

黄曲霉菌的差异挥发性代谢产物及其代谢途径分析

黄海游¹, 胡昊¹, 李淑军², 钟读波³, 胥志祥¹, 孙磊业¹, 韩丰霞^{*4}

(1. 昆明理工大学 环境科学与工程学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南大学 科技咨询发展中心, 云南 昆明 650000; 3. 云南云测质量检验有限公司, 云南 昆明 650000; 4. 昆明理工大学 创新发展研究院, 云南 昆明 650000)

摘要: 为了弥补当前食品安全检测技术相对滞后的缺陷, 构建了气相色谱-质谱(GC-MS)结合顶空固相微萃取(HS/SPME)技术用于探究黄曲霉菌的挥发性代谢产物, 并结合代谢组学和基因组学分析豆腐干中黄曲霉菌差异性代谢产物及其代谢途径。结果表明黄曲霉菌的差异性代谢物包括1,2,3-三甲基-苯、均三甲苯、乙醇、十六烷酸甲酯、2,4-二叔丁基苯酚、乙酸、三氯甲烷、1-丁醇、1-甲基-3-(1-甲基乙基)-苯。特别地, 乙酸、乙醇和1-丁醇在黄曲霉菌代谢网络中起关键作用。

关键词: 代谢组学; 基因组信息; 黄曲霉; 气相色谱-质谱法(GC-MS); 顶空固相微萃取(HS/SPME)

中图分类号: TS 201.6 文章编号: 1673-1689(2021)04-0105-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.04.012

Analyses of Differential Volatile Metabolites of *Aspergillus flavus* and Their Metabolic Pathway

HUANG Haiyou¹, HU Hao¹, LI Shujun², ZHONG Dubo³, XU Zhixiang¹, SUN Leiye¹, HAN Fengxia^{*4}

(1. Faculty of Environmental Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2. Science and Technology Consulting and Development Center, Yunnan University, Kunming 650500, China; 3. Yunnan Cloud Test Quality Inspection Co. LTD, Kunming 650500, China; 4. Institute for Innovation and Development, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: To make up a defect of current food safety testing technology, gas chromatography-mass spectrometry technology (GC-MS) combined with headspace solid phase microextraction (HS/SPME) was established to explore the volatile metabolites of *Aspergillus flavus*. Then the differential metabolites and their metabolic pathways of *Aspergillus flavus* in dried bean curd were analyzed by metabolomics and genomics approaches. The results showed that the differential metabolites of *Aspergillus flavus* contained 1,2,3-trimethyl-benzene, mesitylene, ethanol, methyl hexadecanoate, 2,4-ditert-butylphenol, acetic acid, trichloromethane, 1-butanol and 1-methyl-3-(1-methylethyl)-benzene. Particularly, acetic acid, ethanol and 1-butanol played key roles in the metabolic network of *Aspergillus flavus*.

Keywords: metabolomics, genomic information, aspergillus flavus, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), head space/solid phase microextraction (HS/SPME)

收稿日期: 2019-12-09

* 通信作者: 韩丰霞(1983—), 女, 博士, 助理研究员, 硕士研究生导师, 主要从事环境生态安全与质量管理研究。

E-mail: hanfengxia@kust.edu.cn

世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 公告指出每年发生的食源性疾病达数 10 亿例;发达国家每年至少有三分之一的人群患食源性疾病,其中约有 170 万 15 岁以下的儿童因食源性微生物污染引起腹泻而死亡^[1]。据调查,我国 2010—2014 年,食源性疾病暴发案例有 2 000 多起,发病人数约有 63 000 人,其中死亡人数约有 970 人,而微生物引起食源性疾病暴发案例有 41.1%,其中微生物病原菌是引起食源性疾病暴发的主要原因^[2]。黄曲霉的污染不仅对人的健康造成巨大伤害,而且对农业经济造成巨大损失^[3]。据联合国粮食及农业组织报道,全球每年约有 2% 的农作物因为受霉菌污染而失去利用价值^[4]。

