

Lactobacillus casei Zhang 的甲基转移酶突变体与其野生型的代谢组学比较

张悦^{1,2}, 张文羿^{*1,2}

(1. 内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农业大学 农业农村部奶制品加工重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: DNA 甲基化作为表观遗传学的重要组成部分, 在细菌的很多生理过程中发挥着重要作用。作者基于超高效液相色谱-质谱联用非靶向代谢组学技术, 比较 DNA 甲基转移酶突变体 *Lactobacillus casei* (*L. casei*) Zhang Δ *pglX* 与野生型 *L. casei* Zhang 在对数生长前期(4 h)的代谢差异。共鉴定得到 23 个显著差异代谢物($P<0.05$), 主要富集在氨酰-tRNA 生物合成、不饱和脂肪酸生物合成、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢及半乳糖代谢等代谢途径。结果表明, DNA 甲基化表型在对数生长前期可能会影响菌株对氨基酸的合成和利用; 另一方面, DNA 甲基化表型在对数生长前期可能会调节菌株细胞膜脂肪酸成分, 改变细胞膜的通透性和流动性。

关键词: DNA 甲基化; 干酪乳杆菌; 代谢组学

中图分类号: Q 756 文章编号: 1673-1689(2023)12-0010-08 DOI: 10.12441/spyswjs.20211106001

Metabolomic Comparison of *Lactobacillus casei* Zhang Methyltransferase Mutant and Wild Type

ZHANG Yue^{1,2}, ZHANG Wenyi^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: As a crucial part of epigenetics, DNA methylation plays an indispensable role in various physiological processes in bacteria. Here, we compared the metabolomics of DNA methylation of mutant strain *Lactobacillus casei* (*L. casei*) Zhang Δ *pglX* and wild strain *L. casei* Zhang in the early logarithmic growth phase (4 h) using ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) non-targeted metabolomics technology. A total of twenty-three significantly different metabolites were identified ($P<0.05$), primarily enriched in pathways such as aminoacyl-tRNA biosynthesis, un-saturate fatty acids biosynthesis, D-glutamine and D-glutamate metabolism, and galactose metabolism. The results suggest that DNA methylation phenotype may affect the synthesis and utilization of amino acids in bacterial strains during early logarithmic growth. On the other hand, DNA methylation phenotypes may modulate the composition of cellular membrane fatty acids,

收稿日期: 2021-11-06 修回日期: 2022-01-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31922071); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2021ZD08)。

* 通信作者: 张文羿(1981—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事乳酸菌资源开发研究。E-mail: zhangwenyizi@163.com

altering membrane permeability and fluidity.

Keywords: DNA methylation, *Lactobacillus casei*, metabolomics

DNA 甲基化(methylation)是一种重要的表观遗传修饰,在 20 世纪 50 年代就已经为人所知^[1]。它不改变基因组序列,但可影响基因的表达并发生可遗传的变化。其中,腺嘌呤(N6-甲基腺嘌呤,m6A)是最重要的甲基化修饰位点,另外两种修饰位点存在于胞嘧啶(N4-甲基胞嘧啶,m4C;C5-甲基胞嘧啶,m5C)中^[2]。一般来说,m6A 常被用作细菌表观遗传调控的信号,m5C 主要存在于哺乳动物和植物中^[3],而 m4C 主要存在于细菌中^[4]。在细菌基因组中,DNA 甲基化在基因防御、细胞周期调控、DNA 的复制和修复、转录、翻译等方面发挥着重要作用^[5]。

干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)是目前研究和应用最广泛的益生菌之一,可以改善发酵制品的风味和质地,同时产生许多生物活性物质,食用后能够给宿主带来益处^[6]。因其良好的应用价值,近年来受到越来越多的关注^[7]。*L. casei* Zhang 分离自内蒙古自治区传统发酵的酸马奶样品^[8],对酸和胆盐有较高的耐受性^[9],同时具有免疫调节、抗氧化、缓解糖耐量受损、预防 2 型糖尿病等益生功能^[10]。动物实验显示,*L. casei* Zhang 能够缓解由抗生素引起的肠道菌群失衡,促进肠道微生物稳态的恢复^[11]。体外实验同时表明,*L. casei* Zhang 可以提高成年人和老年人肠道微生物生态的稳定性,同时能够调节老年人肠道菌群组成,使其向青年人肠道菌群结构转化^[12]。

代谢组学(metabolomics)用来表征生物体受到某种刺激后所产生的微小应答,即在特定状态下,对生物样品中所有低相对分子质量物质(包括多肽、脂类、氨基酸、核酸、碳水化合物等)^[13]进行定性和定量分析^[14]。目前广泛使用液相色谱与质谱联用进行代谢组学的研究^[15],其主要特点有动态范围宽、覆盖面广、灵敏度高和分辨率高等。而且,对未知化合物相对分子质量和结构的研究具有较强的稳健性和可行性^[16]。

