基于 UHPLC-MS/MS 广泛靶向代谢组学的沉香叶发酵精油黄酮富集及代谢调控变化

李坤霖[1]，杨继国[1,2*]

（1.华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510641）（2.华南协同创新研究院，广东东莞 523808）

摘要：沉香资源稀缺已成为制约其产业化应用的核心瓶颈，沉香叶作为沉香种植过程中的大宗副产物亟待高值化开发。为探究微生物发酵对沉香叶精油功能性成分和代谢调控的影响，本研究以沉香叶为原料分别接种 *Penicillium camponotum* 和 *Phaeoacremonium scolyti* 进行固态发酵，采用亚临界提取获得精油，并基于 UHPLC-MS/MS 广泛靶向代谢组学技术系统分析了发酵前后沉香叶精油非挥发性代谢物的组成变化。结果表明，沉香叶精油中共鉴定出 981 种代谢物。PCA 和 OPLS-DA 显示三组样品的代谢谱差异较大，两种真菌均能有效重塑沉香叶精油的代谢网络。黄酮类代谢物的相对占比由未发酵的 39.43 wt.%提升至 CXYPC 的 55.51 wt.%和 CXYPS 的 74.08 wt.%，KEGG 通路富集分析显示黄酮生物合成和苯丙烷生物合成等通路的差异代谢物显著富集。两种菌株的特异性调控差异：*Penicillium camponotum* 倾向于促进黄酮结构修饰产物的积累，而 *Phaeoacremonium scolyti* 则以维持糖苷型黄酮富集为主。本研究为沉香叶副产物的高值化利用提供了理论依据，也为通过定向发酵提升沉香叶功能活性成分水平、筛选优良发酵菌株提供了可行策略和科学支撑。

关键词：*Penicillium camponotum*；*Phaeoacremonium scolyti*；沉香叶；发酵；广泛靶向代谢组学；亚临界提取

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.9.1193

Flavonoid Enrichment and Metabolic Regulatory Changes in Fermented Essential Oil from Agarwood Leaves Based on Widely Targeted Metabolomics Using UHPLC-MS/MS

LI Kunlin[1], YANG Jiguo[1,2*]

(1.College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(2.South China Institute of Collaborative Innovation, Dongguan 523808, China)

Abstract: The scarcity of agarwood resources has become a key bottleneck limiting its industrial application, and agarwood leaves—a major byproduct of agarwood cultivation—urgently require high-value development. To investigate the effects of microbial fermentation on the functional components and metabolic regulation of agarwood leaf essential oil, this study used agarwood leaves as raw material and inoculated them with *Penicillium camponotum* and *Phaeoacremonium scolyti*, respectively, for solid-state fermentation. Essential oil was obtained via subcritical extraction, and the changes in the composition of non-volatile metabolites in the agarwood leaf essential oil before and after fermentation were systematically analyzed using UHPLC-MS/MS-based broad-range targeted metabolomics. The results showed that 981 metabolites were identified in the agarwood leaf essential oil. PCA and OPLS-DA analyses revealed significant differences in the metabolic profiles among the three sample groups, indicating that both fungi effectively reshaped the metabolic network of the agarwood leaf essential oil. The relative proportion of flavonoid metabolites increased from 39.43 wt.% in the unfermented sample to 55.51 wt.% in the CXYPC sample and 74.08 wt.% in the CXYPS sample. KEGG pathway enrichment analysis revealed a significant enrichment of differentially expressed metabolites in pathways such as flavonoid biosynthesis and phenylpropanoid biosynthesis. Differences in specific regulatory patterns between the two strains: *Penicillium camponotum* tended to promote the accumulation of structurally modified flavonoid products, whereas *Phaeoacremonium scolyti* primarily maintained the enrichment of glycosylated flavonoids. This study provides a theoretical basis for the high-value utilization of

收稿日期：2026-08-10；修回日期：2026-09-24；接受日期：2026-09-24

基金项目：东莞市重点领域研发项目（20221200300142）

作者简介：李坤霖（1999-），男，博士研究生，研究方向：食品工程，E-mail：1282325248@qq.com

通讯作者：杨继国（1977-），男，博士，教授级高级工程师，研究方向：食品工程，E-mail：yangjg@scut.edu.cn

agarwood leaf by-products, as well as feasible strategies and scientific support for enhancing the levels of bioactive components in agarwood leaves through directed fermentation and for screening superior fermentation strains.

Key words: *Penicillium camponotum*; *Phaeoacremonium scolyti*; agarwood leaves; fermentation; widely targeted metabolomics; subcritical extraction

沉香为瑞香科沉香属植物受伤害后形成的含树脂木材复合物，富含倍半萜、色酮等活性成分，具有抗炎、镇静、抗氧化等多种药理活性[1-4]。然而，天然沉香形成周期长、资源极度稀缺，沉香属植物已被列入 CITES 附录II[5]，如何拓展沉香来源、提高沉香资源综合利用效率，已成为该领域的研究热点。

沉香叶是沉香种植过程中的大宗副产物，年产量大且可再生。研究表明，沉香叶富含黄酮、萜类、苯丙素及酚酸等成分，具备抗氧化、抗炎、降血脂等活性[6-8]，已被纳入广东省地方特色食品原料目录[9]，在功能性食品领域潜力显著。然而，现有研究多集中于传统溶剂提取物的活性评价，对精油产率及功能成分提升的工艺探索仍较有限。

亚临界提取是一种绿色高效的油脂及脂溶性成分提取技术，具有温度低、活性成分破坏少、溶剂残留低等优点[10,11]，尤其适用于热敏性和高沸点成分的回收。沉香叶精油中既含挥发性芳香族化合物，也含萜类、黄酮苷元等非挥发性功能成分，传统水蒸气蒸馏难以充分提取，亚临界提取则为沉香叶精油的深度开发提供了有效技术支撑。微生物发酵是调控植物次生代谢产物、提升活性成分含量的重要手段。真菌在发酵过程中可分泌纤维素酶、糖苷水解酶等胞外酶，破坏细胞壁、释放结合态成分，并转化生成新活性物质[12,13]。在沉香领域，内生真菌已被证实可产生沉香特征性芳香成分及色酮类化合物[14,15]。真菌发酵亦在茶叶、中药材等原料提质增效中成效显著[16]。然而，目前关于真菌发酵对沉香叶精油化学成分的影响尚属空白，不同菌株对代谢谱的调控差异及其对功能成分积累的影响缺乏系统性研究。

基于此，本研究以沉香叶为原料，分别接种 *Penicillium camponotum* 和 *Phaeoacremonium scolyti*（GDMC 65425）进行固态发酵，经亚临界提取获得精油（该精油为包含挥发性芳香成分及黄酮苷元、萜类等非挥发性功能成分的复合提取物，与传统水蒸气蒸馏所得精油在组成上存在差异），采用超高效液相色谱-串联质谱（Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry，UHPLC-MS/MS）分析发酵前后非挥发性代谢物组成变化，旨在揭示沉香叶精油代谢物本底特征，阐明两株真菌对代谢网络的重编程作用，重点关注萜类、黄酮等功能成分的富集规律及通路，比较菌株特异性调控差异，探讨活性成分积累机制。研究结果将为沉香叶高值化利用、定向发酵菌株筛选及功能精油产品开发提供理论依据和科学支撑。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

沉香叶（Agarwood Leaves，ChenXiangYe，CXY）样品均在东莞市香博园种植园采集及干燥，品种为白木香（*Aquilaria sinensis*），样品于秋季采自东莞市香博园种植园，采集叶片为半成熟至成熟叶（叶片完全展开），采后于鼓风干燥机 50 ℃烘 5 h；接种所用 Penicillium camponotum（cx-3）和 Phaeoacremonium scolyti（cx-2，GDMC 65425）两株菌株均分离自沉香浸膏。两株菌均采用 ITS1/ITS4 引物进行分子鉴定，经 NCBI BLAST 比对，cx-3 与 Penicillium camponotum CBS 140982（GenBank: NR_158823.1）同源性为 99.65%，cx-2 与 Phaeoacremonium scolyti voucher CBS113598（GenBank: KC166689.1）同源性为 99.50%。实验所用有机溶剂均为色谱级或液相质谱级，甲醇、乙腈及乙酸铵购自德国 Merck 公司，甲酸购自日本 TCI 公司。

1.2 主要仪器设备

分析仪器包括：Acquity I-Class PLUS 超高效液相色谱系统，沃特世（Waters）上海有限公司；Qtrap 6500+高灵敏度线性离子阱-三重四极杆复合质谱仪，上海爱博才思分析仪器贸易有限公司；Acquity UPLC HSS T3 色谱柱（1.8 μm, 2.1×100 mm），沃特世（Waters）上海有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 沉香叶的接种

接种前，将沉香叶置于微波炉中 800 W 灭菌 2 min，并在无菌操作台内紫外灯照射灭菌 30 min。发酵种子液制备：将甘油管保藏的 *Penicillium camponotum* 和 *Phaeoacremonium scolyti* 菌种分别按 1%(*φ*)接种量接入已灭菌的 PDB 培养基中，于 28±1 ℃120 r·min^{-1} 摇床中振荡培养至生长稳定期（OD_{600}=1.2）。将培养所得菌液于 4 000 r·min^{-1} 离心 5 min，去除上清液后加入等体积无菌生理盐水重悬，振荡 2 min，制得浓度约为 1×10^{8} CFU·mL^{-1} 的发酵种子液。称取灭菌后的沉香叶粉末，按料液比 1:3（g:mL）将发酵种子液均匀喷洒至沉香叶粉末中，得到 *Penicillium camponotum*（Agarwood Leaves *Penicillium camponotum*，ChenXiangYe *Penicillium camponotum*，CXYPC）和沉香叶-*Phaeoacremonium scolyti*（Agarwood Leaves *Phaeoacremonium scolyti*，ChenXiangYe *Phaeoacremonium scolyti*，CXYPS）充分混匀并进行发酵，发酵温度为 28 ℃，环境湿度为 75%~85% RH，发酵时间为 14 d。为排除批次间差异，独立发酵实验重复 3 次，每次发酵各组均设置 3 个生物学重复样品。

