸分别减少了 71.79%, 97.98%, 85.71%, 70.59%, 68.42%, 80.67% 和 68.18%。这可能反映了肠道微生物失衡及其代谢功能的下降, 进一步指出高脂饮食可能通过干扰肠道微生物的组成和功能来影响宿主的代谢健康。

而豆渣和发酵豆渣的膳食干预都逆转了 SCFAs 的降低, 尤其是发酵豆渣。HFFO 组小鼠粪便中的大部分 SCFAs 水平 (乙酸、正丁酸、异丁酸、异戊酸、正

戊酸)与 Con 组无差异。这可能归因于发酵过程中生物活性化合物的释放或增益,这些化合物可能直接或间接地促进了肠道微生物群落的健康状态。

表 3.7 4 组小鼠粪便中 SCFAs 含量 (mg/g)

Tab 3.7 SCFA content in the feces of mice in different feeding groups (mg/g)

Group	Con	HF	HFO	HFFO
乙酸	2.34 ± 0.07 ^a	0.66 ± 0.02 ^c	0.94 ± 0.02 ^b	2.02 ± 0.08 ^a
正丁酸	0.99 ± 0.05 ^a	0.02 ± 0.00 ^c	0.25 ± 0.01 ^b	0.89 ± 0.03 ^a
己酸	0.07 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^b
异丁酸	0.17 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.00 ^b	0.05 ± 0.00 ^b	0.15 ± 0.00 ^a
异戊酸	0.19 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.00 ^b	0.07 ± 0.00 ^b	0.17 ± 0.01 ^a
丙酸	1.19 ± 0.06 ^a	0.23 ± 0.00 ^d	0.34 ± 0.00 ^c	0.86 ± 0.04 ^b
正戊酸	0.22 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.00 ^c	0.13 ± 0.00 ^b	0.19 ± 0.00 ^a

3.3.10 豆渣和发酵豆渣膳食对高脂小鼠瘦素的干预效果

4 组小鼠肠道激素激素的含量变化如图 3.8 所示。胆囊收缩素 (CCK)、胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、肽 YY (PYY) 等肠道激素又称瘦素,肠道菌群通过转化色氨酸或 SCFAs 的方式,影响肠道激素的生成^[123, 124]。大多数肠道激素已被证明影响食物摄入,可分为促食欲激素,如胃饥饿素,胰岛素样肽 5 (INSL5) 和使食欲减退激素 (如 CCK, GLP-1, PYY), 它们能增强饱腹感。瘦素在脂肪组织中合成,并分泌到血液中,高浓度下可抑制摄食,增加能量消耗。色氨酸的代谢产物,吲哚,作为一种信号物质,可以调控小鼠中永生化的及初代结肠内分泌的 L 细胞释放 GLP-1。GLP-1 对于激发胰岛β细胞释放胰岛素、降低食欲以及减慢胃部排空过程扮演着至关重要的角色;这也暗示肠道生产的瘦素水平或许对食欲有潜在的影响^[125]。其他研究揭示,吲哚丙酮酸的增多与第二型糖尿病 (T2DM) 发病率的下降及胰岛素的分泌和敏感性的提升之间存在关联。这表明吲哚或许通过 L 细胞媒介的 GLP-1 增加来调节血糖代谢水平,从而对肥胖症的形成产生影响^[126, 127]。

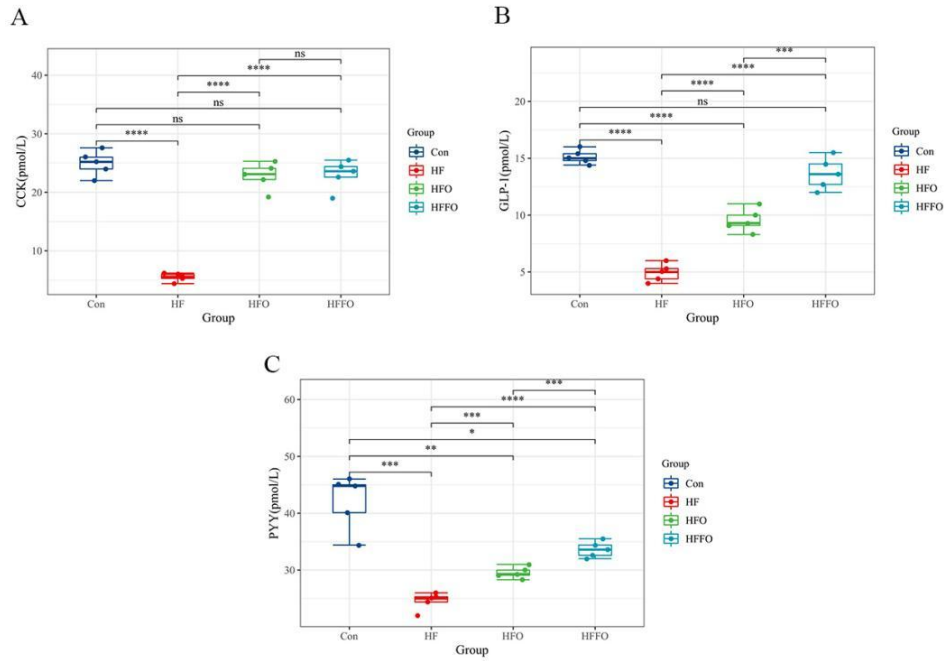


图 3.8 豆渣和发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠肠道激素的影响

Fig 3.8 Effect of dietary intervention with okara and fermented okara on intestinal hormones in hyperlipidemic mice

CCK, GLP-1, PYY 等肠道激素（瘦素）与肥胖指数呈负相关，如图 3.8 所示，三种瘦素在 Con 组中含量最高，在 HF 组中含量最低，符合科学规律；通过豆渣和发酵豆渣膳食干预，可以逆转高脂饮食引起的瘦素降低，且 HFFO 组的效果更加，与 HF 组相比，HFFO 组的 CCK, GLP-1, PYY 水平分别提高了 76.12%、63.84% 和 27.01%。值得注意的是，在 GLP-1 中，Con 组与 HFFO 组无显著差异，在 CCK 中，Con 组、HFO 组和 HFFO 组无显著差异。

3.4 本章小结

本章研究集中于探讨豆渣及发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠的影响，一方面，揭示了豆渣及发酵豆渣膳食干预在高脂小鼠中对体重管理、血糖调节、血脂管理以及保护肝脏健康方面的积极效果；另一方面，也揭示了豆渣及发酵豆渣膳食干预，可以通过改善血液学参数、保护肝功能、调节炎症因子、改善肝脏组织形态、调整肠道微生物产生的短链脂肪酸以及提升瘦素水平，展现了豆渣和发酵豆渣膳食干预在减轻肥胖及其并发症方面综合的干预潜力，这进一步强调了膳食干预在控制肥胖和维护健康方面的重要性。且相较于未发酵的豆渣，发酵豆渣膳食干预在小鼠肝脏组织学形态、短链脂肪酸、肠道激素的影响上干预效果更佳，这表明发酵过程可以增强豆渣中的生物活性化合物，改善其健康效益。通过发酵处理，豆渣中的蛋白质和纤维素等营养成分被进一步分解，产生更多的生物活性物质，

如抗氧化物质和抗炎物质，这些物质有助于调节身体内的氧化应激反应和炎症反应，对抗由高脂饮食引起的代谢紊乱。

接下来，我们将进一步深化研究视角，聚焦于肠道微生态系统-一个在肥胖及其相关并发症中发挥关键作用的领域，围绕发酵豆渣膳食干预如何通过调节肠道菌群及其代谢产物-特别是色氨酸代谢物，来发挥其作用，探究发酵豆渣对肥胖小鼠模型肠道微生物的具体影响及其机制，以及这些微生物变化如何对宿主的代谢健康产生影响。

第四章 发酵豆渣对高脂小鼠的肠道菌群及其色氨酸代谢物的调节作用

越来越多的研究揭示了肠道微生物群失衡在肥胖发展中扮演着至关重要的角色，使得针对肠道微生物群的调节成为治疗肥胖的一种新兴方法。在影响肠道微生物的多种因素中，饮食是最关键的一个。肠道微生物群的失衡不仅与肥胖紧密相关，也与糖尿病、心血管疾病等多种健康状况有关^[128]。因此，调整肠道菌群结构，提高益生菌比例及抑制有害菌的增长，对预防和治疗这些疾病至关重要。

色氨酸，作为八种必需氨基酸之一，因人体无法合成而必须通过饮食摄取。色氨酸的代谢路径有两条主要途径：一是合成组织蛋白，另一是分解代谢。血清素，一种重要的神经递质，是色氨酸经血清素代谢途径转化而来的，而通过犬尿氨酸代谢途径，色氨酸还能最终转化为烟酸、二氧化碳、犬尿氨酸和黄尿酸^[129]。此外，在肠道微生物作用下，色氨酸还能转化为吲哚、吲哚丙酸等多种物质（芳烃受体代谢途径）。色氨酸及其代谢物的作用极为广泛，包含调控免疫反应、生长发育、以及情绪行为，并对研究肿瘤、免疫系统疾病和神经系统疾病的治疗提供了重要靶点^[130]。为了更准确地研究色氨酸的代谢途径，我们开发了一种基于 LC-MS/MS 的分析方法，能够定量分析 31 种与色氨酸代谢相关的物质。

本章将深入探讨发酵豆渣通过饮食干预对高脂饮食引发的肥胖小鼠肠道菌群及其色氨酸代谢物的调节作用。研究发酵豆渣如何影响肠道菌群组成、色氨酸代谢物的变化，以及这些变化如何调控肥胖及其相关代谢指标的机制。此研究旨在为调节肠道健康以及预防和治疗肥胖及相关代谢性疾病提供新策略和理论基础。

4.1 材料与仪器设备

仪器设备如表 4.1 所示。小鼠的选择和饲养条件同第三章。采集小鼠结肠内容物以用于肠道微生物的测序和色氨酸代谢物的测定。

表 4.1 仪器与设备

Tab 4.1 Gradient elution procedure

仪器	型号	厂家
LC-MS/MS	QTRAP 6500+	SCIEX
离心机	5424R	Eppendorf
电子天平	AS 60/220 R2	RADWAG

表 4.1 仪器与设备（续表）

仪器	型号	厂家
球磨仪	MM400	Retsch
多管涡旋振荡器	MIX-200	上海静信
超声清洗仪	KQ5200E	昆山舒美
引物	Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer	New England Biolabs 公司

4.2 实验内容与方法

4.2.1 肠道菌群 16sRNA 技术分析

4.2.1.1 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

为了分析肠道微生态，我们采用了 16sRNA 测序技术。本研究从小鼠结肠提取的粪便样本（n=5）中，经 CTAB 或者 SDS 法提取了基因组 DNA。提取物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测，以评估其纯度和浓度后，稀释到 1 ng/μL 用于后续实验 [131]。

基因组 DNA 在 PCR 中成为特定区段条码引物的模板，通过高效率的高保真酶作用进行了扩增。这里使用的引物专一地匹配 16S rRNA 的 V4 区域（515 F 和 806 R）

4.2.1.2 产物的混样和纯化

对于 PCR 产物，首先通过 2%的琼脂糖凝胶进行电泳验证，之后利用磁珠法进行了纯化，并根据 PCR 产物的浓度进行混合。这些混合后的样品再次通过电泳确保质量，并从凝胶中回收目标条带。

4.2.1.3 文库构建和上机测序

建立了样本文库，使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒处理，并通过 Qubit 与 Q-PCR 进行定量。定量合格的文库随后送上 NovaSeq6000 进行测序。

4.2.1.4 信息分析部分

测序数据处理：对于测序数据的处理，使用了 Barcode 序列从原始数据中分辨样本，并截取掉引物序列。fastp 软件用于对原始测序读数（reads）进行质量控制，包括自动检测接头序列、去除含高量 N 碱基和低质量碱基的读数，以及基于碱基