在之前的研究中,已经证实了 *L. casei* Zhang 基因组中存在 m6A 的 DNA 甲基化表型,Hui 等通过基因敲除,单分子实时测序技术等方法,发现 *pglX* 基因是 *L. casei* Zhang 的 m6A DNA 甲基化控制基因^[17]。基于以上结果,通过比较 DNA 甲基转移酶突变体 *L. casei* Zhang Δ *pglX* 与野生型 *L. casei* Zhang

在对数生长期(4 h)的代谢差异,从代谢组学的角度,探究 DNA 甲基化表型对菌株的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

L. casei Zhang Δ *pglX*、*L. casei* Zhang 由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供。

乳酸菌适用的化学成分限定培养基(CDM):参照 Liu 等的方法^[18]进行配制。

1.2 试剂与仪器设备

HPLC-MS 级乙腈、甲酸、氢氧化铵:Sigma 公司;超高效液相色谱-质谱仪(UPLC-MS)、Waters HSS T3(1.8 μ m,2.1 mm \times 100 mm)色谱柱、MassLynx 4.1 工作站、Progenesis QI 软件:Waters 公司。

1.3 样本的制备

将保藏的 *L. casei* Zhang Δ *pglX* 和 *L. casei* Zhang 在固体 MRS 培养基上划线,37 $^{\circ}$ C 静置培养 48 h,挑取单菌落至液体 MRS 培养基,活化两代后接种至 CDM 液体培养基中,培养 4 h 后采集菌液,4 $^{\circ}$ C 下 4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,液氮速冻,置于-80 $^{\circ}$ C 保存,用于代谢组学分析。

1.4 UPLC-MS 分析

1.4.1 样品预处理 样品置于室温下解冻,12 000 r/min 离心 15 min,吸取上层清液至 2 mL EP 管,丢弃下层脂肪层,加入乙腈溶液,在 4 $^{\circ}$ C 静置 2 h,12 000 r/min 离心 10 min,再次吸取上清液,将其通过 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤,并分装到上样瓶中。

1.4.2 液相色谱和质谱条件 利用 UPLC-MS 进行代谢组学分析,分离柱使用 Waters HSS T3(1.8 μ m,2.1 mm \times 100 mm)色谱柱。整个测定过程中柱温保持在 35 $^{\circ}$ C,进样量 5 μ L,流量 0.32 mL/min。正离子模式下采集。水相流动相 A 为含体积分数 0.1%甲酸的水溶液,有机相流动相 B 为含体积分数 0.1%甲酸的乙腈溶液,梯度洗脱条件见表 1。负离子模式下采集,水相流动相 A 为含体积分数 0.1%氢氧化铵的水溶液,有机相流动相 B 为纯乙腈,梯度洗脱条件见表 2。

表 1 正离子模式梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions in positive ion mode

时间/ min	流量/ (mL/min)	A 相体积 分数/%	B 相体积 分数/%	线性 梯度
0	0.32	98.0	2.0	6
2.00	0.32	98.0	2.0	6
3.00	0.32	90.0	10.0	6
8.00	0.32	90.0	10.0	6
9.50	0.32	30.0	70.0	6
11.00	0.32	10.0	90.0	6
13.00	0.32	10.0	90.0	6
14.00	0.32	50.0	50.0	6
15.00	0.32	98.0	2.0	6

质谱采用 ESI 源正、负离子模式采集,以高度纯化的氮气和氩气作为雾化气和碰撞气体,扫描范围 m/z 50~1 200。毛细管电压 3 kV,离子源温度 120 ℃,脱溶剂气温度 500 ℃,脱溶剂气流量 800 L/h。

1.5 数据处理及统计学分析

使用 MassLynx 4.1 工作站采集原始数据,得到原始数据后通过 Progenesis QI 软件完成色谱峰提取、峰对齐、去卷积化等预处理,导出数据矩阵文件。然后使用 MetaboAnalyst 5.0 在线软件对数据矩阵进行标准化处理,最后通过 Simca 14.0 软件进行多元统计分析。