1.3.2 亚临界提取

亚临界提取使用华南协同创新研究院的亚临界低温萃取设备，生产厂家为常熟市化纤设备厂，萃取溶剂为丁烷（夹带剂为乙醇，添加量为物料质量的 10%），萃取温度 73 ℃，萃取压力 0.55~0.6 MPa，循环萃取 5 次，每次 1 h，提取结束后减压脱溶，再经旋转蒸发回收乙醇，得到 CXY、CXYPC 和 CXYPS 三种沉香精油。

1.3.3 代谢物检测与含量分析

本实验采用基于 UHPLC-MS/MS 技术的广泛靶向代谢组学方法，对样本中的小分子代谢物进行定性与定量分析[17]。该方法结合了三重四极杆质谱的多反应监测（Multiple Reaction Monitoring，MRM）模式的高灵敏度和高选择性优势，旨在实现大规模代谢物的精准检测[18,19]。

本实验每组设置 3 个生物学重复样品，即 CXY、CXYPC 和 CXYPS 各 3 个独立样本，共 9 个样本用于 UHPLC-MS/MS 分析。提取样本经真空冷冻干燥后精确称取 50 mg，加入 1 000 μL 提取液（甲醇:乙腈:水=1:2:1, 体积比）。充分涡旋混匀 30 s 后，加入钢珠并于 45 Hz 研磨仪中处理 10 min，随后在冰水浴中超声提取 10 min。为促进蛋白沉淀及代谢物析出，将提取液置于-20 ℃静置 1 h[20]。随后，在 4 ℃条件下以 12 000 r min^{-1} 离心 15 min，取 300 μL 上清液经 0.22 μm 有机滤膜过滤至进样瓶中[21]。每个样本各取 10 μL 混合制备成质量控制样本，用于监测分析过程的稳定性和重复性。

色谱与质谱条件：液相色谱条件，色谱柱温为 40 ℃，流动相系统在正负离子模式下均采用 A 相 0.1%（*φ*）甲酸-5 mmol L^{-1} 乙酸铵水溶液和 B 相 0.1%（*φ*）甲酸-乙腈溶液。色谱柱温未明确设定，进样体积为 4 μL，流量恒定于 350 μL·min^{-1}。梯度洗脱程序如下：0~1.5 min，98%（*φ*）A 相；1.5~5.0 min，线性梯度至 50%（*φ*）A 相；5.0~9.0 min，线性梯度至 2%（*φ*）A 相；保持 2%（*φ*）A 相至 10.0 min；随后在 11.0 min 回初始比例并平衡至 14.0 min。质谱条件：采用电喷雾离子源，离子源温度 550 ℃；正离子模式喷雾电压为 5 500 V，负离子模式为-4 500 V。雾化气、辅助气（GS_2）和帘气分别设定为 50、55 和 35 psi，碰撞气（氮气）设为中等强度。在 Q3 和 LIT 模式下，分别采用 10 μmol·L^{-1} 和 100 μmol·L^{-1} 的聚丙二醇溶液进行质量校准与调谐。检测采用 MRM，并针对每个目标代谢物分别优化其去簇电压和碰撞能。依据各代谢物的保留时间分布，在每个时间窗口内分组监测特定的 MRM 离子对。

代谢物定性与定量方法：代谢物定性分析委托北京百迈客生物科技有限公司完成，基于该公司自建植物源数据库进行比对鉴定，通过与标准品或数据库中的二级质谱信息比对进行代谢物结构鉴定，鉴定过程中使用的标准品数量、保留时间容差及二级谱图匹配分数等参数均按该公司标准操作流程执行。数据处理过程中，系统性地剔除同位素峰、含 K^+、Na^+、NH_4^+的加合离子峰，以及高分子量物质产生的碎片离子重复信号，确保定性结果的准确性和唯一性。定量分析则利用三重四极杆质谱的 MRM 采集模式实现。该模式下，第一重四极杆（Q1）精确选择目标母离子，有效排除质量数无关的干扰离子；母离子在碰撞室经诱导解离后产生特征碎片离子，由第三重四极杆（Q3）筛选出特定的子离子进行检测，从而实现高选择性的信号采集。获得原始质谱数据后，对所有代谢物色谱峰进行峰面积积分，本研究采用峰面积归一化法计算各类代谢物的相对占比（wt.%），即该类代谢物所有色谱峰面积之和占总鉴定代谢物峰面积总和的百分比，用于反映代谢物组间的相对丰度变化。需说明的是，该值为相对占比，一类代谢物占比的升高伴随其他类别的相对降低。

为验证代谢组学相对定量结果的可靠性，并评估发酵前后沉香叶精油中总黄酮绝对含量的变化，本研究采用三氯化铝比色法对三组精油样品的总黄酮含量进行了测定[22]。以芦丁为标准品绘制标准曲线（R^2=0.994），样品于

421 nm 处测定吸光度。每组样品设置 3 个生物学重复，每个重复测定 3 次。

1.3.4 数据分析

色谱质谱数据采集完成后，原始峰面积数据在导入 R 软件后进行 Unit Variance scaling（UV）归一化处理。峰面积积分及校正使用 MultiaQuant 软件完成，每个色谱峰的峰面积代表该物质的相对含量。所有样本在同一批次内完成上机检测，未进行批次校正。缺失值处理：仅保留在所有样本中均可检测到的代谢物用于后续分析[23,24]。为减少量纲差异对模型的影响，所有多变量分析均采用 UV 缩放进行数据预处理。在模式识别方面，本研究首先采用主成分分析（Principal Component Analysis，PCA）对样本整体分布进行无监督探索，该分析通过 R 基础包中的 Prcomp 函数实现[25]。为进一步筛选组间差异代谢物，构建了正交偏最小二乘判别分析（Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis，OPLS-DA）模型，借助 Ropls 包（版本 1.6.2）完成；模型质量通过 7 折交叉验证（当样本量不足 7 时，折数等于样本数）及 200 次置换检验（Permutation Test，RT）进行评估，以防止模型过拟合。在可视化呈现上，利用 Pheatmap 包（版本 1.0.2）绘制聚类热图，直观展示代谢物在不同分组间的表达模式。为阐明差异代谢物所涉及的生物学通路，本研究基于京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）数据库进行通路富集分析[26]。具体操作采用 clusterProfiler 包（版本 4.4.4）及 enrichplot 包（版本 1.2.0），以超几何分布检验评估代谢物在特定通路中的富集显著性[27]。数据库的官方主页依次为：KEGG（http://www.genome.jp/kegg/）。通过整合上述公共资源与自建植物数据库（GB-PLANT）的定性结果，实现对检测代谢物从化学结构到功能通路的全面注释与解析。

2 结果与讨论

2.1 非挥发性代谢物组成分析

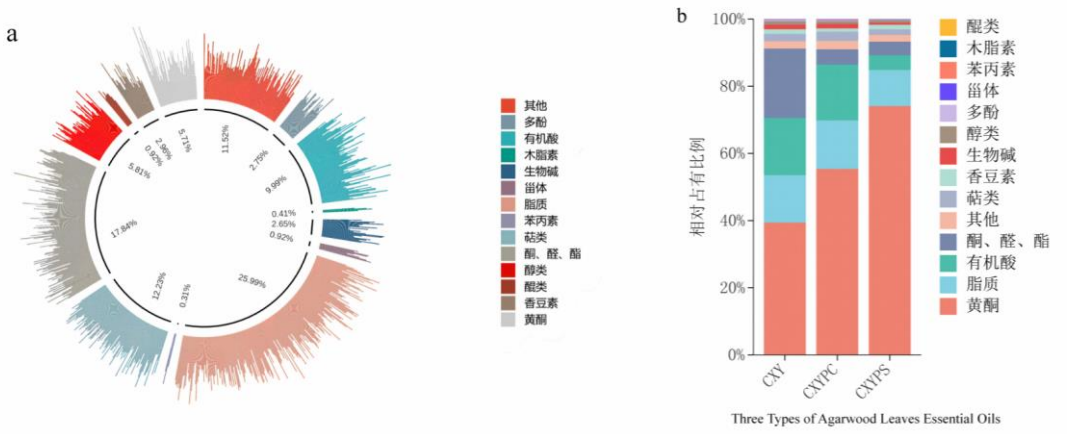
在代谢物鉴定数量方面，如图 1a 所示，本研究通过 UHPLC-MS/MS 广泛靶向代谢组学从 CXY 精油样品进行鉴定得到 981 种非挥发性代谢物，按物质一级分类分为 14 类。与之相比，傅建阳等[8]采用液质联用非靶向代谢组学从沉香叶提取物中鉴定出 3 877 种代谢物，数量差异主要源于检测平台的差异，即广泛靶向代谢组学侧重于特定类别代谢物的精准定量，而非靶向代谢组学覆盖范围更广但定量精度相对较低。在代谢物组成特征上，两者均显示脂质类、有机酸和萜类均为主要组分，说明沉香叶精油与提取物在化学轮廓上具有较好的一致性。此外，刘欣怡等[27]采用气质联用分析了 4 种沉香树叶片挥发油的化学成分，发现不同品种沉香叶挥发油中萜类总相对占比差异显著（8.17%~37.06%），而本研究中沉香叶精油萜类占比为 12.23%，处于该范围的中低水平，这可能与提取方式及检测方法的差异有关。

整体来看，沉香叶非挥发性代谢物呈现出以脂质类、酮、醛、酯类和萜类为主体，辅以黄酮、多酚及其他功能性次生代谢物共同组成[27,28]。其中脂质类数量（25.99%）占比最高，其次为酮、醛、酯类（17.84%）、萜类（12.23%）、其他类（11.52%）和有机酸（9.99%）。萜类是沉香植物最具代表性的特征代谢物，也是沉香香气形成和药理活性的关键物质基础[3]。大量研究表明，倍半萜、二萜及三萜类化合物具有抗氧化、抗炎、抗菌、免疫调节及神经保护等多种生物活性，其积累程度通常与沉香品质密切相关[29]。因此，本研究中较高比例的萜类代谢物说明沉香叶不仅保留了沉香植物典型的化学特征，也具有较大的天然活性产物开发潜力。此外，醇类（5.81%）和黄酮（5.71%）丰度相近。值得注意的是，黄酮作为苯丙烷代谢的重要产物，具有抗氧化、抗炎等多种生物活性。香豆素（2.96%）、多酚（2.75%）、生物碱（2.65%）、醌类（0.92%）、甾体（0.92%）、木脂素（0.41%）和苯丙素（0.31%）虽然占比较低，但均属于重要的功能性代谢物，对沉香叶的生物活性具有重要贡献。