代谢组学以小分子生物标志物为研究对象,相较于大分子物质(蛋白质、脂质和核酸),其研究更快速和准确,因此在不同学科领域作为快速检测方法被加以开发和应用。其中,环境中物质的变化可通过介导微生物代谢使微生物对环境变化产生持续反应^[5]。同样地,不同食品中微生物代谢物的变化也能反映出微生物处于在不同环境(食品)中的变化。黄光琦等^[6]研究指出,黄曲霉毒素 B1(aflatoxin B1)通过与 tRNA 结合形成加成物(B-tRNA),降低 tRNA 与某些氨基酸结合的活性,从而抑制必需氨基酸(如赖氨酸,亮氨酸,精氨酸和甘氨酸)与 tRNA 的结合,最终在翻译水平上干扰了蛋白质生物合成,影响了细胞的正常代谢。Lee 等^[7]在 2015 年通过代谢组学分析方法发现了黄曲霉中新的四肽和抗炎代谢产物。谢华里等^[8]利用非靶标代谢组学研究温度对黄曲霉代谢的影响,发现温度影响多个代谢途径,且曲酸和黄曲霉毒素的累积变化规律相似。然而,大分子物质检测的滞后性导致不能提前预防黄曲霉菌产生的潜在健康问题。基于此,作者从小分子代谢物入手,通过寻找食物污染早期的差异性代谢物,为食品安全预防和检测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豆腐干作为一种常见的休闲零食和佐餐佳品,其食品原材料和加工过程都极易被微生物污染^[9],因此从豆腐干入手研究黄曲霉菌在豆腐干中的差异性代谢物。

黄曲霉菌(CGMCC 3.6431):购自中国普通微生物

菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC);即食豆腐干:购自某超市(主要成分为大豆,水,植物油,食用盐,酿造酱油,红糖,芝麻,香辛料,谷氨酸钠,食用香精,双乙酸钠,乙基麦芽酚,5'-呈味核苷酸二钠,氯化镁)。乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯):美国西格玛公司产品;二氯甲烷(色谱纯):美国迈瑞达公司产品;液体察氏培养基:百思生物公司产品。

1.2 仪器与设备

气相色谱质谱联用仪(7890N-5975C):美国安捷伦公司产品,并配自动进样器(A7683B)、MSD 化学工作站和 NIST 14.0 数据库;固相微萃取头(75 μ m CAR-PDMS):美国色谱科公司产品;高速冷冻离心机(Allegra X-15R):美国贝克曼公司产品;冷冻干燥机(FDU-1200):日本东京理化公司产品;试管分散机(UTTD):德国艾卡公司产品;灭菌锅(BXM-30R):上海博讯公司产品;恒温培养箱(MJ-70-I):上海一恒公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 菌体准备 将-80 $^{\circ}$ C 保藏的 1 mL 菌液加入 200 mL 察氏培养基中,在 30 $^{\circ}$ C 培养箱内振荡(150 r/min)培养 5 d。将豆腐干和超纯水以质量比 1:10 的比例加入灭菌搅拌机里,打碎 10 min,制作成豆腐干液体培养基。取培养好的 1 mL 菌液加入 200 mL 豆腐干培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养黄曲霉菌 5 d。

1.3.2 代谢物提取 取上述样品 10 g 于 50 mL 离心管中,迅速加入 10 mL 的-40 $^{\circ}$ C 冷甲醇溶液(体积分数 60%)^[10-12],振荡混匀后置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中冷冻 12 h 进行淬灭。

将淬灭后的冰冻样品放于冷冻干燥机中进行冻干,冻干后的样品再加入 10 mL 乙腈、甲醇和水的混合溶液(体积比为 2:2:1)^[13-15],振荡后将溶液倒入带有 3 种规格玻璃球的液体均质器中破碎 10 min。将破碎后的样品置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 2 h,进行代谢物的提取。

将反应后的溶液离心 15 min(-4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min),取出上清液,置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中冻藏 12 h,再将冰冻样品进行冷冻干燥。在 GC-MS 应用中,一种是测定生物体自然产生的挥发性代谢物,一种是需要衍生化的代谢物。为了保存更多更原始的物质,选择测定其自然状态下的挥发性代谢物,不作衍生化处