多元统计分析采用无监督的主成分分析(PCA)和有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。

表 2 负离子模式梯度洗脱条件

Table 2 Gradient elution conditions in negative ion mode

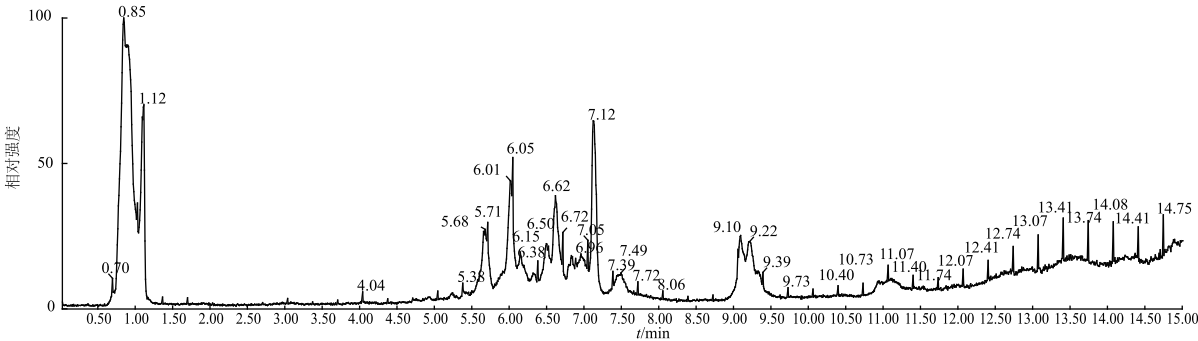
时间/ min	流量/ (mL/min)	A 相体积 分数/%	B 相体积 分数/%	线性 梯度
0	0.32	98.0	2.0	6
2.00	0.32	98.0	2.0	6
3.00	0.32	90.0	10.0	6
8.00	0.32	30.0	70.0	6
9.50	0.32	10.0	90.0	6
11.00	0.32	10.0	90.0	6
13.00	0.32	10.0	90.0	6
14.00	0.32	50.0	50.0	6
15.00	0.32	98.0	2.0	6

结合变量重要性投影(VIP)>1、 $P<0.05$ 及差异变化倍数(fold change)>2,确定显著差异代谢物。将筛选出的显著差异代谢物进行代谢通路富集分析。

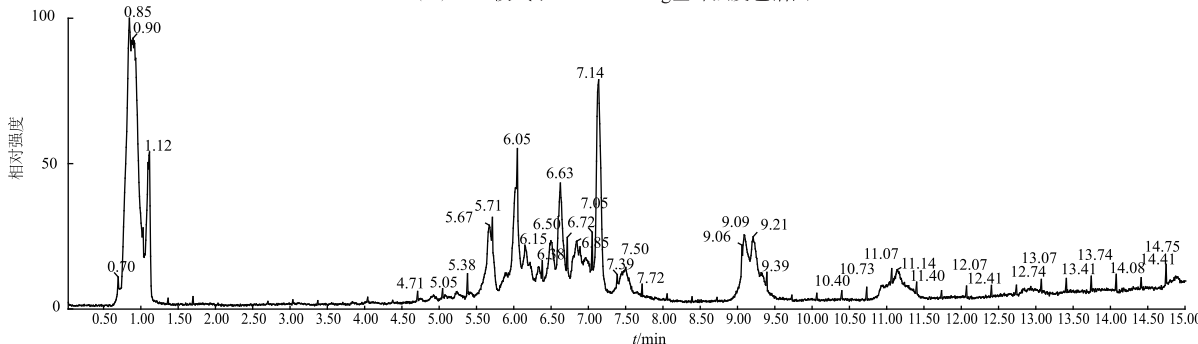
2 结果与讨论

2.1 代谢物色谱图分析

采用 UPLC-MS 技术,对 *L. casei* Zhang $\Delta pgIX$ 和 *L. casei* Zhang 在对数生长前期(4 h)的样本进行代谢组学分析。两菌株代表性基峰强度色谱图(见图 1)显示,正离子模式下两菌株在 13.00~14.00 min 存在明显差异;负离子模式下两菌株在 5.50~6.50 min 存在明显差异。