相对占比百分值堆叠柱状图 1b 显示，不同微生物发酵改变了 CXY 非挥发性代谢物的组成结构，各类代谢物的相对丰度发生了明显重构，尤其以黄酮、酮、醛、酯类、有机酸和萜类化合物变化最为显著，说明该两株真菌均能够诱导沉香叶代谢网络发生明显的代谢重编程，但其调控方向存在明显差异。总体来看，黄酮始终是三组样品中占比最高的代谢物类别。未经发酵的 CXY 中黄酮占 39.43 wt.%，经 *Penicillium camponotum* 发酵后 CXYPC 提高至 55.51 wt.%，进一步经 *Phaeoacremonium scolyti* 发酵后 CXYPS 达到 74.08 wt.%，分别提高约 40.8%和 87.9%。为验证代谢组学相对定量结果的可靠性，本研究进一步测定了三组精油的总黄酮绝对含量。结果显示，CXY、CXYPC 和 CXYPS 的总黄酮含量分别为 0.31±0.03、0.57±0.01 和 0.75±0.01 mg g^{-1}。单因素方差分析显示三组间差异极显著（F=324.21，P<0.001），Tukey HSD 事后检验表明各组间两两比较均存在显著差异（P<0.001）。绝对含

量变化趋势与代谢组学相对定量结果一致，证实两种真菌发酵处理均能显著促进沉香叶精油中黄酮类物质的积累。这一结果表明，两株真菌均能够促进黄酮类代谢物的相对富集，其中 *Phaeoacremonium scolyti* 的促进作用最为显著。与此同时，酮、醛、酯类变化最为剧烈，CXY 中该类物质占 20.64 wt.%，而 CXYPC 和 CXYPS 分别降至 4.51 wt.%和 4.04 wt.%，降幅均超过 78%。这一现象说明两株真菌均能够快速利用该类代谢物转化成其他代谢物。有机酸同样表现出较大差异，CXY 和 CXYPC 分别保持在 17.04 wt.%和 16.54 wt.%，变化较小，而 CXYPS 则下降至 4.39 wt.%，降幅达到 74%以上。这说明 *Phaeoacremonium scolyti* 对有机酸具有更强的代谢利用能力。有机酸通常作为真菌能量代谢的重要底物，可进入三羧酸循环提供能量[30]。因此，CXYPS 中有机酸的大幅降低可能意味着该菌株具有更高的代谢活性，使其转化成更多的黄酮、多酚及其他功能性代谢物。脂质在三组样品中均属于主要代谢类别，其占比分别为 14.09 wt.%、14.42 wt.%和 10.74 wt.%。其中 CXYPC 与原料基本保持一致，而 CXYPS 略有下降。萜类表现出菌株特异性变化。CXYPC 中萜类比例由 2.19 wt.%提高至 2.73 wt.%，增加约 24.7%；而 CXYPS 则下降至 1.66 wt.%。萜类化合物是沉香植物的重要活性成分，也是沉香特征香气形成的重要来源[3,29]。

为系统评价不同真菌发酵对沉香叶精油非挥发性代谢组成的影响，采用 PCA 对三组样品进行了无监督模式识别[30]。如图 1c 所示，前两个主成分（PC1 和 PC2）分别解释了总变异的 48.43%和 44.63%，累计解释率达到 93.60%，说明前两个主成分已能够充分反映样品间绝大部分代谢信息，能够较全面地揭示不同处理组之间的整体代谢差异。PCA 得分图显示 QC 样本在 PCA 得分图中紧密聚集，表明仪器在整个分析过程中稳定性良好，数据重复可靠。对检测到的峰进行了变异系数（CV）分布评估，涵盖 CXY、CXYPC、CXYPS 及 QC 样本组。累积曲线显示，绝大多数峰的变异程度较低。具体而言，所有组别中 CV 值小于 0.3 的峰占比均超过 85%，其中 QC 样本的分布最为集中。该结果表明数据采集过程具有良好的重复性和稳定性。由于 PCA 属于无监督分析，仅反映样本的自然聚类特征，因此进一步采用 OPLS-DA 建立监督模型，以进一步评估不同处理之间的代谢差异[31]。如图 1d 所示，OPLS-DA 前两个潜变量分别解释了 46.9%和 46.0%的总体变异，累计解释率达到 92.9%。与 PCA 结果一致，三组样品均形成独立聚类，各组之间边界清晰，重叠区域极少，说明不同处理组具有较大不同的代谢特征。与此同时，各组生物学重复均分布于 95%置信椭圆内且聚集紧密，进一步表明实验重复性良好，组内变异较小，而组间差异远大于组内差异。为了验证 OPLS-DA 模型的稳定性和可靠性，对模型进行了 200 次置换检验[31]。如图 1e 所示，置换检验中 Q^2 回归线在纵轴上的截距小于 0，符合代谢组学模型验证的标准，说明随机置换后的模型预测能力明显低于原始模型，模型不存在明显过拟合现象。同时，原始模型的 R^2Y=1.000，说明模型能够完全解释组间分类信息；Q^2=0.998，接近于 1，表明模型具有极高的预测能力和稳定性(图 1e)。通常认为，当 Q^2 大于 0.5 即可说明模型具有较好的预测能力，而 Q^2 超过 0.9 则代表模型具有极强的预测性能[32]。因此，本研究建立的 OPLS-DA 模型能够真实、可靠地反映三组沉香叶精油之间的代谢差异，可用于后续差异代谢物筛选及代谢通路解析。



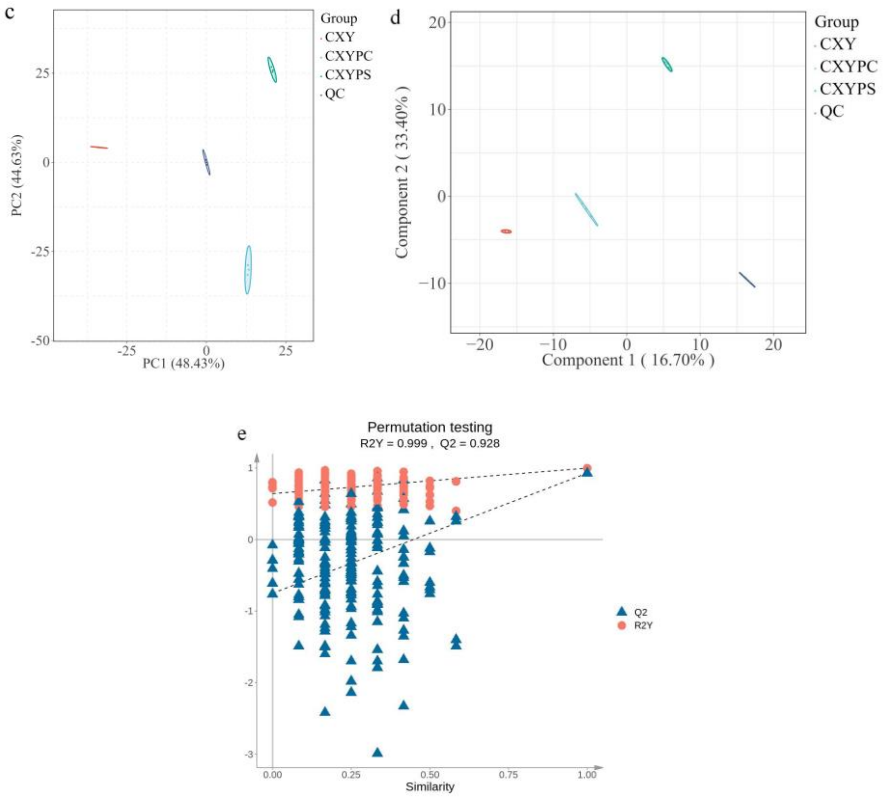


图 1 三种精油的非挥发性代谢物组成分析

Fig.1 Analysis of the Composition of Non-Volatile Metabolites in Three Essential Oils

注:(a)广泛靶向非挥发性代谢物组成分类占比;(b)不同精油的非挥发性代谢物中组成成分的相对丰度;(c)主成分分析(PCA)得分图;(d)正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)得分图;(e)OPLS-DA 模型置换检验(n=200)。

2.2 CXY 与 CXYPC 的差异分析

为揭示 *Penicillium camponotum* 发酵对沉香叶非挥发性代谢物的影响，以 VIP>1、$|Log_2FC|\geq 1$ 和 $P<0.05$ 为筛选标准，对 CXY 与 CXYPC 进行了差异代谢物分析[31]。如图 2a 所示，共检测 981 种非挥发性代谢物，其中 168 种代谢物显著上调，334 种代谢物显著下调，479 种代谢物无显著变化。下调代谢物数量约为上调代谢物的 2 倍，说明 *Penicillium camponotum* 发酵主要表现为对沉香叶原有代谢物的消耗和转化，而非简单促进代谢物积累，表明发酵过程中发生了明显的代谢重塑[33]。

进一步对差异代谢物进行分类统计（图 2b）发现，下调代谢物主要集中于脂质（90 种）、酮/醛/酯类（66 种）、其他类（37 种）、萜类（37 种）和有机酸（36 种）。脂质降幅最为明显，说明 *Penicillium camponotum* 可能分泌脂肪酶，促进脂质降解，并进一步生成小分子代谢物[33]。同时，酮、醛、酯类和有机酸的大量减少表明，这些代谢物可能进一步进入脂肪酸代谢、三羧酸循环（TCA cycle）及氨基酸代谢等途径，被持续利用或转化。相比之下，上调代谢物主要包括脂质（37 种）、其他类（24 种）、萜类（22 种）、黄酮（21 种）及酮/醛/酯类（20 种）。虽然脂质总体以下调为主，但仍有部分脂质积累，说明发酵过程中存在脂质的同步降解与重构现象，反映了膜脂更新及脂质代谢重编程。此外，萜类化合物同时存在 22 种上调和 37 种下调，说明不同萜类组分对发酵响应具有明显差异。一部分萜类可能作为底物被进一步氧化修饰，而另一部分则通过真菌生物转化生成新的萜类衍生物，这与沉香植物中萜类代谢复杂、结构多样的特点一致[29]。