平均质量低于标准的端部剪切，并丢弃长度不足的读数。然后，通过 FLASH 软件处理高质量的配对端 reads，生成质量高的 Tags。这些 Tags 序列经过比对工具 vsearch 校对，并剔除嵌合体序列。

ASV 降噪和物种注释：ASV 序列通过降噪策略生成并通过 Deblur 工具处理，再配合 Mothur 软件和 SILVA 数据库进行物种级别的注释分析，得到不同分类级别（如门、纲、目、科、属、种）的群落组成信息。所有 ASV 代表序列的比对和系统发育关系采用 MAFFT 软件实现。为了进行样本间公平比较，所有样本数据按照最低数量标准进行了均一化处理，保证 Alpha 和 Beta 多样性分析基于均一化数据进行。

4.2.2 色氨酸靶向代谢组分析方法

4.2.2.1 样本前处理

（1）取出样品（4 组小鼠的结肠内容物，每组 4 个样品）于冰上解冻（后续操作均在冰上进行）；

（2）样本解冻后，称取 50 mg 至离心管中；

（3）向离心管中加入 500 μL 甲醇溶液（含 20 μL 为 250 ng/mL 的内标工作液），涡旋 3 min 混匀后，于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 30 min；

（4）在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下，12000 r/min 离心 10 min，移取 250 μL 上清液于新的离心管中；

（5）再次离心后移取 150 μL 上清液于进样瓶中，暂存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于 LC-MS/MS 分析。

4.2.2.2 色谱质谱条件采集

数据采集仪器系统主要包括超高效液相色谱和串联质谱。

液相条件主要包括：

（1）色谱柱：Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 柱（1.8 μm ，100 mm \times 2.1 mm）；

（2）使用的流动相分为 A 相：含有 0.1% 甲酸的超纯水；B 相：含有 0.1% 甲酸的乙腈；

（3）设定流动相流速为每分钟 0.35 mL，色谱柱温度控制在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，并设置进样体积为 5 μL ；

（4）流动相梯度：0 min A/B 为 90 : 10 (V/V)，1 min A/B 为 90 : 10 (V/V)，8 min A/B 为 5 : 95 (V/V)，9.5 min A/B 为 5 : 95 (V/V)，9.6 min A/B 为 90 : 10 (V/V)，12 min 为 90 : 10 (V/V)。

质谱条件主要包括：

ESI 源温度设置为 550 °C, 正离子模式质谱电压为 5500 V, 负离子模式为-4500 V, 气帘气压定为 35 psi; 使用 Q-Trap 6500+, 同时为每个离子配对确定最适的去簇电压和碰撞能量进行检测。

4.2.3 生化分析

采用商业化 Elisa 试剂盒（武汉赛培生物科技有限公司），按照生产商的说明书来测量结肠中 IL-22 和 AhR 的表达量。

4.3 结果与分析

4.3.1 发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠肠道菌群的影响

4.3.1.1 发酵豆渣膳食干预对小鼠肠道微生物 α -多样性的影响

Observed ASV 代表直观观测到的物种数量，即 ASV 数目；Shannon 指数反映样品中的物种总数及其相对丰度，该指数越高表示群落多样性越大，物种分布越均匀；Chao1 指数用于估计样品中可能存在的物种总数。Shannon 和 Chao1 指数是评估菌群 α 多样性的常用指标，可提供关于生物群落多样性与结构的重要信息^[132]。

由图 4.1 A 的数据显示，HF 组的 ASV 数目最低，表明高脂饮食显著降低了肠道微生物的物种丰富度，且与 HF 组相比，HFO 组和 HFFO 组的 ASV 数目增加，且 HFFO 组的 ASV 数目增加更为显著，说明发酵豆渣能够有效提升由高脂饮食引起的微生物多样性损失，使 ASV 数目有所回升。

由图 4.1 B 所示的 Chao 1 指数显示，HF 组的 Chao 1 最低，Con 组、HFO 组和 HFFO 组之间的 Chao 1 指数没有显著性差异，这表明高脂饮食会导致物种总数下降，而发酵豆渣及豆渣膳食干预后物种总数得到了一定程度的修复。

由图 4.1 C 的 Shannon 指数结果来看，HF 组的 Shannon 指数最低，说明高脂饮食导致肠道微生物群落的多样性和均匀度受到显著影响。且 Shannon 指数显示，HFO 组与 HF 组之间的群落分布多样性和均匀度相似。但与 HF 组相比，HFFO 组的 Shannon 指数增加，表明其在物种多样性上的潜在改善，这可能与发酵豆渣中特定微生物产生的有益化合物有关，这些化合物可能有助于调节和优化肠道微生物群落结构。

综上所述，发酵豆渣膳食干预对改善高脂饮食导致的小鼠肠道微生物 α -多样性减少具有显著效果，不仅提高了物种的丰富度和预期物种总数，还有助于维持群落的多样性和均匀度。

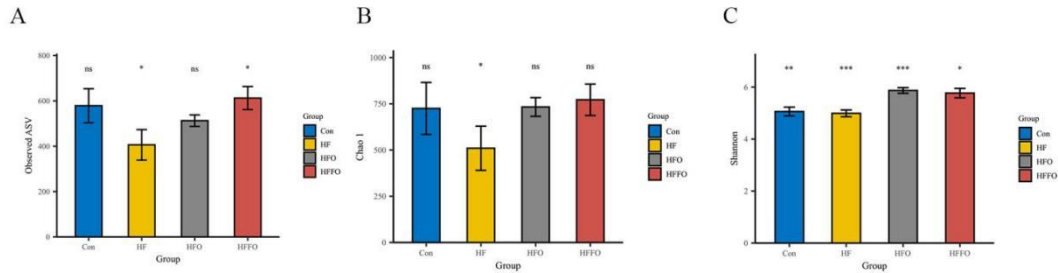


图 4.1 发酵豆渣膳食干预对小鼠肠道菌群 α -多样性的影响

Fig 4.1 Effect of dietary intervention with fermented okara on the α -diversity of gut in mice

4.3.1.2 发酵豆渣膳食干预对小鼠肠道微生物 β -多样性的影响

在 β -多样性研究进阶分析中，我们采用了加权 UniFrac 距离（Weighted UniFrac Distance）和非加权 UniFrac 距离（Unweighted UniFrac Distance）作为关键指标，用以深入衡量不同样本间在物种多样性方面的差异性。加权 UniFrac 距离考虑了物种丰度的差异，而非加权 UniFrac 距离则关注物种的存在与否，无视其丰度。因此，这两个度量标准从不同角度分析了样本间的相异性。理论上，距离值越小，意味着比较的样本在物种组成上差异越小。

本研究利用主坐标分析（PCoA）技术，基于上述两种 UniFrac 距离度量，从复杂的高维数据中提取关键信息和结构特征。通过对特征值和特征向量的排序，PCoA 分析能揭示样本间主要的差异性和相似性，进而以二维形式直观展现样本间的相对位置关系。其中，选择了贡献率最高的主坐标组合进行绘图，以确保结果具有较高的解释性和准确性。

由图 4.2 的结果显示，Con 组与 HFFO 组在图中的距离较近，表明它们的肠道微生物组成结构相对类似。相较之下，HF 组在图中的定位与其他群组显著不同，说明其肠道微生物组成差异较大。这一现象强调了发酵豆渣膳食干预在缓解高脂饮食造成的肠道菌群紊乱方面的潜在效益。由此可见，发酵豆渣膳食干预在促进肠道微生物群落结构向健康状态转变方面发挥着积极作用。

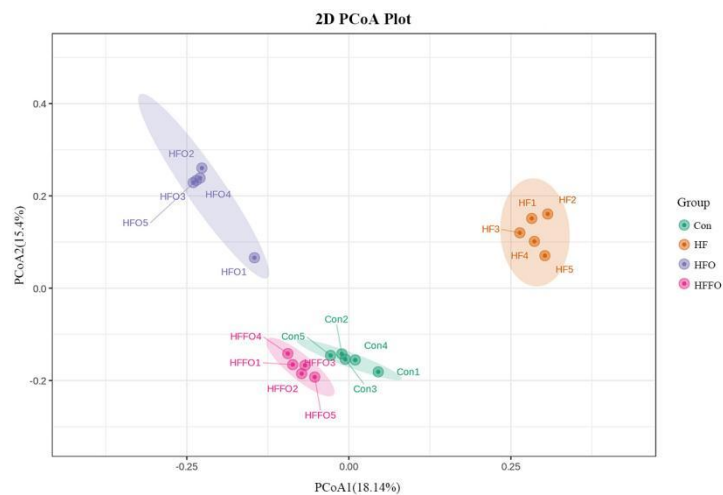


图 4.2 发酵豆渣膳食干预对小鼠肠道微生物 β -多样性的影响

Fig 4.1 Effect of dietary intervention with fermented okara on the β -diversity of gut in mice

4.3.1.3 发酵豆渣膳食干预对小鼠肠道微生物群落组成（门水平）的影响

各组小鼠门水平肠道微生物群落组成的影响见图 4.3。

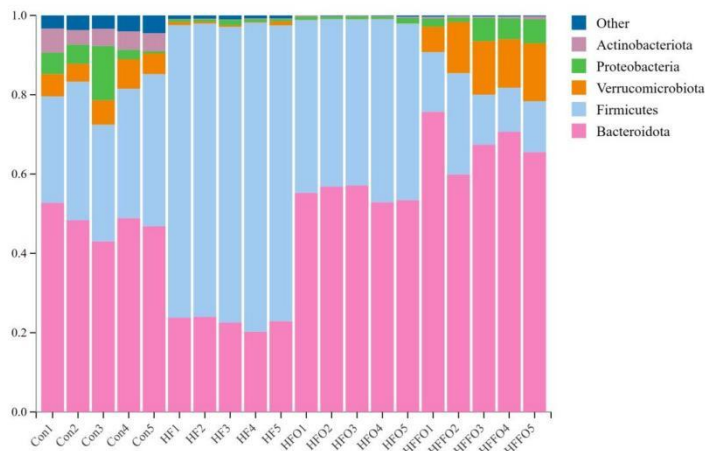


图 4.3 各组小鼠肠道菌群门水平堆积图

Fig 4.3 Mice intestinal flora phylum level stacking plots for each group of mice

由图 4.3 可知，各组小鼠结肠中肠道微生物主要由厚壁菌门、疣微菌门、拟杆菌门、放线菌门和变形菌门组成，其中主要优势菌门为厚壁菌门和拟杆菌门（78.50%~94.03%）。在肠道微生物组研究中，厚壁菌和拟杆菌的比例经常被用来评估个体的代谢健康状态。一般来说，较低的厚壁菌/拟杆菌比例被认为与较好的健康状况相关联。与 Con 组相比，HF 组的厚壁菌门相对丰度增加，拟杆菌门的相对丰度降低，疣微菌门的相对丰度降低。而与 HF 组相比，HFO 组和 HFFO 组

拟杆菌门的相对丰度增加，厚壁菌门相对丰度降低，这表明豆渣和发酵豆渣膳食干预可能对调节因高脂饮食引起的肠道微生物组成失衡有正面影响，尤其是在修复厚壁菌与拟杆菌比例上展现出了潜在的调节作用。这些变化暗示着，通过调整肠道内特定菌群的相对丰度，可以缓解高脂饮食所导致的代谢紊乱，可能是通过改善肠道微环境，促进营养物质的合理分解和吸收，以及减少炎症反应等机制实现的。

除了厚壁菌与拟杆菌外，研究中还观察到疣微菌门和放线菌门的变化，这也为评估肠道微生物多样性提供了更全面的视角。疣微菌门中的某些菌种，如阿克曼氏菌属，被认为对肠道健康尤为重要，能够增强肠道屏障、降低炎症等，进一步表明膳食干预可能通过影响这类有益菌的丰度，来促进健康。同样，放线菌门中的多种菌群，包括双歧杆菌属等，已知对促进肠道健康有积极作用，包括支持免疫功能、生产短链脂肪酸等。接下来我们继续对肠道菌群的属水平进行分析。