(a) ESI+模式下 *L. casei* Zhang 基峰强度色谱图



(b) ESI-模式下 *L. casei* Zhang $\Delta pgIX$ 基峰强度色谱图

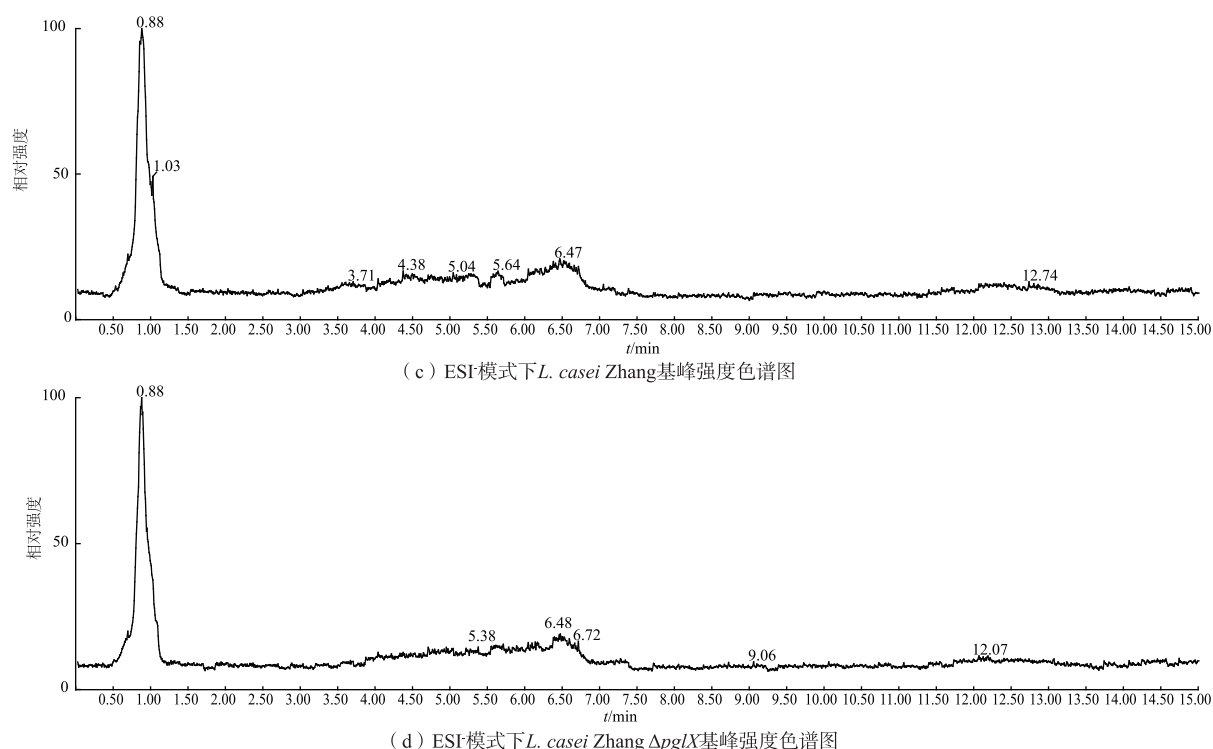


图1 *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ 与 *L. casei* Zhang 的基峰强度色谱图

Fig. 1 Based peak intensity chromatograms of *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ and *L. casei* Zhang

2.2 质控分析

质量控制(QC)样本是将每个样本等量混合,穿插在分析样本中,用与分析样本相同的检测方法,监测仪器在检测过程中的稳定性,从而保证采集数据的可靠性。从图2可以看出,QC样本在检测过程中的变化小于2倍标准差,表明整个分析过程中仪器运行是稳定且可重现的。

2.3 主成分分析

主成分分析(PCA)结果如图3所示,正、负离子模式下,甲基转移酶突变体 *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ 与野生型 *L. casei* Zhang 各聚集成一簇,表明组内样本差异较小,样本检测的重复性较好;两组样本之间分离趋势明显,表明突变体与野生型的代谢物存在明显差异。

2.4 正交偏最小二乘判别分析

为了进一步明确甲基转移酶突变体 *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ 与野生型 *L. casei* Zhang 在对数生长前期代谢产物的差异,对两菌株的代谢物进行OPLS-DA比较分析,结果如图4所示。OPLS-DA模型的解释能力和预测能力分别用 R^2 、 Q^2 表示。甲基转移酶突变体和野生型之间明显分离。正离子模式下OPLS-DA判别分析参数为: $R^2=0.980$, $Q^2=0.568$;负

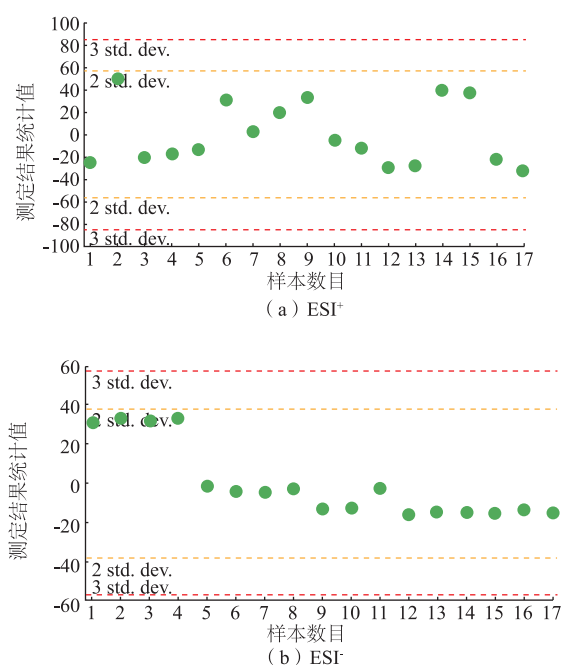
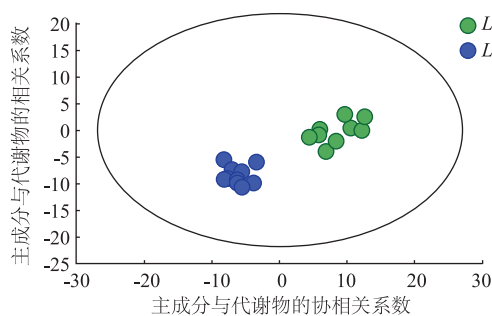
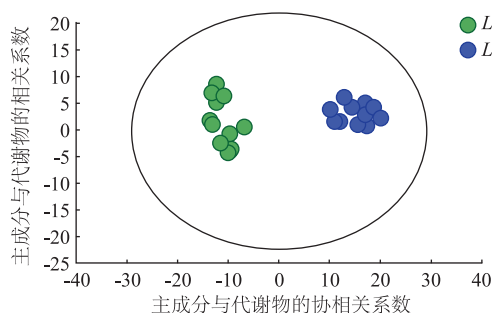