为进一步解析 *Penicillium camponotum* 发酵过程中沉香叶非挥发性代谢物的生物学功能，对差异代谢物进行了 KEGG 通路注释及富集分析，并利用 KEGG 富集气泡图 2c 展示差异代谢物与代谢通路之间的对应关系，前 20 代谢通路共注释到 18 种差异富集代谢物，主要分布于 Metabolic pathways（ko01100）、Biosynthesis of secondary metabolites（ko01110）、Flavonoid biosynthesis（ko00941）、Flavone and flavonol biosynthesis（ko00944）、Biosynthesis of phenylpropanoids（ko01061）以及 Carbon metabolism（ko01200）等通路（图 2c）[26,30]。值得注意的是，黄酮生

物合成相关通路富集程度较高。其中，Flavonoid biosynthesis（ko00941）是最具代表性的次生代谢途径之一，共富集 3 种关键差异代谢物，包括 4',5,7-三羟基黄酮、牡荆黄酮和顺式-3,4-原矢车菊素。

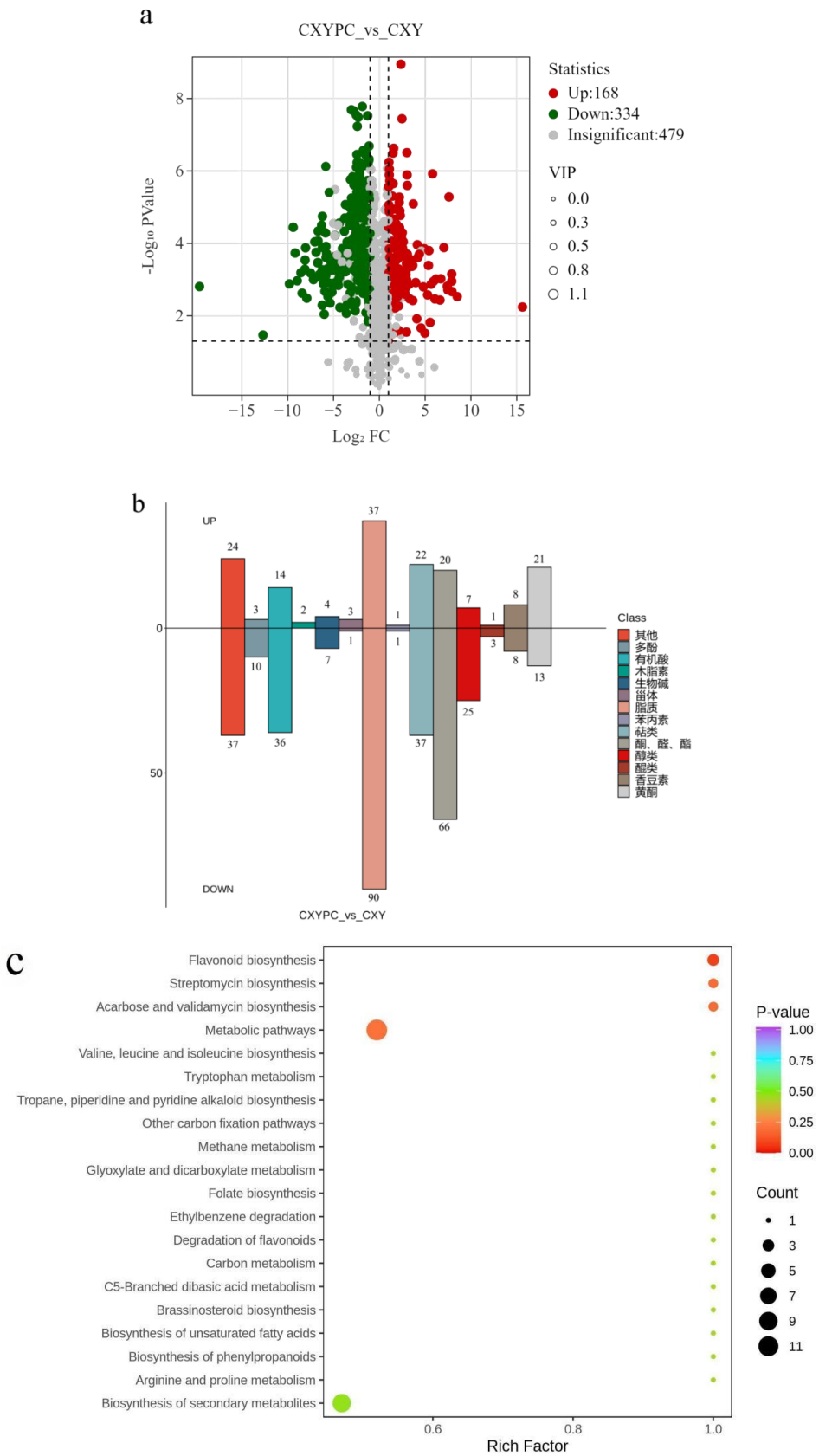


图 2 CXYPC vs CXY 的非挥发性代谢物差异分析

Fig.2 Differential Analysis of Non-Volatile Metabolites Between CXYPC and CXY

注：（a）火山图；（b）差异分类柱状图；（c）KEGG 富集气泡图。

与此同时，Flavone and flavonol biosynthesis（ko00944）进一步关联 4',5,7-三羟基黄酮和牡荆黄酮，而 Degradation of flavonoids（ko00946）同样涉及 4',5,7-三羟基黄酮。这表明发酵过程中黄酮代谢并非单向积累，而是同时受到合成、结构修饰及降解过程调控，形成动态平衡。结合差异代谢结果中黄酮类物质整体增加的趋势，推测 *Penicillium camponotum* 可能通过促进植物细胞壁破坏、增强黄酮释放，并调节黄酮结构转化，提高沉香叶中活性黄酮组分水平。此外，Biosynthesis of phenylpropanoids（ko01061）同样富集 4',5,7-三羟基黄酮，进一步表明苯丙烷代谢途径是连接初级代谢与黄酮合成的重要桥梁。值得注意的是，黄酮是上调数量较多的功能性代谢物类别，提示 Penicillium camponotum 能够促进部分黄酮类化合物的释放或转化。结合文献报道，这推测与真菌分泌的纤维素酶、果胶酶等细胞壁降解酶促进结合型黄酮释放，以及 *β*-葡萄糖苷酶等胞外酶介导的黄酮糖苷水解与结构转化有关[33]。除酚类代谢外，发酵还影响脂质和碳源代谢。Biosynthesis of unsaturated fatty acids（ko01040）中二十二碳五烯酸（DPA）参与差异代谢，提示真菌发酵可能改变脂肪酸组成及膜脂代谢状态。Brassinosteroid biosynthesis（ko00905）中 6-脱氧油菜素甾酮的变化进一步说明植物甾醇类信号分子受到调控。在初级代谢方面，Carbon metabolism（ko01200）和 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism（ko00630）均涉及 L-苹果酰辅酶 A（L-malyl-CoA），推测真菌利用植物来源碳源并通过乙醛酸循环调节碳流分配，为次生代谢提供能量和前体物质。同时，Arginine and proline metabolism（ko00330）和 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis（ko00290）分别涉及 N2-琥珀酰-L-鸟氨酸和柠康酸，说明氨基酸代谢同样参与发酵过程中的代谢重构。

需要指出的是，沉香叶原料经 50 ℃鼓风干燥处理后，植物细胞已不具备活跃的次生代谢合成能力。因此，发酵后观察到的黄酮类代谢物含量升高，不应归因于真菌对植物细胞苯丙烷途径的“诱导”或“激活”。已有研究表明，干燥植物材料经微生物发酵后黄酮类成分含量提升的现象在中药材加工领域已被广泛证实，其核心机制在于真菌分泌的纤维素酶、果胶酶等胞外酶可降解植物细胞壁结构，促进结合态黄酮的释放；同时 *β*-葡萄糖苷酶可将黄酮糖苷水解为苷元，改变黄酮的极性使其更易被提取[34]。因此，本研究中黄酮类代谢物含量的升高，更合理的解释是真菌胞外酶对沉香叶中本底存在的结合态黄酮的释放与结构转化，而非植物细胞重新合成。

本研究进一步从代谢组学层面验证了 *Penicillium camponotum* 对沉香叶黄酮代谢的激活作用，黄酮类上调代谢物达 21 种，KEGG 富集分析证实 Flavonoid biosynthesis（ko00941）和 Phenylpropanoid biosynthesis（ko01061）通路被显著富集，这与三七叶经红曲霉发酵后类黄酮生物合成通路显著富集的报道以及陈欣怡等[35]的报道黑曲霉发酵藤茶后黄酮类化合物发生甲基化、脱羟基化等生物转化的现象具有一致性，表明真菌发酵对植物黄酮代谢的调控可能具有跨物种的共性机制。同时，KEGG 富集结果与差异代谢物变化趋势表明，*Penicillium camponotum* 发酵过程中表现出明显的“代谢流转向”的特征：脂质、有机酸及酮/醛/酯类等初级代谢物被大量消耗，其中 L-苹果酰辅酶 A 在 Carbon metabolism（ko01200）和 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism（ko00630）通路中同步富集，提示乙醛酸循环和 TCA 循环活性增强，为真菌生长及次生代谢提供了充足的前体碳骨架和还原力[30]。与此同时，苯丙烷代谢通路（ko01061）和黄酮生物合成通路（ko00941）显著富集，表明碳流从初级能量代谢向黄酮类次生代谢产物的方向发生重分，为真菌发酵促进沉香叶黄酮类功能成分积累提供了合理的代谢网络解释。

2.3 CXY 与 CXYPS 的差异分析

如图 3a 所示，共检测到 177 种代谢物上调、333 种下调，471 种无显著变化，也是下调代谢物数量明显高于上调代谢物。进一步对差异代谢物进行分类统计（图 3b）发现，下调代谢物主要集中于脂质（72 种）、酮/醛/酯类（70 种）、其他类（47 种）、有机酸（43 种）和萜类（32 种）。其中，脂质和酮/醛/酯类下降最为明显。上调代谢物主要包括脂质（49 种）、酮/醛/酯类（27 种）、萜类（24 种）、有机酸（17 种）和黄酮（17 种）。虽然脂质总体以下调为主，但部分脂质仍积累，表明发酵过程中脂质代谢具有动态重构特征。值得注意的是，黄酮为上调数量较多的功能性代谢物类别之一。此外，萜类代谢物同时存在 24 种上调和 32 种下调，说明不同萜类组分对 *Phaeoacremonium scolyti* 发酵具有差异化响应。一部分萜类可能被进一步氧化、羟基化或裂解，而另一部分则通过真菌生物转化生成新的萜类衍生物，体现了发酵过程中萜类代谢网络的动态调控特征[29]。