理。进样前,加入 2 mL 二氯甲烷溶解,混匀,然后上机测样。

1.3.3 顶空固相微萃取(HS-SPME)挥发性代谢物取 10 mL 培养 5 d 后的豆腐干混合液加入到顶空瓶中,用密封橡胶垫封死,待萃取。

将 75 μm CAR PDMS 固相微萃取头刺入顶空瓶中,在离液面 2 cm 处进行 30 min(40 $^{\circ}\text{C}$)萃取。萃取结束后立即手动上机检测。

1.3.4 GC-MS 条件 DB-624 毛细管色谱柱(60 m $\times$ 320 μm $\times$ 1.80 μm);载气:高纯氦气;流速:2.0 mL/min;柱温升温程序:初始温度 40 $^{\circ}\text{C}$,保持 6 min,然后以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 230 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min。自动进样 1.0 μL ;采用不分流模式;进样口温度 230 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件:离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$;接口温度 230 $^{\circ}\text{C}$;全扫描模式,质量扫描范围 29~350 m/z 。

1.4 真菌基因组测序

利用目前使用最广泛的二代测序平台 Illumina HiSeq $\times$ 10 平台,对质检合格的 DNA 样品构建插入片段为约 400 bp 的片段,进行 PE150(pair-end)测序,即双端测序,单端测序读长 150 bp,每个样品提供不低于基因组 100 $\times$ 覆盖深度的原始测序数据量;真菌基因组精细图,采用“二代+三代”的测序模式,

对同一样品分别提供 ≥ 100 倍 PE150 数据和 ≥ 80 倍的三代数据,基于所获得的测序数据进行一系列分析。

1.5 数据处理

原始数据经过过去噪和归一化后整理成 Excel 表,通过 NIST 14.0 质谱数据库比对确认各物质。利用峰面积通过 SIMCA 14.1 进行主成分分析和正交偏最小二乘判别分析,选取 VIP 值大于 1 的物质作为潜在的差异物,根据分子量小、相对产量高、代谢重要性强的原则选取深入分析的代谢物。基因组序列信息通过 KEGG genes 和 KEGG LIGAND 数据库比对,进行分类和整理,使用 Gephi 软件构建代谢网络图。

2 结果与分析

2.1 GC-MS 测定结果

图 1 从下往上分别为 6 个豆腐干培养基样品总离子流(TIC)图和 12 个接种黄曲霉菌的豆腐干培养基总离子流图,只有在保留时间 25.194 min 时有明显的差异,是接种黄曲霉菌的样品中 (Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸甲酯独有的峰。

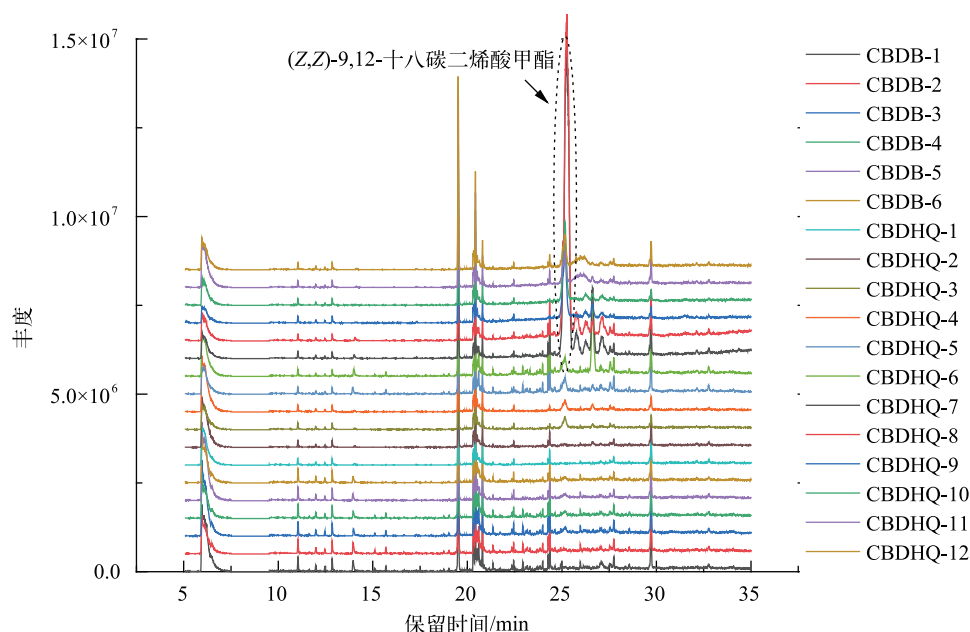


图 1 豆腐干培养基(CBDB)和接种黄曲霉菌的豆腐干培养基(CBDHQ)总离子流叠放图

Fig. 1 Total ion chromatogram stacking map of dried bean curd medium and dried bean curd medium inoculated with *Aspergillus flavus*