4.3.1.4 发酵豆渣膳食干预对小鼠肠道微生物群落组成（属水平）的影响

各组小鼠属水平肠道微生物群落组成的影响见图 4.4。

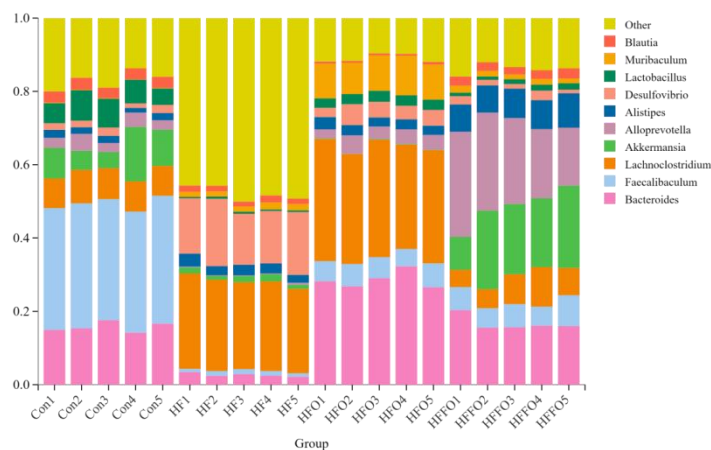


图 4.4 各组小鼠肠道菌群属水平堆积图

Fig 4.4 Mice intestinal flora genus level stacking plots for each group of mice

如图 4.4 所示，四组小鼠结肠中各菌群的丰度不同，10 种主要的菌群属分别是 *Faecalibaculum*（粪杆菌属），*Bacteroides*（拟杆菌属），*Akkermansia*（阿克曼氏菌属），*Alloprevotella*（拉瓦异普雷沃菌属），*Lachnospirillum*（梭菌属），*Alistipes*（另支菌属），*Lactobacillus*（乳杆菌属），*Desulfovibrio*（脱硫弧菌属），*Muribaculum*（鼠杆菌属），*Blautia*（布劳特氏菌属）。Con 组小鼠菌群的优势属是粪杆菌属，拟杆菌属和阿克曼氏菌属；而 HF 组小鼠菌群的优势属是拉克诺梭菌属和脱硫弧菌属，这表明高脂饮食扰乱了小鼠肠道菌群的属水平组成。HFO 组小鼠菌群的优势属是拟杆菌属、梭菌属和鼠杆菌属；HFFO 组小鼠菌群的优势属是拉

瓦氏普雷沃菌属，阿克曼氏菌属，拟杆菌属，HFO 组与 HFFO 组的优势属和 Con 组相似，这表明豆渣和发酵豆渣膳食干预具有重塑高脂饮食小鼠肠道微生物群落组成的潜力。通过对比各组小鼠的肠道微生物组成，我们可以观察到膳食干预如何影响特定菌群的丰度，这对理解肠道微生物与宿主健康之间的关系至关重要。

拟杆菌属和阿克曼氏菌属的增加：拟杆菌属和阿克曼氏菌属被认为有益于肠道健康，其中阿克曼氏菌属特别被研究用于改善肠道屏障和减轻炎症。在 HFO 组和 HFFO 组中，这两个属的相对丰度增加，可能指示了肠道微生物多样性的提升和肠道环境的改善。

梭菌属和脱硫弧菌属的变化：这两个属在 HF 组中丰度最高，而在发酵豆渣干预后，它们的丰度降低，表明发酵豆渣膳食干预可能有助于减少与炎症和肠道屏障损伤相关的菌群种类。

异普雷沃氏菌属和鼠杆菌属的变化：与 HF 组相比，这两个属在 HFFO 组中的相对丰度升高，可能与发酵豆渣的膳食纤维和其他有益组分有关，促进了这些益生菌群的增长。

4.3.1.5 发酵豆渣膳食干预对小鼠肠道微生物属水平差异性分析

发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠肠道微生物差异菌属的热图见图 4.5。

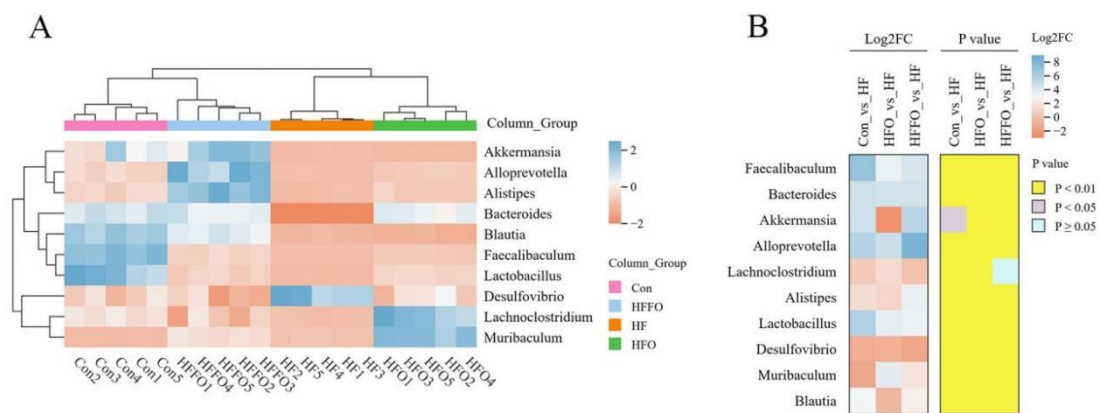


图 4.5 发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠肠道微生物差异菌属的热图

Fig 4.5 Heatmap of fermented okara dietary intervention on differential genera of intestinal flora in hyperlipidemic mice

图 4.5 A 是 10 种差异属丰度的热图，可以清晰的看出 10 种属水平在 4 组小鼠中的丰度，进而对 Con vs HF 组，HFO vs HF 组和 HFFO vs HF 组进行两两比较，计算相应的 FC 值和 P 值，如图 4.5 B 所示。在这部分的研究中，通过对肠道微生物差异属丰度的深入分析，揭示了高脂饮食及发酵豆渣膳食干预对小鼠肠道微生物组成的显著影响。通过细致的比较和统计分析，我们能够更清楚地理解这些变化对于肠道健康和代谢健康的潜在意义。

对其进行分析和筛选,我们可以发现,Con 组与 HF 组相比的最显著差异菌属为:粪杆菌属($P = 0.0000053$, $\text{Log}_2 \text{FC} = 6.88$),布劳特氏菌属($P = 0.00000679$, $\text{Log}_2 \text{FC} = 2.97$),拟杆菌属($P = 0.0000104$, $\text{Log}_2 \text{FC} = 4.60$),表明高脂饮食主要影响了粪杆菌属、布劳特氏菌属和拟杆菌属。HFFO 组与 HF 组相比的最显著差异菌属为:拟杆菌属($P = 0.0000221$, $\text{Log}_2 \text{FC} = 4.45$),另支菌属($P = 0.0000395$, $\text{Log}_2 \text{FC} = 3.35$),布劳特氏菌属($P = 0.0000256$, $\text{Log}_2 \text{FC} = 2.40$),这表明,与 HF 组相比,发酵豆渣膳食干预主要影响了拟杆菌属、另支菌属和布劳特氏菌属,拟杆菌属和另支菌属水平丰度的提高以及布劳特氏菌属的相对恢复,显示了发酵豆渣膳食干预能够对高脂饮食造成的不利影响进行一定的逆转,促进肠道微生物多样性的恢复和肠道健康的改善。这些结果强调了饮食干预在改善或逆转由不良饮食习惯所致肠道微生物失衡中的潜力。尤其是粪杆菌属和拟杆菌属的变化,不仅反映出肠道微生物群落组成的敏感性,也提示了它们可能在调节宿主代谢和免疫反应中发挥关键作用。且布劳特氏菌属的变化与肠道健康有着密切的联系,特别是其在维护肠道屏障功能和促进短链脂肪酸的产生中的作用。

综上所述,这些分析不仅提供了深入理解高脂饮食和发酵豆渣膳食干预如何影响肠道微生物群落的具体方式,也强调了调整饮食结构,尤其是通过膳食干预来改善肠道微生物多样性和功能,从而促进健康的重要性。

4.3.1.6 四组小鼠肠道微生物 LEfSe 分析

LEfSe (LDA, 线性判别分析效果大小)是一种用于发现和解释高维度生物标识(基因、通路和分类单元)的分析工具,可以用于进行两个或多个分组的比较,它强调统计意义和生物相关性,能够识别不同丰度的特征以及相关类别。LEfSe 的统计结果分别为 LDA 值分布柱状图,进化分支图。四组小鼠的肠道菌群基于 ASV 的 LDA 值分布柱状图和进化分支图如图 4.6 所示。

为了确定在不同组别之间具有差异的特定细菌群,我们进行了 LEfSe 分析,设置 LDA 得分为 2.0, LEfSe 检测了从门到属的细菌分支,并对微生物群进行了统计和相关性分析,如图 4.6 A 和图 4.6 B 所示。*Alloprevotella* (拉瓦异普雷沃菌), *Alistipes* (另支菌属)和 *Lachnospiraceae* (毛螺菌科)等在 HF 组中富集; *Firmicutes* (拟杆菌门), *Lactobacillus* (乳杆菌), *Akkermansia* (阿克曼氏菌), *Lactobacillus* (乳杆菌), 和 *Enterococcus* (肠球菌)在 Con 组中富集。且经过发酵豆渣膳食干预后,一些改善肥胖相关微生物群的丰度在增加,例如在 HFFO 组中, *Coriobacteriaceae* (红蝽菌科) UCG-002, *Rikenellaceae* (理研菌科) RC9, *Alistipes* (另支菌属), *Blautia* (布劳特氏菌属), *Oscillospirales* (颤螺菌目), *Lachnospiraceae* (毛螺菌科)和 *Roseburia* (罗氏菌属)的相对丰度增加。

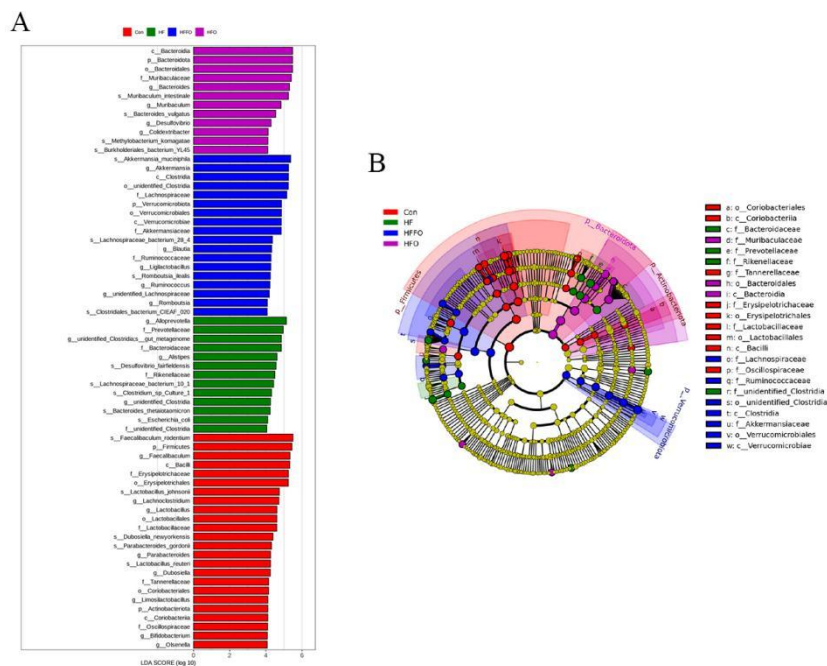


图 4.6 四组小鼠的肠道菌群基于 ASV 的 LDA 值分布柱状图 (A) 和进化分支图 (B)

Fig 4.6 Histograms (A) and evolutionary branching plots (B) of the distribution of ASV-based LDA values in the intestinal flora of four groups of mice