与 CXY vs CXYPC 相比，CXY vs CXYPS 中上调脂质（49 vs 37）、酮/醛/酯类（27 vs 20）及醇类（12 vs 7）的数量均有所增加，而有机酸下调数量（43 vs 36）也进一步提高，说明 *Phaeoacremonium scolyti* 对初级代谢网络的调控强度高于 *Penicillium camponotum*；两种菌株均能促进黄酮类代谢物积累，但其代谢重塑模式存在明显差异，

提示不同真菌具有菌株特异性的生物转化能力[33]。

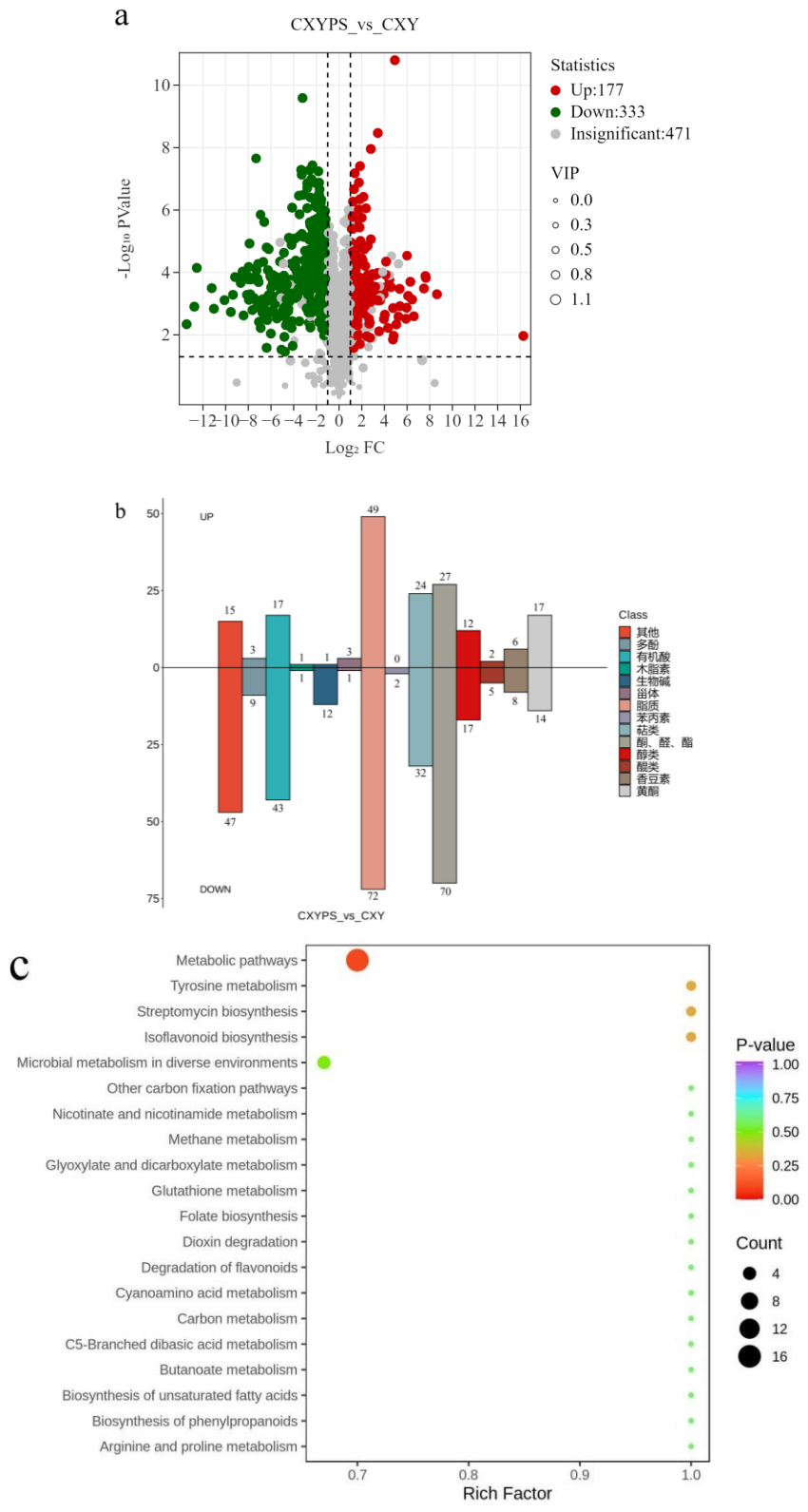


图 3 CXYPS_vs_CXY 的非挥发性代谢物差异分析

Fig.3 Differential Analysis of Non-Volatile Metabolites Between CXYPS and CXY

注：（a）火山图；（b）差异分类柱状图；（c）KEGG 富集气泡图。

为进一步解析 *Phaeoacremonium scolyti* 发酵过程中沉香叶非挥发性代谢物的变化规律，对差异代谢物进行了 KEGG 通路富集分析，结果以 KEGG 富集气泡图 3c。结果表明，共有 23 种差异代谢物被注释到，主要涉及 Metabolic

pathways（ko01100）、Microbial metabolism in diverse environments（ko01120）、Tyrosine metabolism（ko00350）、Glutathione metabolism（ko00480）、Isoflavonoid biosynthesis（ko00943）、Biosynthesis of unsaturated fatty acids（ko01040）、Sphingolipid metabolism（ko00600）、Arginine and proline metabolism（ko00330）及 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism（ko00630）等代谢通路[30]。值得注意的是，黄酮代谢相关通路是本研究最重要的调控模块。Isoflavonoid biosynthesis（ko00943）富集了樱黄素（Prunetin）和 4',5,7-三羟基黄酮（Apigenin）；Flavonoid biosynthesis（ko00941）富集了顺式-3,4-原矢车菊素和4',5,7-三羟基黄酮；Flavone and flavonol biosynthesis（ko00944）、Degradation of flavonoids（ko00946）以及 Biosynthesis of phenylpropanoids（ko01061）均涉及 4',5,7-三羟基黄酮，说明 *Phaeoacremonium scolyti* 不仅促进黄酮类化合物的生物合成，同时调控黄酮降解及苯丙烷代谢途径，表明黄酮代谢处于动态平衡状态。苯丙烷代谢是黄酮、香豆素及木脂素等酚类化合物生物合成的重要前体，因此推测 *Phaeoacremonium scolyti* 能够通过调节苯丙烷代谢碳流，提高沉香叶黄酮类功能成分的积累[33]。在脂质代谢方面，Biosynthesis of unsaturated fatty acids（ko01040）富集了二十二碳五烯酸，而 Sphingolipid metabolism（ko00600）富集了 3-脱氢鞘氨醇，说明 *Phaeoacremonium scolyti* 能够调控不饱和脂肪酸及鞘脂代谢。此外，Microbial metabolism in diverse environments（ko01120）富集了 4 种差异代谢物，表明 *Phaeoacremonium scolyti* 具有较强的底物适应性和代谢可塑性，可促进芳香族化合物及多种碳源的协同利用。与此同时，Glyoxylate and dicarboxylate metabolism（ko00630）、Carbon metabolism（ko01200）、Other carbon fixation pathways（ko00720）及 Methane metabolism（ko00680）均涉及 L-苹果酰辅酶 A，说明乙醛酸循环与中心碳代谢协同增强，提高了碳源利用效率，为黄酮等次生代谢物生物合成持续提供前体物质和能量[30]。

在初级代谢物利用方面，CXYPS 中有机酸大幅下降，显著高于 CXYPC，结合文章章节 2.2 中“代谢流转向”的分析结果可得，由于 *Phaeoacremonium scolyti* 对有机酸的消耗更显著，因此其代谢流转向更为剧烈，这与其黄酮相对占比提升幅度最大（74.08 wt.%）的结果相吻合。与之对比，黑曲霉发酵藤茶后总黄酮含量提升 18.86%，其机制同样涉及有机酸等初级代谢物的消耗与转化；蒙地曲霉发酵茯茶过程中，氨基酸类化合物相对占比普遍下降，而类黄酮类物质含量显著增加[35]。上述研究表明，真菌通过消耗有机酸、氨基酸等初级代谢物进入三羧酸循环提供能量，为黄酮等次生代谢物的合成提供前体和能量——这是真菌发酵提升植物黄酮含量的普遍代谢策略，而 *Phaeoacremonium scolyti* 在本研究中表现出更强的初级代谢物利用能力[30]。

2.4 CXYPC 与 CXYPS 的差异分析

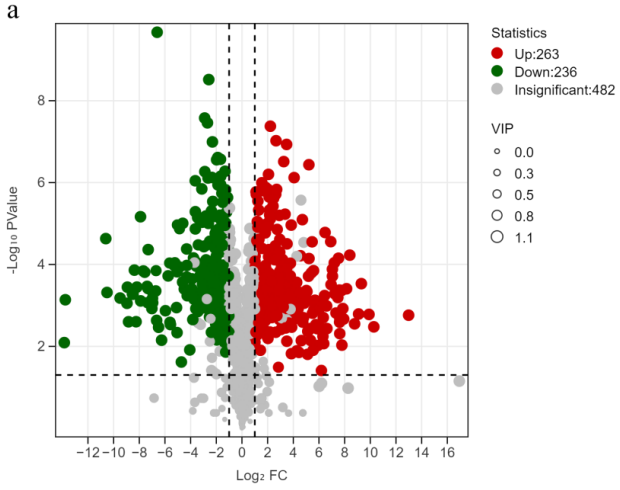
为比较 *Penicillium camponotum* 与 *Phaeoacremonium scolyti* 两种真菌发酵对沉香叶非挥发性代谢谱的影响，同样以 VIP>1、$|Log_2FC|\geq1$ 和 $P<0.05$ 为筛选标准，对 CXYPC 与 CXYPS 进行了差异代谢物分析[31]。如图 4a 所示，共鉴定到 499 种差异代谢物，其中 263 种上调、236 种下调，482 种无显著变化。上调与下调代谢物数量接近，说明两种发酵方式均能有效调控沉香叶代谢网络，但代谢方向存在明显差异，反映出不同菌株具有不同的生物转化特性[31]。