图2 质控样本评估

Fig. 2 Assessment of quality control samples

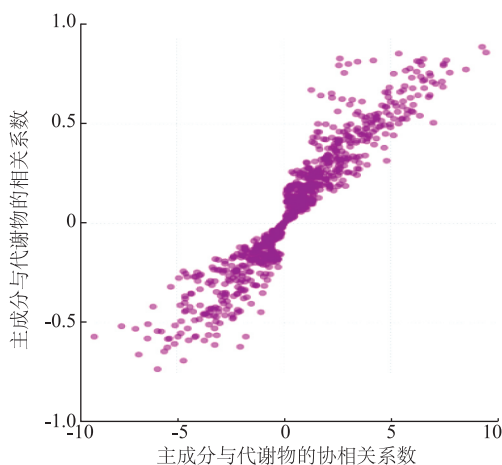
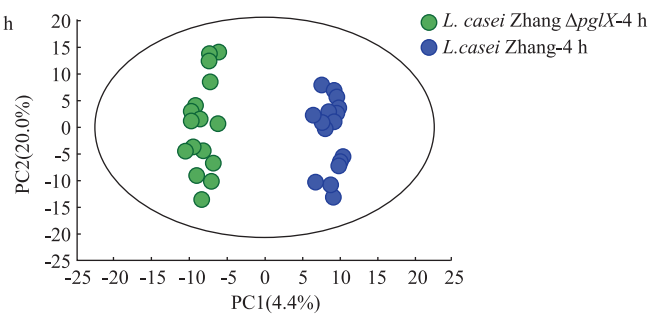
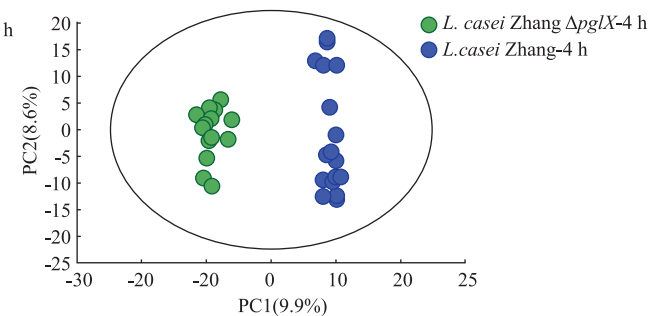
离子模式下OPLS-DA判别分析参数为: $R^2=0.982$, $Q^2=0.755$ 。两个模型的 R^2 和 Q^2 均大于0.5,表明所建立的两个OPLS-DA模型都显示出较高的拟合度和预测能力。

(a) ESI⁺(b) ESI⁻图3 *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ 与 *L. casei* Zhang 的 PCA 得分图Fig. 3 PCA score plot of *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ and *L. casei* Zhang

为了确定差异显著的代谢物, 进一步生成 OPLS-DA 模型所对应两组样本的 S-PLOT 得分图, 如图 5 所示, 每个点代表 1 个变量, 图中距离原点越远的变量, 对组间分离的贡献越大, 越有可能成为显著差异代谢物。

2.5 代谢物鉴定与分析

基于 OPLS-DA 模型分析结果, 筛选 VIP>1 的差异代谢物, 并结合 *T* 检验 $P<0.05$, fold change>2

(a) ESI⁺(a) ESI⁺(b) ESI⁻图4 *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ 与 *L. casei* Zhang 的 OPLS-DA 图Fig. 4 OPLS-DA plot of *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ and *L. casei* Zhang

的条件, 筛选显著差异代谢物。结果共筛选出 23 个显著差异代谢物, 如表 3 所示。

氨基酸是细菌碳、氮代谢的关键物质, 参与细菌的多种生理过程, 对细菌的生存和生长至关重要^[18]。研究发现, 菌株在生长过程中, 氨基酸的消耗和产生同时发生, 处于动态平衡^[19]。而且不同类型的菌株在生长过程中所需要的氨基酸种类和数量不