图2是顶空固相微萃取实验的总离子流叠放图,从下往上分别为3个豆腐干培养基样品总离子流(TIC)图和3个接种黄曲霉菌的豆腐干培养基总离子流图。分析可知,乙醇、2-甲基-1-丙醇、2-甲基-丁醛、1-戊烯-3-醇、3-甲基-1-丁醇、7-[2-(4-

甲氧基苯基)乙烯基]-2-甲基-3-苯基吡唑并[1,5-a]嘧啶是接种了黄曲霉菌的样品中独有的挥发性物质。需要通过判别模型结合自然挥发特征物质来整理差异代谢物的代谢途径。

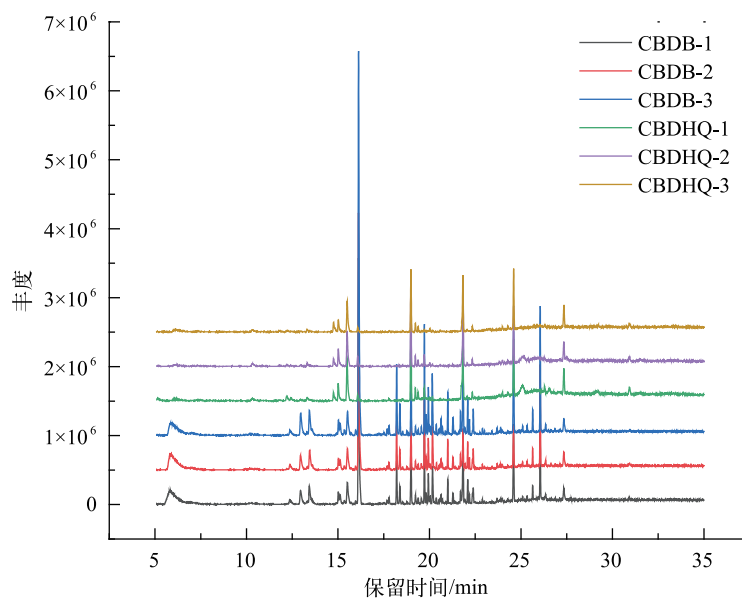
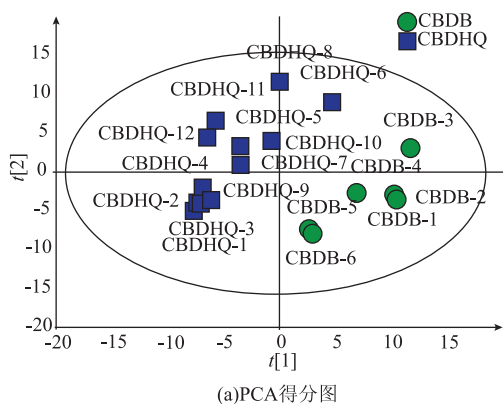


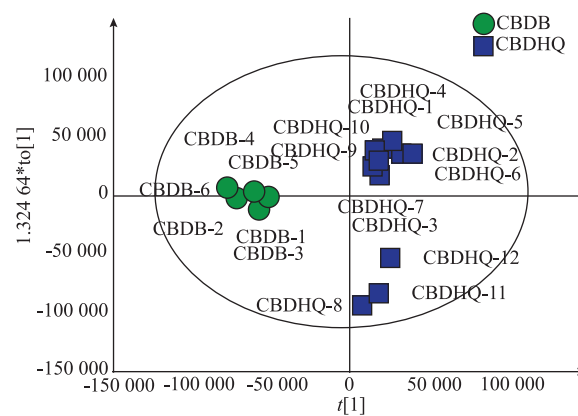
图2 顶空固相微萃取实验的豆腐干培养基(CBDB)和接种黄曲霉菌的豆腐干培养基(CBDHQ)总离子流叠放图