进一步对差异代谢物进行分类统计（图 4b）发现，下调代谢物主要集中于脂质（85 种）、酮/醛/酯类（35 种）、萜类（31 种）和有机酸（19 种）；而上调代谢物则主要分布于其他类（43 种）、脂质（42 种）、酮/醛/酯类（40 种）、有机酸（34 种）、萜类（33 种）及黄酮（23 种）。其中，脂质、酮/醛/酯类及萜类同时存在大量上调和下调代谢物，说明两株真菌均能够对这些代谢物进行广泛生物转化，但作用靶点和代谢方向存在明显差异，反映了复杂的代谢重编程过程。值得注意的是，黄酮类以上调为主（23 种上调，8 种下调），表明相较于 *Phaeoacremonium scolyti*，*Penicillium camponotum* 更有利于部分黄酮类功能成分的积累。此外，有机酸和酮/醛/酯类上调代谢物数量均高于下调代谢物，说明 *Penicillium camponotum* 相较于 *Phaeoacremonium scolyti* 保留或生成了更多初级代谢中间产物，而 *Phaeoacremonium scolyti* 则可能进一步利用这些物质进入能量代谢或其他生物合成途径。这与前述结果中 *Phaeoacremonium scolyti* 对有机酸和酮/醛/酯类消耗更多的现象一致，表明其具有更强的底物利用能力和代谢活性。该结果表明，两株真菌具有不同的代谢调控机制和生物转化特性，可根据目标功能成分的富集需求选择相应菌株，为沉香叶发酵加工及高附加值功能产品开发提供理论依据。

为进一步解析不同真菌接种对沉香叶非挥发性代谢网络的调控差异，本研究对 CXYPC 与 CXYPS 组间差异代谢物进行了 KEGG 通路富集分析，并根据富集结果 KEGG 富集气泡图 4c。结果显示，差异代谢物主要参与 Metabolic pathways（ko01100）、Biosynthesis of secondary metabolites（ko01110）、Microbial metabolism in diverse

environments（ko01120）、2-Oxocarboxylic acid metabolism（ko01210）、Tyrosine metabolism（ko00350）、Glutathione metabolism（ko00480）以及多种黄酮相关代谢途径，表明不同真菌菌株对沉香叶代谢过程产生了显著差异化调控作用[30]。值得关注的是，黄酮相关代谢途径在 CXYPC 与 CXYPS 差异中发挥重要作用。Flavonoid biosynthesis（ko00941）富集了顺式-3,4-无色天竺葵素（cis-3,4-Leucopelargonidin）和 4',5,7-三羟基黄酮（Apigenin）等关键差异代谢物。黄酮类化合物主要来源于苯丙烷代谢途径，是植物重要的防御性次生代谢物，具有抗氧化、抗炎和自由基清除等功能[36]。真菌发酵过程中，微生物产生的糖苷水解酶、氧化还原酶以及多酚相关酶系可促进黄酮类物质的结构转化，例如促进结合态黄酮向游离态形式转变[33]。因此，Flavonoid biosynthesis（ko00941）的差异表明，不同真菌可能通过影响黄酮合成与转化过程，导致沉香叶功能活性成分积累模式产生差异。进一步分析发现，Isoflavonoid biosynthesis（ko00943）同样参与 CXYPC 与 CXYPS 之间的代谢调控，该通路涉及樱黄素（Prunetin）和 4',5,7-三羟基黄酮。异黄酮类化合物作为植物防御响应的重要代谢物，其积累通常与微生物诱导、氧化胁迫以及植物-微生物互作密切相关[37]。该结果提示，不同真菌可能通过诱导不同程度的防御代谢响应，影响沉香叶异黄酮类物质的形成。Flavone and flavonol biosynthesis（ko00944）和 Degradation of flavonoids（ko00946）也检测到差异代谢物，其中 4',5,7-三羟基黄酮是两个通路共同涉及的重要代谢物。黄酮合成与降解过程的同步变化说明，真菌发酵过程中沉香叶黄酮代谢处于动态平衡状态，微生物不仅促进黄酮类化合物释放和生成，同时可能通过降解途径调节其最终积累水平。苯丙烷相关代谢途径同样表现出明显变化。Biosynthesis of phenylpropanoids（ko01061）涉及 4',5,7-三羟基黄酮，该通路是连接苯丙氨酸代谢与黄酮、香豆素及木脂素合成的重要代谢节点。除次生代谢外，中心碳代谢也是 CXYPC 与 CXYPS 差异的重要组成部分。Glyoxylate and dicarboxylate metabolism（ko00630）富集了 L-苹果酰辅酶 A，该代谢物同时参与 Carbon metabolism（ko01200）和 Microbial metabolism in diverse environments（ko01120）[30]。乙醛酸循环作为连接脂质分解、糖异生和次生代谢合成的重要途径，可为微生物生长及植物源化合物转化提供能量和碳骨架[30]。因此，不同真菌对该通路的调控差异可能反映其对沉香叶营养物质利用效率和代谢适应能力的不同。

本研究中 *Penicillium camponotum* 倾向于促进甲基酮类和黄烷酮类等黄酮结构修饰产物积累，而 *Phaeoacremonium scolyti* 则以维持糖苷型黄酮富集为主，这一菌株特异性差异与杨金梅等[38]报道不同真菌对黄酮类成分的差异化调控现象一致。上述菌株特异性代谢调控差异可能与两菌属固有的生物学特性有关。*Penicillium* 属真菌是自然界中重要的分解者，能够分泌多种高活性的植物多糖降解酶（包括纤维素酶、果胶酶、*β*-葡萄糖苷酶等），同时还能产生大量具有抗菌、抗肿瘤等活性的次级代谢产物[39,40]。本研究中 *Penicillium camponotum* 发酵后甲基酮类和黄烷酮类等黄酮结构修饰产物比例增加，可能与该菌属较强的胞外酶系分泌能力和次级代谢调控活性有关。相比之下，*Phaeoacremonium* 属真菌已被报道能产生一系列胞外酶（如纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶等）[41]和植物毒性次生代谢物[42]，且其代谢物谱具有明显的种间特异性[43]。本研究中 *Phaeoacremonium scolyti* 发酵后糖苷型黄酮维持较高水平的积累模式，可能与该菌属对植物细胞壁降解和黄酮糖苷释放的调控特征有关。两菌属在产酶谱和次生代谢调控网络上的固有差异，可能是导致本研究中黄酮亚类积累模式不同的重要生物学基础。



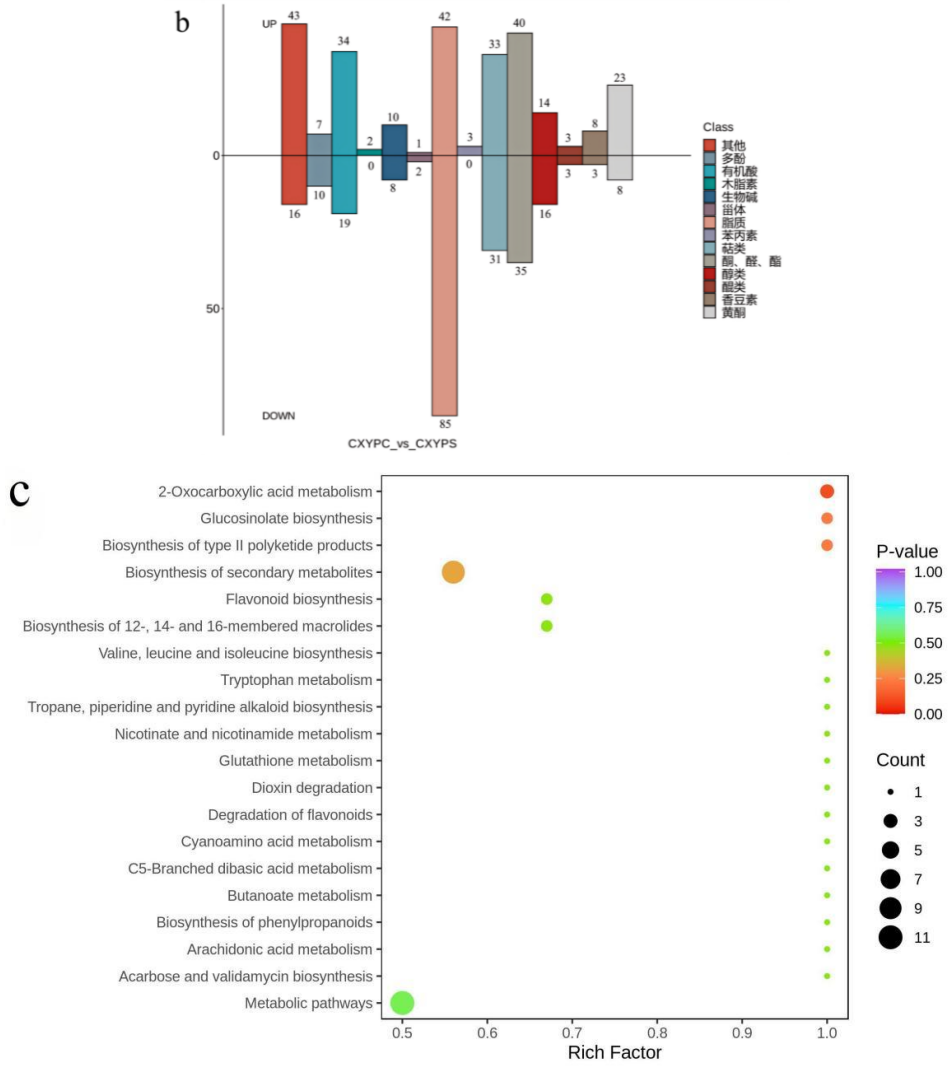


图 4 CXYPC_vs_CXYPS 的非挥发性代谢物差异分析

Fig.4 Differential Analysis of Non-Volatile Metabolites Between CXYPC and CXYPS

注:（a）火山图;（b）差异分类柱状图;（c）KEGG 富集气泡图。

2.5 3 种精油的黄酮类代谢物分析

为系统解析不同真菌发酵对沉香叶化学组成及功能性成分形成的影响，本研究基于广泛靶向代谢组学技术，分别比较了 CXYPC 和 CXYPS 接种前后沉香叶非挥发性代谢谱变化，并进一步分析两种真菌诱导的代谢差异。结果表明，真菌发酵较大改变了沉香叶原有代谢物种类和数量，表现出明显的差异特征。两种真菌处理均表现出下调代谢物数量高于上调代谢物的趋势，说明真菌定殖过程中首先通过胞外酶系统降解和利用植物源储存性代谢物，将复杂大分子物质转化为可利用的小分子中间体，而非简单促进代谢物累积[31]。这一过程体现了真菌发酵过程中植物基质降解、碳源重新分配以及次生代谢激活之间的协同调控。分析发现，两种真菌均能影响脂质、酮/醛/酯类、有机酸及萜类代谢。其中，脂质是变化最大的代谢类别之一。