4.3.2 发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠色氨酸代谢物的影响

4.3.2.1 Con 组、HF 组、HFO 组和 HFFO 组小鼠色氨酸代谢物主成分分析

为了深入确定与高脂饮食相关的特征性色氨酸代谢物，我们利用 LC-MS/MS 进行了结肠内容物色氨酸的靶向代谢组学分析。首先，通过 PCA 分析，我们不仅能够观察到四组样本总体分布的趋势，还能够识别可能存在的异常点。在 PCA 图中，每个样本被表示为一个点，样本之间的集聚程度和分散程度通过这些点的相互位置反映差异性：点越接近，说明样本间观察到的变量相似性越高；点越分散，则表示变量相似性较低。正如图 4.7 所示，不同组内部相似度较高，而四个实验组之间存在显著差异，这表明 Con 组、HF 组、HFO 组和 HFFO 小鼠的色氨酸代谢物发生了明显的变化。

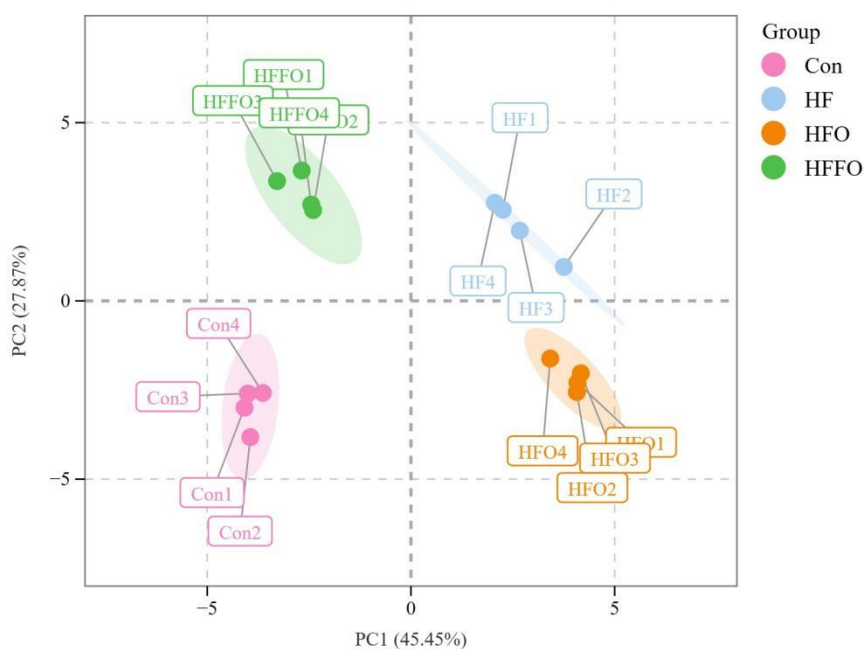


图 4.7 四组小鼠色氨酸代谢物 PCA 图

Fig 4.7 PCA plots of tryptophan metabolites in four groups of mice

4.3.2.2 Con 组、HF 组、HFO 组和 HFFO 组小鼠中色氨酸代谢物的丰度差异

我们一共检测到了 27 种色氨酸代谢物，它们在四组小鼠中的含量分布热图如图 4.8 所示，从热图中我们可以直观地看出四组小鼠中色氨酸代谢物的分布，这些代谢物被映射到了色氨酸代谢的三个途径，包括血清素途径、犬尿酸途径和吲哚/AhR 途径。总体来说，Con 组与 HF 组相比，HIAA、IPA、IAA、IGA、IA、6-HMLT、5HTOL、ILA、IAM 等物质分布差异显著；HFFO 组与 HF 组相比，Tryptophol (IEt)、IAld、IAAld、TRM、XA、HAA、QA 等物质分布差异显著。接下来，我们基于 FC 值和 P 值，分别对血清素途径、犬尿酸途径和吲哚/AhR 三条途径的差异代谢色氨酸代谢物进行筛选和分析。

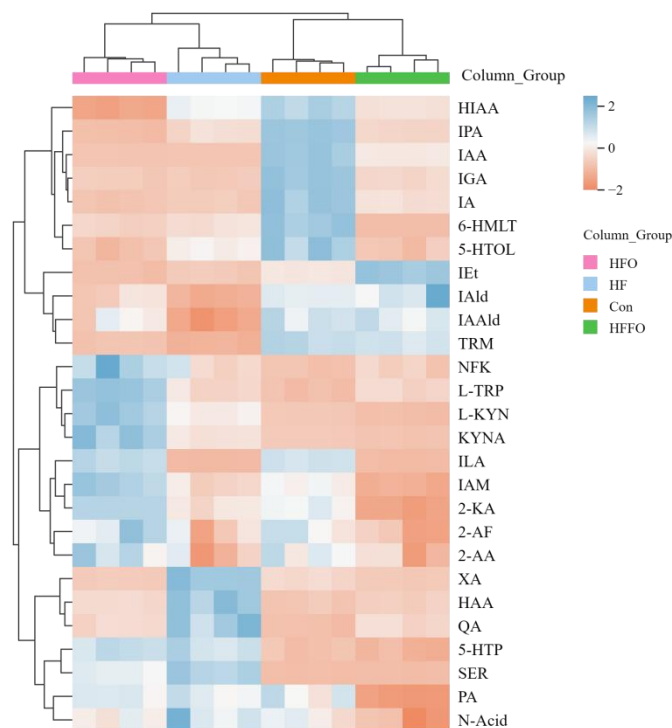


图 4.8 四组小鼠中色氨酸代谢物的丰度热图

Fig 4.8 Heat map of tryptophan metabolite abundance in four groups of mice

4.3.2.3 发酵豆渣膳食干预对色氨酸代谢物中吲哚类物质的影响

图 4.9 D 是色氨酸代谢三条通路图，包括血清素途径、犬尿酸途径和吲哚/AhR 途径。图 4.9 A 是犬尿酸途径相关代谢物的热图，包括 HAA、L-KYN、PA、QA、KYNA 和 XA，通过 Con 组与 HF 组比较、HFO 组与 HF 组比较、HFFO 组与 HF 组比较，并无发现规律性变化及差异；图 4.9 C 是血清素途径相关代谢物的热图，包括 6-HMT、5-HTP、HAA 和 SER，通过 Con 组与 HF 组比较、HFO 组与 HF 组比较、HFFO 组与 HF 组比较，也并无发现规律性变化及差异；图 4.9 B 是吲哚/AhR 途径相关代谢物的热图，包括 9 种相关代谢物，IAAlld、TRM、IEt、IAld、IA、IAA、IPA、ILA 和 IAM，通过综合 FC 值和 P 值分析，我们发现与 Con 组相比，HF 组中的 IAAlld、IAld、IA、IAA、和 Tryptophl 等物质显著降低，而与 HF 组相比，HFFO 组中的 IAAlld、IAld、IA、IAA、和 IEt 等物质显著升高，表明发酵豆渣膳食干预可以显著改变 IAAlld、IAld、IA、IAA、和 IEt 等物质，而 IAAlld、IAld、IA、IAA、和 Tryptophl 是 AhR 的配体，它们可以和 AhR 结合共同发挥抗炎作用。

在犬尿酸路径（图 4.9 A）及血清素途径（图 4.9 C）的探讨中，通过将 Con 组、HF 组、HFO 组及 HFFO 组进行对比分析（FC 值和 P 值），我们未观察到明显的规律性变化或显著性差异。这提示在这两个途径中，不同饮食类型对相关代谢物的影响似乎不具有明显的直接关联。

然而,在吡咯/AhR 途径的分析中(图 4.9 B),我们发现一种截然不同的情况。综合 FC 值和 P 值分析的结果表明,在与 Con 组相比时,HF 组中的一系列代谢物,包括 IAald、IAld、IA、IAA 和 IEt,呈现出显著的降低。这一发现意味着高脂饮食可能阻碍了这些重要代谢物的产生。更值得注意的是,与 HF 组对比,采用发酵豆渣膳食的 HFFO 组在这些关键代谢物上显示出显著提升,逆转了由高脂饮食引起的负面影响。

这类代谢物的显著改变特别重要,因为 IAald、IAld、IA、IAA、及 IEt 均是 AhR 的配体。AhR 是一种在细胞内广泛表达的配体激活转录因子,通过与其配体结合,可以影响多种生物过程,包括抗炎症响应。因此,我们的发现不仅揭示了发酵豆渣在调节色氨酸代谢的潜力,更进一步指出,这种膳食干预可能通过 AhR 途径提供了一种有效的抗炎策略。

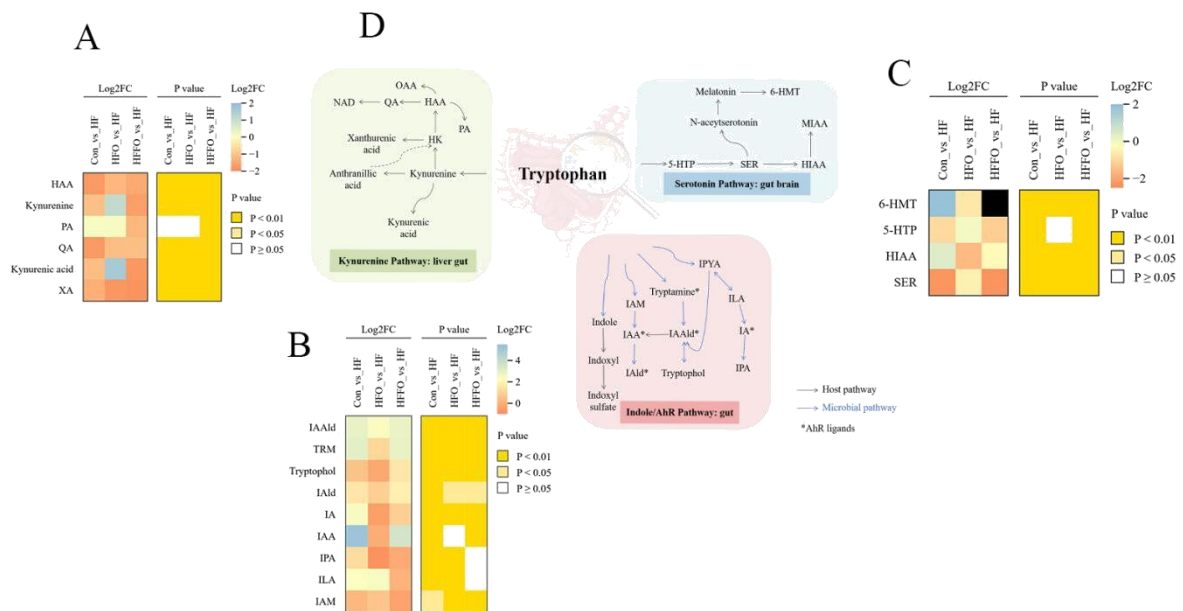


图 4.9 三条色氨酸代谢途径及相关代谢物的 FC 和 P 值热图

Fig 4.9 Heatmap of FC and P values of three tryptophan metabolic pathways and related metabolites

4.3.2.4 发酵豆渣膳食干预对差异色氨酸代谢物和结肠 AhR/IL-22 表达的影响

如图 4.10 A-E 所示,对 4 个不同实验组小鼠中色氨酸代谢物的含量进行了详细比较和分析。研究发现,与 Con 组相比,HF 组在其体内的几种关键色氨酸代谢物,包括 IAald、IAld、IA、IAA 及 Tryptophan 的含量出现了显著降低。这些变化反映了高脂饮食对色氨酸代谢途径的显著干扰。然而,HFFO 组呈现出与 HF 组截然不同的结果:IAald、IAld、IA、IAA 及 Tryptophan 等代谢物含量的降低得到了显著的逆转,表明发酵豆渣膳食干预能够有效缓解高脂饮食引起的色氨酸代谢紊