Fig. 2 Total ion chromatogram stacking map of dried bean curd medium and dried bean curd medium inoculated with *Aspergillus flavus* in headspace solid phase microextraction

利用检测所得的各物质的归一化峰面积建立模型,主成分分析(PCA)使得由 m 个样品和 $m \times n$ 个物质峰面积组成的 n 维矩阵降维到一个平面空间内,将最具差异的影响因子方向作为主成分。主成分分析也是代谢组学中最常用的分析方法^[16]。从图3(a)可知,豆腐干培养基(CBDB)和接种黄曲霉菌5 d的豆腐干培养基(CBDHQ)在主成分分析模型上有非常明显的区别,说明两组样品的检出物有着明显的差异。



(a)PCA得分图



(b)OPLS-DA得分图

图3 豆腐干培养基(CBDB)和接种了黄曲霉菌的豆腐干培养基(CBDHQ)代谢物主成分分析得分图与正交偏最小二乘判别得分图

Fig. 3 Principal component analysis score map and orthogonal partial least squares discriminant score map of dried bean curd medium and dried bean curd medium inoculated with *Aspergillus flavus*

偏最小二乘判别方法(PLS-DA)是一种有监督的分类程序,其中类成员信息用于建立判别模型,因此可用于识别最能鉴别样品组的化合物。作为代谢组学常用的分析方法,2002年 Trygg 和 Wold^[17]把 PLS 算法升级为正交偏最小二乘法(OPLS),OPLS 更易于看出两组之间的差异^[18]。SIMCA 将 OPLS-DA 也作为软件 14.1 版的分析功能。VIP 值(投影的可变重要性)总结了变量在解释 X 和 Y 相关时的重要性,大于 1 的 VIP 值表示重要的 X 变量,低于 0.5 的值表示不重要的 X 变量。1 到 0.5 之间的间隔是灰色区域,其中重要性级别取决于数据集的大小。本研究的 OPLS-DA 模型见图 3(b),模型中 $R^2Y=0.954$, $Q^2=0.755$,说明模型有很好的稳定性和预测性。VIP 预测值大于 1 的物质有 1,2,3-三甲基-苯、均三甲苯、乙醇、十六烷酸甲酯、2,4-二叔丁基苯酚、乙酸、三氯甲烷、1-丁醇、1-甲基-3-(1-甲基乙基)-苯。

2.2 黄曲霉菌基因组测定结果

基因组全长 37 687 868 bp,GC 含量为 48.2%。共编码 13 897 个基因,包含 10 949 个功能基因、272 个 tRNA 基因、43 个 rRNA 基因和 2 633 个未知基因。在 KEGG 基因分类系统中,具体的信号通路相关基因有 576 个;代谢相关基因有 2 514 个;人类疾病相关基因有 787 个;遗传信息处理相关基因有 788 个;组织系统相关基因有 555 个;环境信息处理相关基因有 337 个。

为了更清晰地表达黄曲霉菌的代谢信息,利用 Gephi 软件建立黄曲霉菌的代谢途径关系网络图,见图 4,箭头所指方向为代谢正向,图中每个点代表一个代谢途径,点的大小代表与该代谢途径相关的代谢途径的数量。对于黄曲霉菌,大部分的基因表达是关于基础代谢(占代谢途径总数的 35.47%)的,且大部分其它代谢途径受基础代谢的影响。其中,代表 MAPK 信号通路的点是非基础代谢点中最大,表明该通路影响和被影响的代谢途径很多。

乙酸的代谢途径见图 5。乙酸在牛磺酸和亚牛磺酸代谢途径中由乙酰磷酸酯经乙酸激酶(ACK)产生。它在丙酮酸代谢中由乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 合成酶(ACS)作用下产生,也能在乙酰辅酶 A 合成酶(ACS)或乙醛脱氢酶 ALDH(NAD^+)作用下由乙醛产生;由乙酰磷酸酯在乙酸激酶(ACK)或酰基磷酸酶(ACYP)作用下产生。乙酸在甲烷代谢途径中由乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 合成酶(ACS)作用下