与初级代谢物的大规模转化不同，黄酮类化合物在两种真菌发酵过程中均表现出较大积累趋势。在 CXYPC 处理中，共有 21 种黄酮类代谢物上调；CXYPS 处理中，共有 17 种黄酮类代谢物上调，说明两种真菌均具有促进沉香叶黄酮类功能成分释放或转化的能力[33]。Flavonoid biosynthesis（ko00941）富集了顺式-3,4-原矢车菊素和 4',5,7-三羟基黄酮等关键差异代谢物。同时，Isoflavonoid biosynthesis（ko00943）涉及樱黄素（Prunetin）和 4',5,7-三羟基黄酮，而 Flavone and flavonol biosynthesis（ko00944）和 Degradation of flavonoids（ko00946）均关联 4',5,7-三羟基黄酮[32]。上述结果表明，两种真菌在调节沉香叶黄酮代谢方面存在明显差异，其作用并非简单促进黄酮积累，而是通过影响黄酮合成、结构修饰及降解过程共同决定最终代谢水平[33]。黄酮类化合物主要来源于苯丙烷代谢途

径。结合文献报道，真菌发酵过程中产生的糖苷水解酶、氧化还原酶及多酚转化相关酶系，可能促进细胞壁结合态黄酮释放，同时诱导黄酮骨架发生羟基化、糖基化或氧化修饰[33]。因此，黄酮相关通路的变化可能是造成两种真菌发酵产物功能品质差异的重要原因。

此外，Biosynthesis of phenylpropanoids（ko01061）同样富集 4',5,7-三羟基黄酮，进一步支持苯丙烷代谢途径在真菌介导的黄酮重塑过程中发挥关键作用[33]。苯丙烷途径作为植物次生代谢的核心支路，是黄酮、香豆素及木脂素等多酚类化合物合成的重要前体来源[33]。因此，不同真菌可能通过改变苯丙烷途径中的碳流分配，影响黄酮类化合物的生成效率及结构多样性，从而形成菌株特异性的功能成分积累模式[33]。

为解析不同真菌发酵对沉香叶黄酮代谢网络的影响，本研究进一步对 CXY、CXYPC 和 CXYPS 中的黄酮类代谢物进行分类统计分析（图 5a~c），共鉴定到 53 种黄酮类代谢物。图 5a 展示的是各组样品中黄酮类代谢物的总体相对占比（以各组黄酮总峰面积为 100%计），柱状高度反映各组黄酮总体峰面积的归一化比较，三组黄酮峰面积总和分别为（3.62±0.15）×10^7、（5.89±0.15）×10^7 和（8.68±0.30）×10^7（均值±SD，n=3），CXYPC 和 CXYPS 分别为 CXY 的 1.63 倍和 2.40 倍；图 5b 则展示黄酮类代谢物在各组黄酮总量中的相对构成比例（各组内部各亚类之和为 100%）。两者结合可同时反映发酵对黄酮总量的影响及其内部组成结构的重塑规律。结果显示，CXYPS 的总黄酮相对占比最高，其次是 CXYPC。此外，三种样品中黄酮类代谢物组成均呈现明显的多样性，其中“其他类”和“糖苷类”是主要组成部分，占据绝大部分比例，表明沉香叶精油中黄酮类物质主要以结合态衍生物形式存在，而游离型黄酮及特征结构黄酮亚类所占比例相对较低[44]。

具体而言，在 CXY 中，“其他类”黄酮代谢物占比最高，达到 56.13 wt.%，其次为糖苷类（35.18 wt.%）和异黄酮类（6.97 wt.%），其余类型如甲基酮、羟基黄酮、黄酮苷、查尔酮和黄酮醇等占比较低。这一结果表明，未经微生物作用的沉香叶中黄酮主要以复杂衍生物形式存在，可能包括多种甲氧基化、糖基化或酰基化修饰产物。植物来源黄酮通常通过糖基化和甲基化等方式降低自身反应活性，提高细胞储存稳定性，因此在植物组织中常以结合态形式积累[44,45]。类似现象已在茶叶、药食植物及芳香植物中被广泛报道，植物次生代谢物通常以糖苷结合形式储存，并在加工或发酵过程中经糖苷酶等水解作用释放活性苷元。

在 CXYPC 中的黄酮类代谢物组成发生明显重构。其中，糖苷类比例由 35.18 wt.%提高至 38.16 wt.%，异黄酮比例由 6.97 wt.%下降至 5.33 wt.%，而甲基酮类化合物比例升高，由 0.77 wt.%升高至 3.20 wt.%。此外，黄烷酮类比例由 0.04 wt.%提高至 0.66 wt.%，双黄酮类由 0.016 wt.%增加至 0.054 wt.%。上述结果推测，Penicillium camponotum 发酵可能促进了黄酮类化合物的结构转化，其中甲基酮类比例的升高尤其值得关注，推测可能与甲基化及黄酮骨架修饰相关。真菌在发酵过程中可产生 β-葡萄糖苷酶、氧化还原酶、甲基转移酶等多种胞外酶系，能够促进结合态黄酮的水解以及羟基、甲氧基等取代基的重新修饰，从而改变黄酮类化合物的结构分布[33]。值得注意的是，糖苷类黄酮比例的进一步提高，说明 *Penicillium camponotum* 可能促进黄酮糖基化衍生物积累，或通过细胞壁降解作用释放原本结合于细胞壁基质中的黄酮糖苷，提高其可检测水平。这与前述非挥发性代谢组分析中 Flavonoid biosynthesis（ko00941）、Flavone and flavonol biosynthesis（ko00944）及 Biosynthesis of phenylpropanoids（ko01061）变化的结果相一致，进一步支持该菌株能够通过调节苯丙烷-黄酮代谢网络促进黄酮类物质重塑[36]。

相比之下，CXYPS 表现出不同的黄酮代谢调控模式。CXYPS 中“其他类”黄酮比例进一步提高至 57.17 wt.%，糖苷类保持较高水平（37.72 wt.%），而异黄酮比例下降至 3.36 wt.%，明显低于 CXY 和 CXYPC。同时，甲基酮类比例由 0.77 wt.%增加至 0.96 wt.%，黄烷酮比例由 0.04 wt.%增加至 0.09 wt.%，花青素比例由 0.028 wt.%提高至 0.047 wt.%。这一结果说明，*Phaeoacremonium scolyti* 发酵过程中可能更倾向于维持黄酮糖苷类和复杂衍生物积累，而对异黄酮类结构发生更明显的转化或降解[33]。因此，CXYPS 中异黄酮比例降低可能表明该菌株具有更强的异黄酮转化能力，将其进一步转化为其他结构衍生物。

进一步比较两种真菌发酵效果发现，*Penicillium camponotum* 和 *Phaeoacremonium scolyti* 均能够改变沉香叶黄酮类代谢物组成，但二者具有明显菌株特异性。*Penicillium camponotum* 发酵后甲基酮类和黄烷酮类比例升高，提示其可能促进黄酮氧化修饰和结构重排；而 *Phaeoacremonium scolyti* 则表现出较高比例的糖苷类及其他复杂黄酮衍生物积累，说明其可能更倾向于维持黄酮结合态储存形式[33,34]。此外，三种样品中黄酮苷、黄酮醇、羟基黄酮、儿茶素和黄烷醇等亚类均保持较低比例，说明沉香叶精油中的优势黄酮组分主要由糖苷类、异黄酮类及未知结构衍生物构成。

总体而言，微生物发酵明显改变了沉香叶精油中黄酮类代谢物的组成结构，但不同真菌表现出不同的调控模

式。*Penicillium camponotum* 更倾向于促进黄酮结构修饰和功能性衍生物形成，而 *Phaeoacremonium scolyti* 则主要维持糖苷型及复杂黄酮衍生物积累。

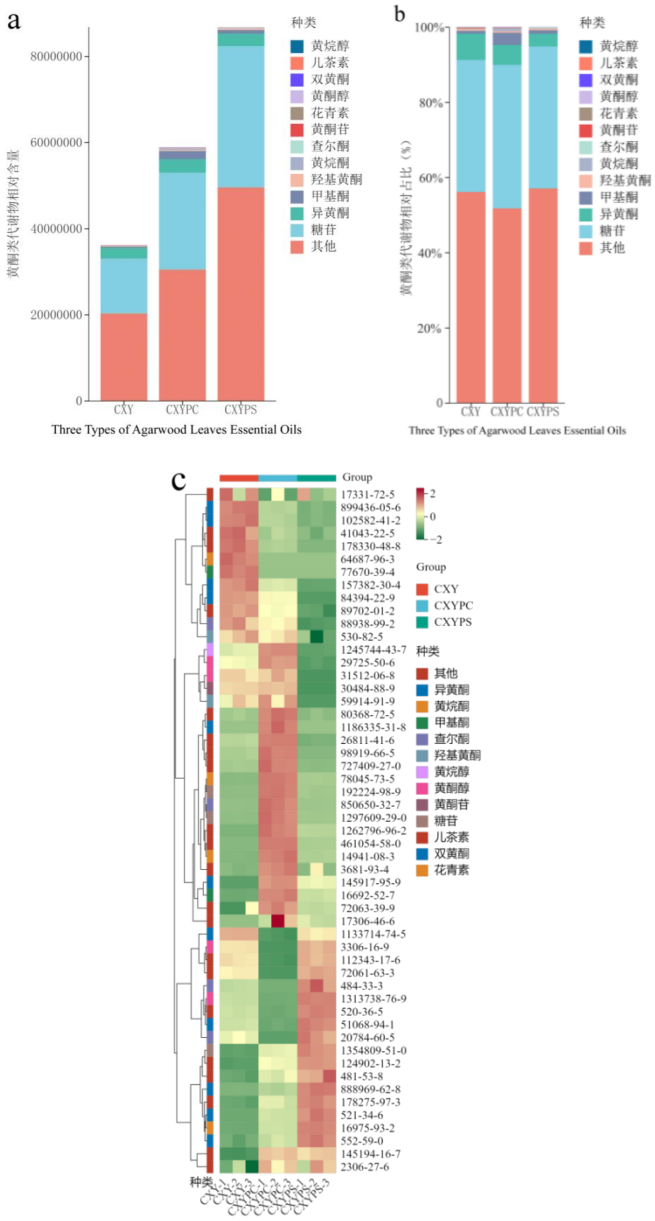


图 5 3 种沉香叶精油的黄酮类代谢物差异分析

Fig.5 Comparative Analysis of Flavonoid Metabolites in Three Types of Agarwood Leaves Essential Oils