乱。

进一步的分析（图 4.10 F-G）指出，在 Con 组的小鼠中，IL-22 和 AhR 表达水平最高，而在高脂饮食组 HF 组中表达水平最低，表明高脂饮食可能导致结肠中 IL-22 和 AhR 水平下降，暗示了高脂饮食可能通过抑制 IL-22 和 AhR 的表达来诱发炎症和代谢失衡。而 HFO 组与 HFFO 组则在逆转高脂饮食诱导的 IL-22 和 AhR 降低方面表现出了显著效果，尤其是在 HFFO 组中这种逆转作用更为显著。IAAld、IAld、IA、IAA 及 Tryptophl 等 AhR 的配体可以和 AhR 结合，共同发挥免疫稳态、上皮功能、对病原体的抵抗力、异生物质代谢的作用，这意味着发酵豆渣配合特定膳食干预可能不仅对色氨酸代谢途径有益，而且还能通过提升 IL-22 和 AhR 的表达水平，有效抵抗高脂饮食引起的炎症和代谢失衡，显示出潜在的抗炎和代谢调控功能。

总而言之，这些深入的分析 and 结果揭示了色氨酸代谢途径在高脂饮食诱发的代谢紊乱中的关键作用，并强调了通过特定发酵豆渣的膳食干预来提升色氨酸代谢物含量及其相关途径（如 IL-22 和 AhR 表达）的重要性和潜力。

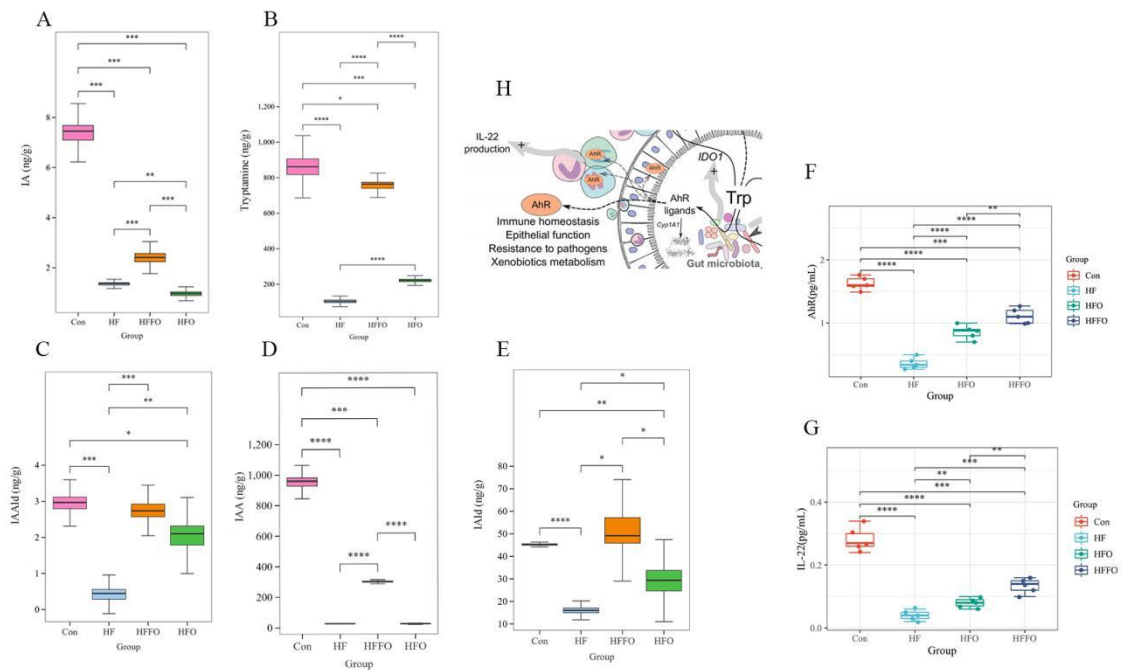


图 4.10 发酵豆渣膳食干预对差异色氨酸代谢物和结肠 AhR/IL-22 表达的影响

Fig 4.10 Effect of dietary intervention with fermented okara on tryptophan metabolites of indoles and colonic AhR/IL-22 expression

4.3.2.5 肠道菌群与色氨酸代谢物的 spearman 相关性分析

接下来，我们将差异肠道菌群（属）与差异色氨酸代谢物进行 spearman 相关

性分析, 探讨肠道菌群的变化是如何影响色氨酸代谢物的, 结果如图 4.11 所示, 乳杆菌属与 TRM 呈正相关, 粪杆菌属与 IAAld、TRM、IAld 和 IAA 呈正相关, 另支菌属与 IAld 呈正相关, 布劳特氏菌属与 IAA、IA 和 IPA 呈正相关, 阿克曼氏菌属与 Trptophol 呈正相关, 梭菌属与 IAM 和 ILA 呈正相关, 鼠杆菌属与 IPA 呈负相关。这表明不同的肠道菌群在色氨酸代谢途径中发挥独特的作用, 影响色氨酸代谢物的生成与代谢, 这对于理解肠道菌群与宿主健康的相互作用具有重要意义。肠道菌群通过多种途径影响色氨酸代谢, 包括直接参与色氨酸的代谢过程, 以及通过影响宿主代谢途径间接调控色氨酸的转化。

乳杆菌属与 TRM 的正相关性表明乳杆菌属可能通过促进色氨酸向有益健康的代谢物转化的途径来影响宿主的健康状态, 乳杆菌属被广泛认为是益生菌, 在改善肠道健康、提高免疫力等方面具有重要作用; 粪杆菌属的正相关行为显示了这一属的菌株可能在色氨酸的代谢途径中扮演着积极的角色, 特别是与 IAAld、TRM、IAld 以及 IAA 的正相关性表明, 粪杆菌属可能参与色氨酸到吲哚类物质的转化过程, 这对维持肠道黏膜的完整性和调节免疫系统有重要意义; 另支菌属与 IAld 的正相关性暗示另支菌属可能在促进色氨酸代谢物向有益的代谢方向转化中起到作用, 进一步研究该属菌株的具体机制对深入理解肠道微生态的健康影响很重要; 布劳特氏菌属与多个色氨酸代谢物 (IAA、IA 和 IPA) 的正相关性表明, 布劳特氏菌属在色氨酸代谢途径中可能起到关键作用, 特别是在促进抗炎、维护肠道屏障等方面; 阿克曼氏菌属与 Trptophol 的正相关性揭示了阿克曼氏菌属可能通过影响色氨酸到 Trptophol 的转化, 在维护肠道屏障和调节免疫反应中扮演重要角色; 鼠杆菌属与 IPA 呈现负相关性, 可能暗示了鼠杆菌属在肠道中的一种竞争机制, 或者说它可能通过某些代谢途径抑制 IPA 的生成, 这对理解肠道微环境的调控具有一定的启示意义。

综上所述, 肠道菌群通过其代谢活动显著影响着色氨酸代谢物的形成和调节, 这些影响可能通过影响神经递质的合成、调节免疫反应、保护肠道屏障等多个方面, 进而影响宿主的健康和疾病状态。因此, 维护肠道菌群的平衡对于维护健康具有至关重要的作用。未来的研究可以进一步探讨具体菌群的功能机制, 以及如何通过调节肠道菌群结构来预防和治疗与色氨酸代谢相关的疾病。

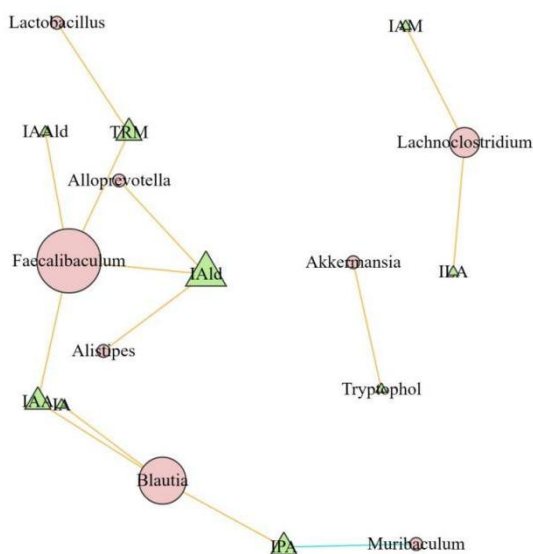


图 4.11 肠道菌群与色氨酸代谢物的 spearman 相关性分析

Fig 4.11 Spearman correlation analysis of intestinal flora with tryptophan metabolites

4.4 本章小结

本章通过 16sRNA 技术和 LC-MS/MS 色氨酸靶向代谢组学分析, 以及 AhR 和 IL-22 表达量的测定, 探究发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠肠道菌群及其衍生的色氨酸代谢物的变化, 进一步揭示发酵豆渣膳食干预对肥胖的抑制机制, 分析结果如下:

(1) 发酵豆渣膳食干预可以提高肠道菌群的 α -多样性和 β -多样性。具体表现为 HFFO 组显著增加了小鼠肠道微生物的 ASV 数目, 表明可以有效提升高脂饮食引起的微生物多样性损失。通过 Shannon 和 Chao1 指数分析表明, 发酵豆渣膳食干预有助于维持群落的多样性和均衡。利用加权和非加权 UniFrac 距离评估发现, 发酵豆渣膳食干预可以缓解高脂饮食造成的肠道菌群紊乱, 促进肠道微生物群落结构向健康状态转变。

(2) 发酵豆渣膳食干预重塑了肠道菌群的组成, 表现为门水平和属水平的变化; 相较于 HF 组, HFFO 组和 HFO 组表现出厚壁菌门相对丰度降低, 拟杆菌门的相对丰度增加, 有助于调整肠道微生物组成; 发酵豆渣膳食干预对特定菌属如拟杆菌、另支菌属和布劳特氏菌属的丰度有显著影响, 表明其能够促进肠道微生物多样性的恢复和肠道健康的改善。不同组之间小鼠肠道微生物组成有显著差异, 且发酵豆渣膳食干预具有重塑高脂饮食小鼠肠道微生物群落组成的潜力。

(3) 通过 LC-MS/MS 色氨酸靶向代谢组学表明, Con 组、HF 组、HFO 组和 HFFO 组的色氨酸代谢物呈现显著差异, 且高脂会引起色氨酸代谢的紊乱, 而发酵豆渣膳食干预能改善高脂饮食引起的色氨酸代谢紊乱。特别是, 研究主要发现发

酵豆渣膳食干预影响的是吲哚/AhR 途径中的代谢物，如 IAAla、IAld、IA、IAA、和 Tryptophan 等。

(4) 发酵豆渣膳食干预显著逆转了高脂饮食导致的 IL-22 和 AhR 表达水平的降低，表明发酵豆渣可以通过 AhR 途径提供有效的抗炎策略。通过 Spearman 相关性分析发现，不同的肠道微生物与特定的色氨酸代谢物具有正相关性或负相关性，提示肠道菌群通过不同途径影响色氨酸代谢过程，对宿主健康产生重要影响。

本研究通过系统性分析揭示了发酵豆渣膳食干预在高脂饮食喂养小鼠中通过调节色氨酸代谢通路，尤其是吲哚/AhR 途径，显著影响色氨酸代谢物的丰度，并可能通过提升 IL-22 和 AhR 的表达水平，有效抵抗高脂饮食引起的炎症和代谢失衡，显示出潜在的抗炎和代谢调控功能。此外，肠道菌群与色氨酸代谢物之间存在复杂的相互作用，为理解肠道微生态与宿主健康的关系提供了新的视角。

第五章 结论与展望

5.1 结论

本研究首先基于 LC-MS 代谢组学分析 *B. subtilis* DC-15 发酵豆渣的营养和功能特性，其次构建肥胖小鼠模型，探究发酵豆渣膳食干预对小鼠肥胖指标的影响，进而对小鼠的肠道菌群及其衍生的色氨酸代谢物的影响，证明了发酵豆渣膳食干预通过调节肠道菌群及其衍生色氨酸代谢物介导的 AhR/IL-22 信号通路减缓肥胖的机制。