产生;由乙酰磷酸酯经乙酸激酶(ACK)产生。乙酸主要参与了丙酮酸代谢、糖酵解过程、甲烷代谢过程,它作为乙酰辅酶 A 的中间产物,极大地影响了黄曲霉毒素的合成^[19]。糖酵解过程主要影响了三羧酸循环(TCA cycle),淀粉和蔗糖代谢,戊糖和葡萄糖醛酸相互转化的过程;牛磺酸和亚牛磺酸代谢途径主要影响了氨基氨基酸代谢和谷胱甘肽代谢;丙酮酸代谢主要影响了甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸合成和代谢,缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸生物合成,糖酵解和糖异生过程,三羧酸循环,丁酸代谢,酮体的合成与降解,赖氨酸的合成,脂肪酸的合成和烯二炔类抗生素的生物合成;乙酸参与的乙醛酸和二羧酸代谢影响了丙酮酸代谢,三羧酸循环和糖酵解过程;甲烷代谢过程影响了硫代谢,甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢,戊糖磷酸途径和乙醛酸、二羧酸代谢。

乙醇是在糖酵解途径中由丙酮酸转化为乙酸,乙酸转化为乙醛,乙醛再经乙醇脱氢酶(ADH1)产生乙醇的代谢途径产生,其主要影响三羧酸循环,淀粉和蔗糖代谢,戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化过程。1-丁醇只由丁醛在丁醇脱氢酶(BDH)的作用下生成,影响丙酮酸代谢,三羧酸循环和维生素 B6 的代谢。2-甲基-1-丙醇、1-戊烯-3-醇可能是在丙酸代谢中衍生出来的产物,与 NAD^+ 的脱氢作用有关;2-甲基-丁醛和 3-甲基-1-丁醇猜测与丁酸代谢中丁醇脱氢酶(BDH)的作用有关;1,2,3-三甲基-苯、均三甲苯、2,4-二叔丁基苯酚、1-甲基-3-(1-甲基乙基)-苯猜测可能与芳香族化合物代谢有关。其中,乙醇、2-甲基-1-丙醇、2-甲基-丁醛、1-戊烯-3-醇、3-甲基-1-丁醇可作为今后判断黄曲霉污染的潜在特征气味物质。

3 结 语

通过代谢组学研究方法更清晰地区分被黄曲霉污染的豆腐干,并通过模型计算出差异性代谢物 1,2,3-三甲基-苯、均三甲苯、乙醇、十六烷酸甲酯、2,4-二叔丁基苯酚、乙酸、三氯甲烷、1-丁醇、1-甲基-3-(1-甲基乙基)-苯。作者结合代谢组学和基因组信息,通过对代谢网络的构建,明确了乙酸、乙醇和 1-丁醇在黄曲霉菌代谢网络中的代谢过程和作用。乙醇、2-甲基-1-丙醇、2-甲基-丁醛、1-戊烯-3-醇、3-甲基-1-丁醇也可作为黄曲霉菌的特征性挥发物质。此研究对今后建立快速检测黄曲霉污染的方法有着积极的意义。