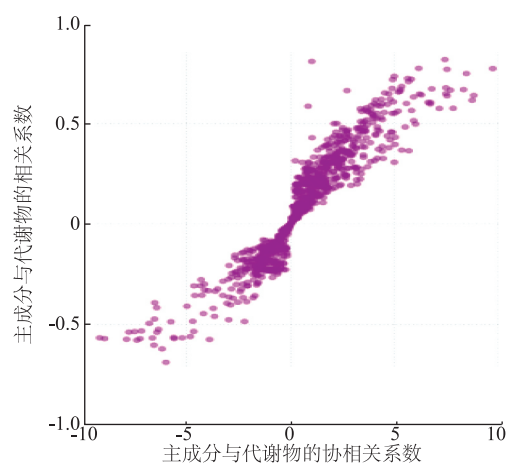
(b) ESI⁻图5 *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ 与 *L. casei* Zhang 的 S-PLOT 图Fig. 5 S-PLOT of *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ and *L. casei* Zhang

表 3 对数生长前期显著差异代谢物

Table 3 Significantly different metabolites in early logarithmic growth phase

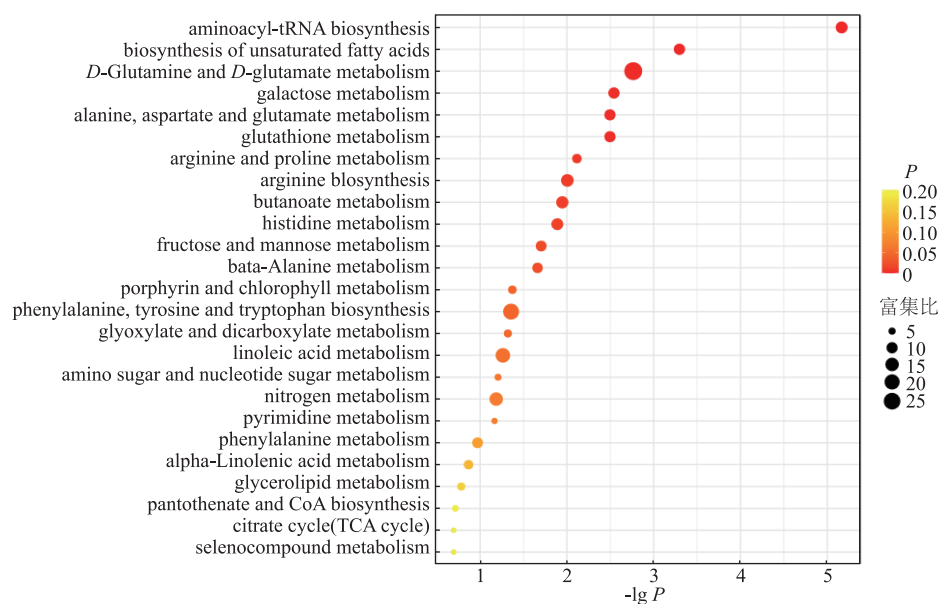
分子式	化合物名称	保留时间/min	质荷比	VIP 值	差异倍数	P
C ₂ H ₅ NO ₂	甘氨酸	13.61	591.131 3	1.529 21	2.035 7	2.45×10 ⁻²
C ₃ H ₇ NO ₂	丙氨酸	9.54	425.149 0	1.377 97	2.445 3	4.63×10 ⁻²
C ₅ H ₉ NO ₂	脯氨酸	0.80	290.010 4	2.746 73	3.193 9	2.14×10 ⁻⁹
C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	组氨酸	0.90	625.249 5	2.434 84	-6.645 5	4.04×10 ⁻⁷
C ₅ H ₉ NO ₄	谷氨酸	0.82	463.111 3	2.713 84	2.568 2	1.64×10 ⁻⁹
C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	鸟氨酸	6.03	253.129 6	1.214 52	-2.601 5	2.81×10 ⁻²
C ₉ H ₁₁ NO ₂	苯丙氨酸	0.89	549.113 9	1.869 12	-7.949 3	3.85×10 ⁻⁴
C ₁₆ H ₃₂ O ₂	棕榈酸	11.69	274.273 4	1.258 78	2.948 3	3.60×10 ⁻⁵
C ₂₀ H ₄₀ O ₂	花生酸	10.52	330.337 8	2.002 53	3.468 3	5.68×10 ⁻³
C ₁₈ H ₃₀ O ₂	亚麻酸	5.07	293.212 5	1.231 49	-9.014 2	4.09×10 ⁻²
C ₁₈ H ₃₂ O ₂	亚油酸	6.50	295.226 4	2.511 61	4.249 5	2.79×10 ⁻⁷
C ₁₈ H ₃₆ O ₂	硬脂酸	12.84	346.332 8	1.780 27	12.944 1	3.00×10 ⁻²
C ₁₈ H ₃₂ O ₂	锦葵酸	6.46	301.215 7	2.281 44	2.664 3	7.75×10 ⁻⁶
C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	尿嘧啶	4.13	229.098 3	1.372 04	2.963 9	4.86×10 ⁻²
C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	胸腺嘧啶	3.98	249.135 5	1.515 68	4.251 3	3.36×10 ⁻²
C ₆ H ₁₂ O ₆	D-吡喃葡萄糖	13.07	533.137 0	2.100 15	2.961 2	3.15×10 ⁻⁵
C ₆ H ₁₂ O ₆	甘露糖	0.94	379.064 8	1.580 29	3.285 4	3.83×10 ⁻⁷
C ₆ H ₁₂ O ₆	半乳糖	4.50	171.063 4	2.882 01	3.234 5	6.23×10 ⁻⁶
C ₆ H ₁₄ O ₅	6-脱氧-D-半乳糖醇	1.32	165.077 5	1.253 56	-9.194 2	2.92×10 ⁻²
C ₄ H ₆ O ₄	琥珀酸	0.81	375.009 2	1.949 18	2.438 2	3.11×10 ⁻⁴
C ₄ H ₈ O ₄	2-甲基甘油酸	0.94	141.017 4	1.930 39	-4.774 5	2.97×10 ⁻⁴
C ₃ H ₆ O ₃	甘油醛	4.43	261.132 4	2.338 72	5.049 6	1.16×10 ⁻³
C ₁₇ H ₃₄ O ₂	十六酸甲酯	12.82	302.306 7	3.556 33	4.386 7	1.84×10 ⁻⁸