(1) 基于 LC-MS 代谢组学分析表明通过 *B. subtilis* DC-15 发酵可以提高豆渣的营养和功能特性。*B. subtilis* DC-15 可以加速复杂大分子的分解，并产生多种具有生物活性的成分，从而提高发酵豆渣的营养和功能。经 *B. subtilis* DC-15 发酵后的差异代谢物主要是氨基酸类物质、二肽类物质、脂肪酸类物质、小分子糖类物质和维生素类物质。其中，485 种代谢物富集到代谢相关通路，包括能量代谢、脂质代谢和氨基酸代谢。DC-15 发酵改变的许多差异代谢物在氨基酸和糖代谢中富集。组学数据分析和生物学解释揭示了发酵豆渣的健康潜力，也可以应用于相关食品。代谢产物的深入分析，为利用发酵豆渣筛选和提取新的生物活性化合物提供了新的可能性。

(2) 探讨豆渣及发酵豆渣膳食干预对高脂小鼠的影响，一方面，揭示了豆渣及发酵豆渣膳食干预在高脂小鼠中对体重管理、血糖调节、血脂管理以及保护肝脏健康方面的积极效果；另一方面，也揭示了通过豆渣及发酵豆渣膳食干预，可以通过改善血液学参数、调节炎症因子、改善肝脏组织形态、调整肠道微生物产生的短链脂肪酸水平以及提升瘦素水平，展现了豆渣和发酵豆渣膳食干预其在减轻肥胖及其并发症方面的综合干预潜力。这进一步强调了豆渣和发酵豆渣膳食干预在管理肥胖和维护健康方面的潜力。

(3) 通过 16sRNA 技术和 LC-MS/MS 色氨酸靶向代谢组学分析，以及 AhR 和 IL-22 表达量的测定，系统性分析揭示了发酵豆渣膳食干预在高脂喂养小鼠中通过调节色氨酸代谢通路，尤其是吲哚/AhR 途径，显著影响色氨酸代谢物的丰度，并可能通过提升 IL-22 和 AhR 的表达水平，有效抵抗高脂饮食引起的炎症和代谢失衡，显示出潜在的抗炎和代谢调控功能。此外，肠道菌群与色氨酸代谢物之间存在复杂的相互作用，为理解肠道微生态与宿主健康的关系提供了新的视角。

5.2 展望

但本研究仍有一些问题，需要未来深入研究。

（1）深度探索发酵豆渣的活性成分。虽然发酵豆渣作为一种益生元已经显示出调节肠道菌群和色氨酸代谢物的潜力，未来研究可进一步深入分析发酵豆渣中的活性成分。通过高通量测序技术和代谢组学方法，明确哪些特定化合物贡献于其益生元功能，为开发更高效的益生元产品和功能性食品提供科学依据。

（2）进一步探究发酵豆渣如何通过肠道菌群影响色氨酸代谢途径的具体机制。尤其是在 AhR 途径中的作用机理，如何通过调节 AhR 相关基因表达影响细胞信号传导路径，进而调控炎症反应和脂质代谢，为精确治疗肥胖和相关代谢疾病提供新方向。

（3）针对有显著响应的肠道菌种，构建基于约束的基因组规模代谢网络，研究不同种类微生物如何通过代谢途径间接或直接参与色氨酸的代谢过程，以及它们如何相互作用，共同影响宿主的代谢状态。

参考文献

- [1] 宋睿, 邓源喜. 大豆制品的营养价值及其开发利用[J]. 安徽农学通报, 2018, 24(12): 112-114.
- [2] 陈波, 邓源喜, 高树叶, 刘朝, 范旭辰, 刘明昭, 等. 大豆的营养保健功能及其开发应用进展[J]. 广州化工, 2016, 44(02): 14-16.
- [3] 邵孟雅, 袁岐山, 杨欣玲, 马胜涛, 崔廷, 孙岩, 等. 大豆加工副产物资源化利用研究进展[J]. 中国酿造, 2023, 42(01): 21-26.
- [4] 湛祺, Thakur K., 胡飞, 章建国, 魏兆军. 豆渣的营养成分功能及其在食品工业中的利用[J]. 农产品加工, 2023, (02): 76-80.
- [5] 屠大伟, 田仕艳, 牟韦, 邓美林, 尤琳烽. 豆渣的微生物发酵及应用研究进展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2024, 1-11.
- [6] Wang F., Zeng J., Gao H., Sukmanov V. Effects of different physical technology on compositions and characteristics of bean dregs [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2021, 73, 102789.
- [7] Fan X., Chang H., Lin Y., Zhao X., Zhang A., Li S., et al. Effects of ultrasound-assisted enzyme hydrolysis on the microstructure and physicochemical properties of okara fibers [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 69, 105247.
- [8] 朱建宇, 齐宝坤, 李杨, 江连洲. 生物酶法豆渣对淀粉理化性质及饼干消化特性的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(19): 13-17+23.
- [9] 许美玉, 曾丽丽. 豆渣红茶面包加工工艺优化[J]. 粮食科技与经济, 2023, 48(06): 123-127.
- [10] 齐丹, 周涛. 豆渣的饲料化利用及其对养殖经济效益的影响[J]. 饲料研究, 2023, 46(22): 175-179.
- [11] 苏珊, 徐瑞霞, 张顺, 孙一鸣, 邓明琴, 刘书亮, 等. 乳酸菌发酵豆渣酸面团对馒头面团特性和馒头品质的影响[J]. 核农学报, 2022, 36(11): 2218-2228.
- [12] Mok W.K., Tan Y.X., Lee J., Kim J., Chen W.N. A metabolomic approach to understand the solid-state fermentation of okara using *Bacillus subtilis* WX-17 for enhanced nutritional profile [J]. Amb Express, 2019, 9, 1-12.
- [13] Vong W.C., Liu S.Q. Changes in volatile profile of soybean residue (okara) upon solid-state fermentation by yeasts [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(1): 135-143.
- [14] Ichikawa N., Ng L. S., Makino S., Goh L.L., Lim Y.J., Ferdinandus, et al. Solid-State

Fermented Okara with *Aspergillus* spp. Improves Lipid Metabolism and High-Fat Diet Induced Obesity [J]. *Metabolites*, 2022, 12(3): 198.

- [15] 王昌陵, 李盛有. 豆渣膳食纤维改性及在食品中应用研究进展[J]. 农产品加工, 2023, (04): 87-90.
- [16] Fan H., Zhang Y., Swallah M. S., Wang S., Zhang J., Fang J., et al. Structural Characteristics of Insoluble Dietary Fiber from Okara with Different Particle Sizes and Their Prebiotic Effects in Rats Fed High-Fat Diet [J]. *Foods*, 2022, 11(9): 1298.
- [17] Hong C.J., Chen S.Y., Hsu Y.H., Yen G.C. Protective effect of fermented okara on the regulation of inflammation, the gut microbiota, and SCFAs production in rats with TNBS-induced colitis [J]. *Food Research International*, 2022, 157, 111390.
- [18] Wang R., Thakur K., Feng J.Y., Zhu Y.Y., Zhang F., Russo P., et al. Functionalization of soy residue (okara) by enzymatic hydrolysis and LAB fermentation for B2 bio-enrichment and improved in vitro digestion [J]. *Food Chemistry*, 2022, 387, 132947.
- [19] Zhu Y.P., Cheng Y.Q., Wang L.J., Fan J.F., Li L.T. Enhanced antioxidative activity of Chinese traditionally fermented Okara (Meitauza) prepared with various microorganism [J]. *International Journal of Food Properties*, 2008, 11(3): 519-529.
- [20] Choi I.S., Kim Y.G., Jung J.K., Bae H.J. Soybean waste (okara) as a valorization biomass for the bioethanol production [J]. *Energy*, 2015, 93: 1742-1747.
- [21] 杜磊, 路志芳, 王孟柯. 豆渣可食用包装纸的研制[J]. 粮油食品科技, 2016, 24(01): 91-94+101.
- [22] Munir M., Zakaria Z.A., Nisar H., Ahmed Z., Korma S.A., Esatbeyoglu T. Global human obesity and global social index: Relationship and clustering [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10, 1150403.
- [23] Jackson-Morris A.M., Miranda J., Nugent R. Tailoring off-the-shelf global evidence with local implementation research can boost action on overweight and obesity [J]. *Lancet Global Health*, 2023, 11(6): E826-E827.
- [24] Breda J., Farrugia Sant'Angelo V., Duleva V., Galeone D., Heinen M.M., Kelleher C.C., et al. Mobilizing governments and society to combat obesity: Reflections on how data from the WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative are helping to drive policy progress [J]. *Obesity Reviews*, 2021, 22, e13217.
- [25] Llorca-Colomer F., Murillo-Llorente M.T., Legidos-Garcia M.E., Palau-Ferre A., Perez-Bermejo M. Differences in Classification Standards For the Prevalence of Overweight and Obesity in Children. A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. *Clinical Epidemiology*, 2022, 14: 1031-1052.

- [26] Xin Y., Wise J.Y., Rajesh M., Cai L. Cardiovascular diseases related to diabetes and obesity, volume III [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2024, 15, 1381446.
- [27] Rhee E.J. The Influence of Obesity and Metabolic Health on Vascular Health [J]. *Endocrinology and Metabolism*, 2022, 37(1): 1-8.
- [28] Bradley D. The Intriguing Intersection of Type 2 Diabetes, Obesity-Related Insulin Resistance, and Osteoarthritis Comment [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2021, 106(5): E2370-E2372.
- [29] Lee H. Obesity-Associated Cancers: Evidence from Studies in Mouse Models [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1472.
- [30] MacEwan J.P., Chiu K., Ahmad N.N., Sacks N., Shinde S., Poon J.L., et al. Clinical, economic, and health-related quality of life outcomes in patients with overweight or obesity in the United States: 2016-2018 [J]. *Obesity science & practice*, 2024, 10(1): e726-e726.
- [31] Chen Z., Jiang S., Wang Y., Khan M.M., Zhang D., Rajbhandari-Thapa J., et al. Pharmacoeconomics of obesity in China: a scoping review [J]. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*, 2021, 21(2): 173-181.
- [32] Liu B.-N., Liu X.-T., Liang Z.-H., Wang J.-H. Gut microbiota in obesity [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2021, 27(25): 3837-3850.
- [33] Geng J., Ni Q., Sun W., Li L., Feng X. The links between gut microbiota and obesity and obesity related diseases [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 147, 112678.
- [34] Wu T., Xu S. Understanding the contemporary high obesity rate from an evolutionary genetic perspective [J]. *Hereditas*, 2023, 160(1): 5.
- [35] Zhu Z., Li J., Si J., Shi H., Lv J., Cao W., et al. A Large-Scale Genome-Wide Association Analysis of Lung Function in Chinese and European Populations Identifies Novel Loci and Highlights Shared Genetic Etiology with Obesity [J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2021, 58(4): 2100199.
- [36] Zhou F., Tian G., Cui Y., He S., Yan Y. Development of genome-wide association studies on childhood obesity and its indicators: A scoping review and enrichment analysis [J]. *Pediatric Obesity*, 2023, 18(12): e13077.
- [37] Van Hul M., Cani P.D. The gut microbiota in obesity and weight management: microbes as friends or foe? [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2023, 19(5): 258-271.
- [38] Rastelli M., Cani P.D., Knauf C. The Gut Microbiome Influences Host Endocrine Functions [J]. *Endocrine Reviews*, 2019, 40(5): 1271-1284.
- [39] Regnier M., Van Hul M., Knauf C., Cani P.D. Gut microbiome, endocrine control of gut

barrier function and metabolic diseases [J]. *Journal of Endocrinology*, 2021, 248(2): R67-R82.