注：（a）相对含量；（b）相对占比（%）；（c）聚类热图分析。

3 结论

本研究以沉香叶为原料，分别接种 *Penicillium camponotum* 和 *Phaeoacremonium scolyti* 进行固态发酵，采用亚临界提取获得精油，并基于 UPHLC-MS/MS 广泛靶向代谢组学技术系统分析了发酵前后非挥发性代谢物的变化规律。沉香叶精油中共鉴定出 981 种代谢物，以脂质类、酮/醛/酯类和萜类为主体。两株真菌发酵均重塑了沉香叶精油的代谢谱，PCA 和 OPLS-DA 显示三组样品明显分离，其中黄酮类代谢物的相对占比由未发酵的 39.43 wt.% 分别提升至 55.51 wt.%（CXYPC）和 74.08 wt.%（CXYPS），KEGG 通路富集进一步证实黄酮生物合成、苯丙烷代谢等通路显著富集。两种真菌表现出明显的菌株特异性代谢调控差异，*Penicillium camponotum* 倾向于促进甲基酮类和黄烷酮类等黄酮结构修饰产物的积累，而 *Phaeoacremonium scolyti* 则更倾向于维持糖苷型黄酮的富集，这可能与二者激活苯丙烷代谢途径的程度及其对初级代谢物（如有机酸、脂质）的利用效率不同有关。上述结果表

明，微生物发酵推测有助于增强沉香叶副产物的功能活性成分水平，为其从低值副产物向高附加值功能性原料的转化提供了可行路径。根据两株真菌的代谢调控特性，在具体应用场景中可进行差异化菌株选择：若目标为富集结构修饰型黄酮（如甲基酮类、黄烷酮类）以追求化学多样性和新型活性成分挖掘，可优先选用 *Penicillium camponotum*；若目标为最大化总黄酮含量以制备高黄酮提取物，可优先选用 *Phaeoacremonium scolyti*。需要指出的是，本研究主要聚焦于发酵前后沉香叶精油化学成分的变化规律，尚未开展功能活性评价及安全性评估（包括真菌毒素、活菌残留等），这些内容是后续研究的重要方向。后续将结合体外活性筛选与安全性评价，进一步明确发酵沉香叶精油的功能应用潜力与食用安全边界。同时可结合酶学分析或转录组学手段，深入解析两株真菌关键酶系在黄酮代谢重塑中的具体作用机制，为沉香叶发酵工艺的定向优化和功能性产品开发提供更深层次的科学支撑。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020.

[2] NAEF R. The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of Aquilaria species: A review [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2011, 26(2): 73-87.

[3] 彭德乾,王灿红,刘洋洋,等.沉香的化学成分及其药理活性的研究进展[J].中国现代应用药学,2021,38(3):358-365.

[4] LI W, CHEN H Q, WANG H, et al. Natural products in agarwood and Aquilaria plants: chemistry, biological activities and biosynthesis [J]. Natural Product Reports, 2021, 38(3): 528-565.

[5] 杨云,冯剑,朱杰霄,等.中国及东南亚国家沉香树采用通体结香技术产沉香的质量比较[J].中国药学杂志,2019,54(23):1988-1994.

[6] 许利嘉,刘海波,马培,等.沉香叶茶饮的研究进展[J].中国现代中药,2021,23(9):1525-1533.

[7] 来银芳,丁宗妙,华丽萍,等.沉香大健康产品开发进展与展望[J].中草药,2023,54(4):1342-1352.

[8] 傅建阳,申艳,杜泽祝,等.沉香叶提取物的结构、化学成分及活性[J].中国食品学报,2026,26(3):99-112.

[9] 梁冬霞,周巧仪,谭水福,等.白木香叶功能及开发研究进展[J].广东茶业,2024,6:2-6.

[10] 凡丹,平璐丹.工业技术在提炼沉香精油设备中的应用研究[J].塑料工业,2026,2:199.

[11] 杨媛媛,唐语谦,杨继国.亚临界萃取琥珀精油工艺优化及活性分析[J].现代食品科技,2024,40(4):225-235.

[12] 黄颖,何欣,李浩凌,等.白木香内生真菌的分离鉴定及诱导结香作用研究[J].中国现代中药,2024,26(2):334-341.

[13] CHHIP A H, KAUSIK N. Fungal and bacterial diversity isolated from Aquilaria malaccensis tree and soil, induces agarospirol formation within 3 months after artificial infection [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1286.

[14] 马天骄,陈金梦,孟慧,等.基于 GC-MS 分析两株内生真菌在白木香培养基中发酵产生沉香特征性成分的动态变化[J].微生物学通报,2026,53(6):3150-3171.

[15] 邓力,黄满勤,欧成军,等.沉香的 2-(2-苯乙基)色酮类成分分析[J].陕西林业科技,2024,2:34-44.

[16] 颜学行,赵媛,满红平,等.不同有益微生物协同发酵对普洱茶芳香物质的影响[J].食品科学,2023,44(10):188-194.

[17] CHEN W, GONG L, GUO Z, et al. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics [J]. Molecular Plant, 2013, 6(6): 1769-1780.

[18] 徐天润,刘心昱,许国旺.基于液相色谱-质谱联用技术的代谢组学分析方法研究进展[J].分析测试学报,2020,39(1):10-18.

[19] 刘耕苑,韩张雄,李春苗,等.液相色谱-三重四极杆质谱技术在植物样品检测中的应用研究进展[J].农业与技术,2026,46(1):161-168.

[20] WANT E J, O'MAILLE G, SMITH C A, et al. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(3): 743-752.

[21] WU P, SUN L, QI S, et al.Extraction process, chemical profile, and biological activity of aromatic oil from agarwood leaf (Aquilaria sinensis) by supercritical carbon dioxide extraction [J]. Journal of CO2 Utilization, 2023, 77(c): 102615.

[22] 张国权,罗崧方,黄建蓉,等.三氯化铝比色法检测桑叶提取物总黄酮的研究[J].农产品加工,2018,7:52-54.

[23] RAINER J, VICINI A, SALZER L, et al. A modular and expandable ecosystem for metabolomics data annotation in R [J]. Metabolites, 2022, 12(2): 173.

[24] SMITH C A, WANT E J, O'MAILLE G, et al. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear

peak alignment, matching, and identification [J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(3): 779-787.

[25] VANDEN BERG R A, HOEFSLOOT H C, WESTERHUIS J A, et al. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data [J]. BMC Genomics, 2006, 7: 142.

[26] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS: A Journal of Integrative Biology, 2012, 16(5): 284-287.

[27] 刘欣怡,王雅丽,王昊,等.4 种沉香树叶片挥发油化学成分 GC-MS 分析[J].热带作物学报,2022,43(1):196-206.

[28] WU P, SUN L, QI S, et al. Extraction process, chemical profile, and biological activity of aromatic oil from agarwood leaf (Aquilaria sinensis) by supercritical carbon dioxide extraction [J]. Journal of CO_2 Utilization, 2023, 77: 102615.

[29] 张航,马家乐,管妮利,等.沉香中倍半萜类化学成分研究[J].中国中药杂志,2022,47(16):4385-4390.

[30] KANEHISA M, FURUMICHI M, TANABE M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D353-D361.

[31] THEVENOT E A, ROUX A, XU Y, et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses [J]. Journal of Proteome Research, 2015, 14(8): 3322-3335.

[32] WORLEY B, POWERS R. Multivariate analysis in metabolomics [J]. Current Metabolomics, 2013, 1(1): 92-107.

[33] 赖晓微,邓可众,罗梦甜,等.真菌发酵对中药化学成分的转化及应用研究进展[J].中国酿造,2024,43(6):21-26.

[34] SHEN F,WANG T Y,WU Z Q, et al. Metabolism and release of characteristic components and their enzymatic mechanisms in Pericarpium Citri Reticulatae co-fermentation [J]. Food Chemistry, 2024, 432: 137227.

[35] 陈欣怡,张洋,于单,等.黑曲霉发酵藤茶对酿酒酵母抗逆性能的影响及其机制研究[J].江苏农业科学,2026,54(7):186-194.

[36] VOGT T. Phenylpropanoid biosynthesis [J]. Molecular Plant, 2010, 3(1): 2-20.

[37] DIXON R A, STEELE C L. Flavonoids and isoflavonoids-a gold mine for metabolic engineering [J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(10): 394-400.

[38] 杨金梅,李云嵌,何霞红,等.4 种真菌发酵对三七叶化学成分及药理活性的影响[J].食品科学,2023,44(20):198-211.

[39] 罗清,彭程,叶波平.青霉属真菌研究新进展[J].药物生物技术,2016,23(5):464-468.

[40] NING Y N, TIAN D, ZHAO S, et al. Regulation of genes encoding polysaccharide-degrading enzymes in Penicillium [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 108.

[41] SANTOS C, FRAGOEIRO S, VALENTIM H, et al. Phenotypic characterisation of Phaeoacremonium and Phaeomoniella strains isolated from grapevines: Enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses [J]. Scientia Horticulturae, 2006, 107(2): 123-130.

[42] ESSAKHI S, MUGNAI L, CROUS P W, et al. Molecular and phenotypic characterisation of novel Phaeoacremonium species isolated from esca diseased grapevines [J]. Persoonia, 2008, 21: 119-134.

[43] CAMPOS M D, ZANNINIF, PATANITA M, et al. Diversity of specialized metabolites in Phaeoacremonium species revealed by untargeted metabolomics and bioactivity assays [J]. Scientific Reports, 2026, 16: 9254.

[44] JONES P, VOGT T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism [J]. Planta, 2001, 213(2): 164-174.

[45] BOWLES D, ISAYENKOVA J, LIM E K, et al. Glycosyltransferases: managers of small molecules [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2005, 8(3): 254-263.