同,氨基酸的合成和分解直接影响菌株的生长代谢^[20]。大肠杆菌在有氧生长过程中可以利用丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)、半胱氨酸(Cys)、甘氨酸(Gly)、谷氨酸(Glu)和丙氨酸(Ala)作为碳源和氮源,在无氧条件下消耗 Ser、Asp、Cys 和天冬酰胺(Asn)^[21]。金黄色葡萄球菌的生长通常需要 3~12 种氨基酸,其中脯氨酸(Pro)、精氨酸(Arg)、缬氨酸(Val)和 Cys 最为常见^[18]。本研究中,甲基转移酶突变体 *L. casei* Zhang Δ pglX 与野生型 *L. casei* Zhang 在对数生长前期共鉴定到 Gly、Ala、Pro、Glu、组氨酸(His)、鸟氨酸(Orn)和苯丙氨酸(Phe)7 种差异显著的氨基酸,表明 DNA 甲基化表型可能影响菌株对氨基酸的合成和利用。

细胞膜是细菌生长的基本结构,在细菌能量传递、代谢以及维持细胞内环境稳定等方面发挥着重要作用^[22]。脂肪酸是微生物细胞膜的重要组分^[23],细菌能够改变细胞膜中脂肪酸的种类和组成,调节细胞膜的流动性和通透性,从而有利于细菌的生长和

繁殖^[24]。研究表明,在培养基中添加脂肪酸会影响细菌细胞膜的成分和细菌生长速度^[25],脂肪酸在细菌生长和生存过程中起着至关重要的作用^[26]。细菌细胞膜中常见的饱和脂肪酸有月桂酸、肉豆蔻酸和棕榈酸等,不饱和脂肪酸有油酸、亚油酸和亚麻酸等^[27-29],饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的相对变化是细菌改变细胞膜流动性的基础。本研究中,甲基转移酶突变体 *L. casei* Zhang Δ pglX 与野生型 *L. casei* Zhang 相比,在对数生长前期差异显著的脂肪酸有棕榈酸、花生酸、亚麻酸、亚油酸、硬脂酸和锦葵酸。因此推测,DNA 甲基化表型可能会调节菌株细胞膜脂肪酸的含量,改变细胞膜的通透性和流动性。

通过 KEGG 数据库,对筛选得到的显著差异代谢物进行代谢通路富集分析,代谢通路主要集中在氨酰-tRNA 生物合成、不饱和脂肪酸生物合成、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢、半乳糖代谢等代谢途径(见图 6)。

图 6 *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ 与 *L. casei* Zhang 差异代谢物富集分析Fig. 6 Differential metabolite enrichment analysis of *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ and *L. casei* Zhang

3 结 语

基于 UPLC-MS 非靶向代谢组学技术, 比较分析了 DNA 甲基转移酶突变体 *L. casei* Zhang $\Delta pglX$ 与野生型 *L. casei* Zhang 在对数生长前期的代谢差

异, 结合多元统计分析, 共筛选出 23 个显著差异代谢物。表明 DNA 甲基化表型在对数生长前期可能会影响菌株对氨基酸的合成和利用; 另一方面可能会调节菌株细胞膜脂肪酸成分, 改变细胞膜的通透性和流动性。

参考文献:

- [1] MOORE L D, LE T, FAN G P. DNA methylation and its basic function[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(1): 23-38.
- [2] ZHAO J, ZHANG M, HUI W Y, et al. Roles of adenine methylation in the physiology of *Lactocaseibacillus paracasei*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 2635.
- [3] KUMAR S, KARMAKAR B C, NAGARAJAN D, et al. N4-cytosine DNA methylation regulates transcription and pathogenesis in *Helicobacter pylori*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(7): 3815.
- [4] SONG N N, ZHU Y Q, CUI Y Y, et al. Vitamin B and vitamin C affect DNA methylation and amino acid metabolism in *Mycobacterium bovis* BCG[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 812.
- [5] SÁNCHEZ-ROMERO M A, CASADESUS J. The bacterial epigenome[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(1): 7-20.
- [6] DIETRICH C G, KOTTMANN T, ALAVI M. Commercially available probiotic drinks containing *Lactobacillus casei* DN-114001 reduce antibiotic-associated diarrhea[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(42): 15837-15844.
- [7] HILL D, SUGRUE I, TOBIN C, et al. The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2107.
- [8] YAN J M, WU M L, KWOK L Y, et al. Adenine DNA methylation is involved in regulating ethanol and osmotic stress responses in *Lactocaseibacillus paracasei* Zhang[J]. *Food Frontiers*, 2023, 4: 1347-1361.
- [9] GUO Z, WANG J C, YAN L Y, et al. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains[J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2009, 42(10): 1640-1646.
- [10] BAI M, HUANG T, GUO S, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang improved the properties of stirred yogurt[J]. *Food Bioscience*, 2020, 37: 100718.

- [11] YAO G Q, CAO C X, ZHANG M, et al. *Lactobacillus casei* Zhang exerts probiotic effects to antibiotic-treated rats [J]. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2021, 19: 5888-5897.
- [12] HE Q W, HOU Q C, WANG Y J, et al. Long-term administration of *Lactobacillus casei* Zhang stabilized gut microbiota of adults and reduced gut microbiota age index of older adults [J]. **Journal of Functional Foods**, 2020, 64: 103682.
- [13] WISHART D S, FEUNANG Y D, MARCU A, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018 [J]. **Nucleic Acids Research**, 2018, 46(1): 608-617.
- [14] ATHERSUCH T. Unraveling the Exposome [M]. Cham: Springer International Publishing, 2018: 147-181.
- [15] GIKA H, VIRGILIOU C, THEODORIDIS G, et al. Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping (metabonomics/ metabolomics): the state of the art [J]. **Journal of Chromatography B**, 2019, 1117: 136-147.
- [16] LU X, ZHAO X J, BAI C M, et al. LC-MS-based metabonomics analysis [J]. **Journal of Chromatography B**, 2008, 866(1): 64-76.
- [17] HUI W Y, ZHANG W Y, KWOK L Y, et al. A novel bacteriophage exclusion (BREX) system encoded by the *pglX* gene in *Lactobacillus casei* Zhang [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2019, 85(20): 1001-1019.
- [18] LIU Y K, KUO H C, LAI C H, et al. Single amino acid utilization for bacterial categorization [J]. **Scientific Reports**, 2020, 10(1): 12686.
- [19] 刘欣, 刘芸, 陈梅春, 等. 8 种乳酸菌发酵荔枝汁 - 大豆蛋白的氨基酸代谢特征研究 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 106-113.
LIU X, LIU Y, CHEN M C, et al. Study on amino acid metabolism characteristics of *Litchi* juice-soybean protein fermented by eight lactic acid bacteria [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2020, 41(23): 106-113. (in Chinese)
- [20] 黄珊. 基于转录组学与代谢组学的 *Streptococcus thermophilus* TF96 氨基酸代谢机制研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- [21] YANG Y L, POLLARD A M, HÖFLER C, et al. Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria [J]. **Molecular Microbiology**, 2015, 96(6): 1272-1282.
- [22] WU C D, ZHANG J, WANG M, et al. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality [J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2012, 39(7): 1031-1039.
- [23] ROCK C O. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes [M]. Amsterdam: Elsevier, 2008: 59-96.
- [24] HADDAJI N, MAHDHI A K, KRIFI B, et al. Change in cell surface properties of *Lactobacillus casei* under heat shock treatment [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2015, 362(9): 1-7.
- [25] MULLER J A, ROSS R P, SYBESMA W F H, et al. Modification of the technical properties of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 by supplementing the growth medium with unsaturated fatty acids [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011, 77(19): 6889-6898.
- [26] YANG S P, XIE J, CHENG Y, et al. Response of *Shewanella putrefaciens* to low temperature regulated by membrane fluidity and fatty acid metabolism [J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2020, 117: 108638.
- [27] GUERZONI M E, LANCIOTTI R, COCCONCELLI P S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus* [J]. **Microbiology**, 2001, 147(8): 2255-2264.
- [28] LI C, ZHAO J L, WANG Y T, et al. Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions [J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2009, 25(9): 1659-1665.
- [29] SMITTLE R B, GILLILAND S E, SPECK M L, et al. Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen [J]. **Applied Microbiology**, 1974, 27(4): 738-743.