- [40] Machate D.J., Figueiredo P.S., Marcelino G., Avellaneda Guimaraes R.d.C., Hiane P.A., Bogo D., et al. Fatty Acid Diets: Regulation of Gut Microbiota Composition and Obesity and Its Related Metabolic Dysbiosis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(11): 4093.
- [41] Nogal A., Valdes A.M., Menni C. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1897212.
- [42] Chambers E.S., Byrne C.S., Morrison D.J., Murphy K.G., Preston T., Tedford C., et al. Dietary supplementation with inulin-propionate ester or inulin improves insulin sensitivity in adults with overweight and obesity with distinct effects on the gut microbiota, plasma metabolome and systemic inflammatory responses: a randomised crossover trial [J]. *Gut*, 2019, 68(8): 1430-1438.
- [43] Chambers E.S., Viardot A., Psichas A., Morrison D.J., Murphy K.G., Zac-Varghese S.E.K., et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults [J]. *Gut*, 2015, 64(11): 1744-1754.
- [44] Rowe J.C., Winston J.A. Collaborative Metabolism: Gut Microbes Play a Key Role in Canine and Feline Bile Acid Metabolism [J]. *Veterinary Sciences*, 2024, 11(2): 94.
- [45] Maruyama T., Miyamoto Y., Nakamura T., Tamai Y., Okada H., Sugiyama E., et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR) [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002, 298(5): 714-719.
- [46] Makishima M., Lu T.T., Xie W., Whitfield G.K., Domoto H., Evans R.M., et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor [J]. *Science (New York, NY)*, 2002, 296(5571): 1313-1316.
- [47] Ihunnah C.A., Jiang M., Xie W. Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2011, 1812(8): 956-963.
- [48] Wagner M., Halilbasic E., Marschall H.U., Zollner G., Fickert P., Langner C., et al. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice [J]. *Hepatology*, 2005, 42(2): 420-430.
- [49] Tanaka C., Harada N., Teraoka Y., Urushizaki H., Shinmori Y., Onishi T., et al. Mogrol stimulates G-protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1/TGR5) and insulin

- secretion from pancreatic β -cells and alleviates hyperglycemia in mice [J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 3244.
- [50] Deng X., Xiao L., Luo M., Xie P., Xiong L. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota in irritable bowel syndrome [J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2023, 38(7): 1072-1082.
- [51] Guo X., Wang J., Xu H., Wang Y., Cao Y., Wen Y., et al. Obesity induced disruption on diurnal rhythm of insulin sensitivity via gut microbiome-bile acid metabolism [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2024, 1869(1):159419.
- [52] Zhang M., Xiao B., Chen X., Ou B., Wang S. Physical exercise plays a role in rebalancing the bile acids of enterohepatic axis in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Acta Physiologica*, 2024, 240(1): 14065.
- [53] Zhou C., Wang Y., Li C., Xie Z., Dai L. Amelioration of Colitis by a Gut Bacterial Consortium Producing Anti-Inflammatory Secondary Bile Acids [J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(2): e03330-22.
- [54] Bourdeau-Julien I., Castonguay-Paradis S., Rochefort G., Perron J., Lamarche B., Flamand N., et al. The diet rapidly and differentially affects the gut microbiota and host lipid mediators in a healthy population [J]. *Microbiome*, 2023, 11(1): 26.
- [55] Farooqi T., Bhuyan D.J., Low M., Sinclair J., Leonardi M., Armour M., et al. Cannabis and Endometriosis: The Roles of the Gut Microbiota and the Endocannabinoid System [J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2023, 12(22): 7071.
- [56] Forte N., Roussel C., Marfella B., Lauritano A., Villano R., De Leonibus E., et al. Olive oil-derived endocannabinoid-like mediators inhibit palatable food-induced reward and obesity [J]. *Communications Biology*, 2023, 6(1): 959.
- [57] Liu M., Tandarost A., Moludi J., Dey P. Prebiotics Plus Probiotics May Favorably Impact on Gut Permeability, Endocannabinoid Receptors, and Inflammatory Biomarkers in Patients with Coronary Artery Diseases: A Clinical Trial [J]. *Food Science & Nutrition*, 2024, 12(2): 1207-1217.
- [58] Malek A., Ahmadi Badi S., Karimi G., Bizouarn T., Irian S., Siadat S.D. The effect of *Bacteroides fragilis* and its postbiotics on the expression of genes involved in the endocannabinoid system and intestinal epithelial integrity in Caco-2 cells [J]. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 2023, 22(2): 1417-1424.
- [59] Mir H.-D., Giorgini G., Di Marzo V. The emerging role of the endocannabinoidome-gut microbiome axis in eating disorders [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2023, 154, 106295.

- [60] Dong F., Annalora A.J., Murray I.A., Tian Y., Marcus C.B., Patterson A.D., et al. Endogenous Tryptophan-Derived Ah Receptor Ligands are Dissociated from CYP1A1/1B1-Dependent Negative-Feedback [J]. International journal of tryptophan research : IJTR, 2023, 16, 11786469231182508.
- [61] Dong F., Perdew G.H. The aryl hydrocarbon receptor as a mediator of host-microbiota interplay [J]. Gut Microbes, 2020, 12(1): 1859812.
- [62] Gargaro M., Manni G., Scalisi G., Puccetti P., Fallarino F. Tryptophan Metabolites at the Crossroad of Immune-Cell Interaction via the Aryl Hydrocarbon Receptor: Implications for Tumor Immunotherapy [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4644.
- [63] Koper D.E.B., Loonen L.M.P., Wells J.M., Troise A.D., Capuano E., Fogliano V. Polyphenols and Tryptophan Metabolites Activate the Aryl Hydrocarbon Receptor in an in vitro Model of Colonic Fermentation [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2019, 63(3): 1800722.
- [64] Tan Y.Q., Wang Y.N., Feng H.Y., Guo Z.Y., Li X., Nie X.L., et al. Host/microbiota interactions-derived tryptophan metabolites modulate oxidative stress and inflammation via aryl hydrocarbon receptor signaling [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2022, 184: 30-41.
- [65] Vyhlidalova B., Krasulova K., Pecinkova P., Marcalikova A., Vrzal R., Zemankova L., et al. Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 2614.
- [66] Di Lorenzo F., De Castro C., Silipo A., Molinaro A. Lipopolysaccharide structures of Gram-negative populations in the gut microbiota and effects on host interactions [J]. Fems Microbiology Reviews, 2019, 43(3): 257-272.
- [67] Kramer B.W., Kallapur S.G., Moss T.J.M., Nitsos I., Polglase G.P., Newnham J.P., et al. Modulation of fetal inflammatory response on exposure to lipopolysaccharide by chorioamnion, lung, or gut in sheep [J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2010, 202(1):77-e1.
- [68] Mohr A.E., Crawford M.s., Jasbi P., Fessler S., Sweazea K.L. Lipopolysaccharide and the gut microbiota: considering structural variation [J]. Febs Letters, 2022, 596(7): 849-875.
- [69] Rhee S.H. Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut [J]. Intestinal research, 2014, 12(2): 90-95.

- [70] Lu Y., Chong J., Shen S., Chammas J.B., Chalifour L., Xia J. TrpNet: Understanding Tryptophan Metabolism across Gut Microbiome [J]. *Metabolites*, 2022, 12(1): 1859812.
- [71] Koper J.E.B., Troise A.D., Loonen L.M.P., Vitaglione P., Capuano E., Fogliano V., et al. Tryptophan Supplementation Increases the Production of Microbial-Derived AhR Agonists in an In Vitro Simulator of Intestinal Microbial Ecosystem [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(13): 3958-3968.
- [72] Lukic I., Ivkovic S., Mitic M., Adzic M. Tryptophan metabolites in depression: Modulation by gut microbiota [J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2022, 16, 987697.
- [73] Alexeev E.E., Kao D.J., Mills K.B., Lemke T.R., Lanis J.M., Lee J.S., et al. Microbiota-Derived Indole Metabolites Provide a Novel Pathway for Regulation of Intestinal Homeostasis [J]. *Faseb Journal*, 2018, 32(1): 286-8.
- [74] Chen Y., Wang Y., Fu Y., Yin Y., Xu K. Modulating AHR function offers exciting therapeutic potential in gut immunity and inflammation [J]. *Cell and Bioscience*, 2023, 13(1): 85.
- [75] Galligan J.J. Beneficial actions of microbiota-derived tryptophan metabolites [J]. *Neurogastroenterology and Motility*, 2018, 30(2): e13283.
- [76] Correia A.S., Vale N. Tryptophan Metabolism in Depression: A Narrative Review with a Focus on Serotonin and Kynurenine Pathways [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(15): 8493.
- [77] Duan K.M., Ma J.H., Wang S.Y., Huang Z., Zhou Y., Yu H. The role of tryptophan metabolism in postpartum depression [J]. *Metabolic Brain Disease*, 2018, 33(3): 647-660.
- [78] Keszthelyi D., Troost F.J., Masclee A.A.M. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function [J]. *Neurogastroenterology and Motility*, 2009, 21(12): 1239-1249.
- [79] Liu R., Bao Z.-X., Zhao P.-J., Li G.-H. Advances in the Study of Metabolomics and Metabolites in Some Species Interactions [J]. *Molecules*, 2021, 26(11): 3311.
- [80] Mecha E., Erny G.L., Guerreiro A.C.L., Feliciano R.P., Barbosa I., da Silva A.B., et al. Metabolomics profile responses to changing environments in a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm collection [J]. *Food Chemistry*, 2022, 370, 131003.
- [81] Zhou J., Hou D., Zou W., Wang J., Luo R., Wang M., et al. Comparison of Widely Targeted Metabolomics and Untargeted Metabolomics of Wild *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Molecules*, 2022, 27(11), 3645.

- [82] Thukral M., Allen A.E., Petras D. Progress and challenges in exploring aquatic microbial communities using non-targeted metabolomics [J]. *Isme Journal*, 2023, 17(12): 2147-2159.
- [83] Santos-Gallego C.G., Mayr M., Badimon J. SGLT2 Inhibitors in Heart Failure: Targeted Metabolomics and Energetic Metabolism [J]. *Circulation*, 2022, 146(11): 819-821.
- [84] Wang H., de Carvalho L.P.S. Metabolomic profiling reveals bacterial metabolic adaptation strategies and new metabolites [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2023, 74, 102287.
- [85] Kellogg J., Kang S. Metabolomics, an Essential Tool in Exploring and Harnessing Microbial Chemical Ecology [J]. *Phytobiomes Journal*, 2020, 4(3): 195-210.
- [86] Hajjar G., Santos M.C.B., Bertrand-Michel J., Castelli F., Creusot N., Dechaumet S., et al. Scaling-up metabolomics: Current state and perspectives [J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 167, 117225.
- [87] Jeevanandam V., Osborne J. Understanding the fundamentals of microbial remediation with emphasize on metabolomics [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2022, 52(3): 351-363.
- [88] Xue L., Xu J., Feng C., Lu D., Zhou Z. Optimal Normalization Method for GC-MS/MS-Based Large-Scale Targeted Metabolomics [J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2022, 77(3): 361-368.
- [89] Dogan H.O. Metabolomics: a review of liquid chromatography mass spectrometry-based methods and clinical applications [J]. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi*, 2024, 49(1): 1-14.
- [90] Junot C., Pinu F.R., van der Hooft J.J.J., Moco S. NMR-based metabolomics [J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2023, 10, 1337566.
- [91] Yamamoto H., Suzuki M., Matsuta R., Sasaki K., Kang M.-I., Kami K., et al. Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry-Based Metabolomics of Plasma Samples from Healthy Subjects in a Cross-Sectional Japanese Population Study [J]. *Metabolites*, 2021, 11(5): 314.
- [92] Belinato J.R., Dias F.F.G., Caliman J.D., Augusto F., Hantao L.W. Opportunities for green microextractions in comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry - based metabolomics A review (vol 1040, pg 1, 2018) [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1133, 178-179.
- [93] Yu D., Zhou L., Liu X., Xu G. Stable isotope-resolved metabolomics based on mass spectrometry: Methods and their applications [J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*,

2023, 160, 116985.