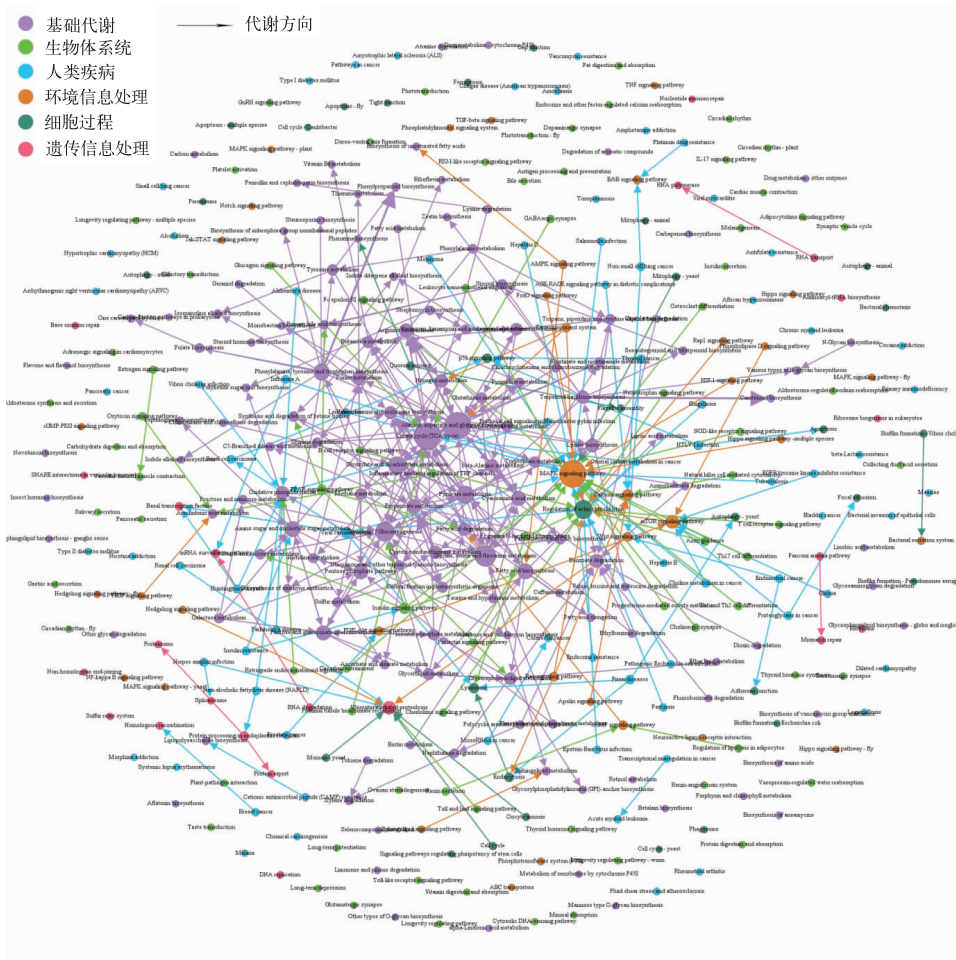


图4 黄曲霉菌代谢网络图

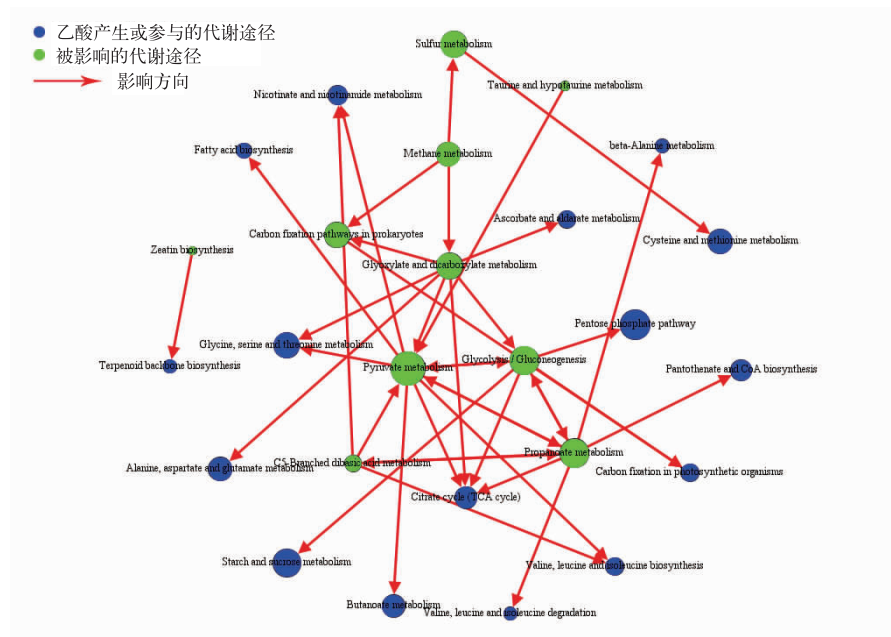
Fig. 4 Metabolic network map of *Aspergillus flavus*

图5 黄曲霉菌中乙酸参与的代谢途径网络

Fig. 5 Metabolic pathway network of acetic acid in *Aspergillus flavus*

参考文献:

- [1] 刘秀梅. 食源性微生物危险性评估[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(8): 665-669.
- [2] 李茂军. 食品中食源性致病菌污染状况分析[J]. 科技创新导报, 2015, 10: 20-21.
- [3] 王后苗, 廖伯寿. 农作物收获前黄曲霉毒素污染与控制措施[J]. 作物学报, 2012, 38(1): 1-9.
- [4] JIUJIANG Y, CLEVELAND T E, NIERMAN W C, et al. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases[J]. *Revista Iberoamericana De Micología*, 2005, 22(4): 194-202.
- [5] ARETZ I, MEIERHOFER D. Advantages and pitfalls of mass spectrometry based metabolome profiling in systems biology[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(5): 632-646.
- [6] 黄光琦, YU F L. 黄曲霉素 B1 与 tRNA 的结合作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1993, 7(3): 227-230.
- [7] LEE K C, TAM E W, LO K C, et al. Metabolomics analysis reveals specific novel tetrapeptide and potential anti-inflammatory metabolites in pathogenic *Aspergillus* species[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(6): 13850-13867.
- [8] 谢华里, 李培武, 王秀嫔, 等. 非靶标代谢组研究温度对黄曲霉菌代谢的影响[J]. 分析测试学报, 2017, 36(11): 1304-1311.
- [9] 张长贵, 吴雨, 魏源, 等. 豆腐干加工过程中微生物污染危害的控制研究[J]. 中国调味品, 2015, 40(2): 23-26.
- [10] VAN GULIK W M, CANELAS A B, SEIFAR R M, et al. The sampling and sample preparation problem in microbial metabolomics[M]// LAMMERHOFER M, WECKWERTH W. *Metabolomics in Practice*. Weinheim: Wiley-VCH, 2013.
- [11] MAHARJAN R P, FERENCI T. Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*[J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 313(1): 145-154.
- [12] VAN GULIK W M. Fast sampling for quantitative microbial metabolomics[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(1): 27-34.
- [13] LAU S K, LAM C W, CURREEM S O, et al. Metabolomic profiling of *Burkholderia pseudomallei* using UHPLC-ESI-Q-TOF-MS reveals specific biomarkers including 4-methyl-5-thiazoleethanol and unique thiamine degradation pathway[J]. *Cell & Bioscience*, 2015, 5: 26.
- [14] LAU S K, LAM C W, CURREEM S O, et al. Identification of specific metabolites in culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis* using metabolomics: exploration of potential biomarkers[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2015, 4(1): e6.
- [15] JOHNSON W M, SOULE M C K, KUJAWINSKI E B. Evidence for quorum sensing and differential metabolite production by a marine bacterium in response to DMSP[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(9): 2304-2316.
- [16] 阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 5: 481-489.
- [17] TRYGG J, WOLD S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)[J]. *Journal of Chemometrics*, 2002, 16(3): 119-128.
- [18] 阿基业, 何骏, 孙润彬. 代谢组学数据处理——主成分分析十个要点问题[J]. 药学学报, 2018, 53(6): 929-937.
- [19] 徐进, 罗雪云. 黄曲霉毒素生物合成的分子生物学[J]. 卫生研究, 2003, 32(6): 628-631.

科技信息

加拿大批准来自弯曲芽孢杆菌 AE-BAF 的 β -淀粉酶用于面包等食品

2021 年 2 月 9 日, 加拿大卫生部发布 NOM/ADM-0161 号文件, 拟修订允许使用的食品酶清单, 批准来自弯曲芽孢杆菌 AE-BAF 的 β -淀粉酶(β -amylase)用于生产麦芽酒、啤酒、淡啤酒、黑啤酒、烈性黑啤酒的酿酒麦芽浆; 面包、面粉、全麦面粉; 生糊精、葡萄糖、葡萄糖糖浆、葡萄糖固体(干葡萄糖糖浆)或麦芽糖的淀粉和非标准化烘焙产品。

[信息来源] 食品伙伴网. 加拿大批准来自弯曲芽孢杆菌 AE-BAF 的 β -淀粉酶用于面包等食品[EB/OL]. (2021-2-18). <http://news.foodmate.net/2021/02/585293.html>