- [94] Aung T., Lee W.H., Eun J.B. Metabolite profiling and pathway prediction of laver (*Porphyra dentata*) kombucha during fermentation at different temperatures [J]. Food Chemistry, 2022, 397, 133636.
- [95] Kim J., Choi K.-B., Park J.H., Kim K.H. Metabolite profile changes and increased antioxidative and antiinflammatory activities of mixed vegetables after fermentation by *Lactobacillus plantarum* [J]. Plos One, 2019, 14(5): e0217180.
- [96] Klevorn C.M., Dean L.L. A metabolomics-based approach identifies changes in the small molecular weight compound composition of the peanut as a result of dry-roasting [J]. Food Chemistry, 2018, 240, 1193-1200.
- [97] Gao Y., Li D., Tian Z., Hou L., Gao J., Fan B., et al. Metabolomics analysis of soymilk fermented by *Bacillus subtilis* BSNK-5 based on UHPLC-Triple-TOF-MS/MS [J]. Lwt-Food Science and Technology, 2022, 160, 113311.
- [98] Gupta S., Chen W.N. A metabolomics approach to evaluate post-fermentation enhancement of daidzein and genistein in a green okara extract [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(12): 5124-5131.
- [99] Yang X., Zhou X., Zhang M., Zhang Z., Song L., Wang G., et al. Metabolism analysis for enhanced nutritional profile of chestnuts subjected to anerobic solid-state fermentation by probiotic lactic acid bacteria [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 44(3): e14360.
- [100] Xu D., Wang S., Feng M., Shete V., Chu Y., Kamil A., et al. Serum Metabolomics Reveals Underlying Mechanisms of Cholesterol-Lowering Effects of Oat Consumption: A Randomized Controlled Trial in a Mildly Hypercholesterolemic Population [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2021, 65(9): 2001059.
- [101] Zhao M., Zhang H., Wang J., Shan D., Xu Q. Serum metabolomics analysis of the intervention effect of whole grain oats on insulin resistance induced by high-fat diet in rats [J]. Food Research International, 2020, 135, 109297.
- [102] Zhan Q., Thakur K., Feng J.-Y., Zhu Y.Y., Zhang J.G., Wei Z.J. LC-MS based metabolomics analysis of okara fermented by *Bacillus subtilis* DC-15: Insights into nutritional and functional profile [J]. Food Chemistry, 2023, 413, 135656.
- [103] Xiao Y., He C., Chen Y., Ho C.T., Wu X., Huang Y., et al. UPLC-QQQ-MS/MS-based widely targeted metabolomic analysis reveals the effect of solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* on the dynamic changes in the metabolite profile of dark tea [J]. Food Chemistry, 2022, 378, 131999.

- [104] Zhang T., Zhang B., Liu J., Wen H., Jiang F., Wang E. Structural requirements and interaction mechanisms of ACE inhibitory peptides: molecular simulation and thermodynamics studies on LAPYK and its modified peptides [J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(6): 1623-1630.
- [105] Zhang L., Wu J.L., Xu P., Guo S., Zhou T., Li N. Soy protein degradation drives diversity of amino-containing compounds via *Bacillus subtilis* natto fermentation [J]. Food Chemistry, 2022, 388, 133034.
- [106] Mok W.K., Tan Y.X., Chen W.N. Evaluating the potential of *Bacillus subtilis* fermented okara as a functional food ingredient through in vitro digestion and fermentation [J]. Food Biotechnology, 2021, 35(2): 136-157.
- [107] Pihlanto A., Virtanen T., Korhonen H. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk [J]. International Dairy Journal, 2010, 20(1): 3-10.
- [108] Gupta S., Lee J.J.L., Chen W.N. Analysis of Improved Nutritional Composition of Potential Functional Food (Okara) after Probiotic Solid-State Fermentation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(21): 5373-5381.
- [109] Zha M., Li K., Zhang W., Sun Z., Kwok L.Y., Menghe B., et al. Untargeted mass spectrometry-based metabolomics approach unveils molecular changes in milk fermented by *Lactobacillus plantarum* P9 [J]. Lwt-Food Science and Technology, 2021, 140, 110759.
- [110] Wu Y., Li R., Hildebrand D.F. Biosynthesis and metabolic engineering of palmitoleate production, an important contributor to human health and sustainable industry [J]. Progress in Lipid Research, 2012, 51(4): 340-349.
- [111] Yang Z.-H., Takeo J., Katayama M. Oral administration of omega-7 palmitoleic acid induces satiety and the release of appetite-related hormones in male rats [J]. Appetite, 2013, 65: 1-7.
- [112] Yang Z.-H., Pryor M., Noguchi A., Sampson M., Johnson B., Pryor M., et al. Dietary Palmitoleic Acid Attenuates Atherosclerosis Progression and Hyperlipidemia in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2019, 63(12): 1900120.
- [113] Duckett S.K., Volpi-Lagreca G., Alende M., Long N.M. Palmitoleic acid reduces intramuscular lipid and restores insulin sensitivity in obese sheep [J]. Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy, 2014, 7: 553-563.
- [114] Wang Q., Shen P., Chen B. Ultracentrifugal milling and steam heating pretreatment

- improves structural characteristics, functional properties, and in vitro binding capacity of cellulase modified soy okara residues [J]. Food Chemistry, 2022, 384, 132526.
- [115] Pooresmaeil M., Namazi H. D-mannose functionalized MgAl-LDH/Fe-MOF nanocomposite as a new intelligent nanoplatfrom for MTX and DOX co-drug delivery [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2022, 625, 122112.
- [116] Taylor R., Zimmet P., Naseri T., Hufanga S., Tukana I., Magliano D.J., et al. Erroneous inflation of diabetes prevalence: Are there global implications? [J]. Journal of Diabetes, 2016, 8(6): 766-769.
- [117] Altarac S., Papes D. Use of d-mannose in prophylaxis of recurrent urinary tract infections (UTIs) in women [J]. Bju International, 2014, 113(1): 9-10.
- [118] Kim H.S., Jang Y., Ham S.Y., Park J.H., Kang H.J., Yun E.T., et al. Effect of broad-spectrum biofilm inhibitor raffinose, a plant galactoside, on the inhibition of co-culture biofilm on the microfiltration membrane [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 402, 123501.
- [119] Wang Y., Li H., Li X., Wang C., Li Q., Xu M., et al. Widely targeted metabolomics analysis of enriched secondary metabolites and determination of their corresponding antioxidant activities in *Elaeagnus angustifolia* var. *orientalis* (L.)Kuntze fruit juice enhanced by *Bifidobacterium animalis* subsp.*Lactis* HN-3 fermentation [J]. Food Chemistry, 2022, 374, 131568.
- [120] Li X., Suo J., Huang X., Dai H., Bian H., Zhu M., et al. Whole Grain Qingke Attenuates High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice With Alterations in Gut Microbiota and Metabolite Profile [J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8, 761727.
- [121] Li X., Du Y., Tu Z., Zhang C., Wang L. Highland barley improves lipid metabolism, liver injury, antioxidant capacities and liver functions in high-fat/cholesterol diet mice based on gut microbiota and LC-MS metabonomics [J]. Food Bioscience, 2022, 50: 102094.
- [122] Sung M.H., Regot S. Editorial: Understanding Immunobiology Through the Specificity of NF- κ B [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11, 521186.
- [123] Mhalhal T.R., Washington M.C., Newman K., Heath J.C., Sayegh A.I. Exogenous glucagon-like peptide-1 reduces body weight and cholecystokinin-8 enhances this reduction in diet-induced obese male rats [J]. Physiology & Behavior, 2017, 179: 191-199.
- [124] Vana V., Laerke M.K., Rehfeld J.F., Arnold M., Dmytriyeva O., Langhans W., et al. Vagal afferent cholecystokinin receptor activation is required for glucagon-like

- peptide-1-induced satiation [J]. *Diabetes Obesity & Metabolism*, 2022, 24(2): 268-280.
- [125] Chepurny O.G., Leech C.A., Tomanik M., DiPoto M.C., Li H., Han X., et al. Synthetic small molecule GLP-1 secretagogues prepared by means of a three-component indole annulation strategy [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6, 28934.
- [126] Chimere C., Emery E., Summers D.K., Keyser U., Gribble F.M., Reimann F. Bacterial Metabolite Indole Modulates Incretin Secretion from Intestinal Enteroendocrine L Cells [J]. *Cell Reports*, 2014, 9(4): 1202-1208.
- [127] Zhang L., Thurber G.M. Quantitative Impact of Plasma Clearance and Down-regulation on GLP-1 Receptor Molecular Imaging [J]. *Molecular Imaging and Biology*, 2016, 18(1): 79-89.
- [128] Li S., Zhao L., Xiao J., Guo Y., Fu R., Zhang Y., et al. The gut microbiome: an important role in neurodegenerative diseases and their therapeutic advances [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2023, 1-27.
- [129] Mupparapu N., Brewster L., Ostrom K.F., Elshahawi S.I. Late-Stage Chemoenzymatic Installation of Hydroxy-Bearing Allyl Moiety on the Indole Ring of Tryptophan-Containing Peptides [J]. *Chemistry-a European Journal*, 2022, 28(20), e202104614.
- [130] Seymour B.J., Trent B., Allen B.E., Berlinberg A.J., Tangchittsumran J., Jubair W.K., et al. Microbiota-dependent indole production stimulates the development of collagen-induced arthritis in mice [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2023, 134(4): e167671.
- [131] Chen S., He F.M., Cheng X. Analysis of subgingival bacterial and fungal diversity in patients with peri-implantitis based on 16sRNA and internal transcribed spacer sequencing [J]. *Future Microbiology*, 2024, 19(5): 397-411.
- [132] Yan T., Shi L., Liu T., Zhang X., Yang M., Peng W., et al. Diet-rich in wheat bran modulates tryptophan metabolism and AhR/IL-22 signalling mediated metabolic health and gut dysbiosis: A novel prebiotic-like activity of wheat bran [J]. *Food Research International*, 2023, 163, 112179.

附录 1 文中出现的缩略词列表

编号	缩写词	英文全拼	中文含义
1	2-AF	2-Aminophenol	邻氨基苯酚
2	2-AA	2-Aminobenzoic acid	邻氨基苯甲酸
3	HAA	3-Hydroxyanthranilic acid	3-羟基邻氨基苯甲酸
4	IAAld	Indole-3-Acetaldehyde	吲哚-3-乙醛
5	TRM	Tryptamine	色胺
6	6-HMLT	6-Hydroxy melatonin	6-羟基褪黑素
7	5-HTP	Hydroxytryptophan	L-5-羟色氨酸
8	IGA	3-Indoleglyoxylic acid	吲哚-3-乙醛酸
9	IEt	Tryptophol	3-吲哚乙醇
10	IAld	Indole-3-Aldehyde	吲哚-3-甲醛
11	5-HTOL	5-Hydroxytryptophol	5-羟基色醇
12	HIAA	5-Hydroxyindoleacetic acid	5-羟基吲哚-3-乙酸
13	IA	Indole-3- β -acrylic acid	吲哚丙烯酸
14	L-TRP	L-tryptophan	L-色氨酸
15	IAA	Indole-3-acetic acid	吲哚-3-乙酸
16	SER	Serotonin	血清素
17	IPA	Indolylpropionic acid	吲哚丙酸
18	ILA	Indole-3-lactic acid	DL-吲哚-3-乳酸
19	IAM	Indole-3-acetamide	吲哚-3-乙酰胺
20	2-KA	2-Ketoadipic acid	2-酮己二酸
21	L-KYN	L-kynurenine	L-犬尿氨酸
22	NFK	N-formylkynurenine	N-甲酰基犬尿氨酸
23	PA	Picolinic acid	吡啶甲酸
24	N-Acid	Nicotinic acid	烟酸
25	QA	Quinolinic acid	喹啉酸

附录 1 文中出现的缩略词列表（续表）

编号	缩写词	英文全拼	中文含义
26	KYNA	Kynurenic acid	犬尿酸
27	XA	Xanthurenic acid	黄嘌呤酸
28	AhR	Aryl hydrocarbon receptor	芳香烃受体
29	IL-22	Interleukin-22	白介素 22

厚德 笃学 崇实 尚新