

乙醇对干酪乳酪杆菌 Zhang 甲基化转移酶突变体的影响

闫珈铭, 张文羿*

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

摘要 乳酸菌应用于酒精饮料的生产时会面临乙醇胁迫,增强其乙醇耐受性在工业育种中显得尤为重要。分离自内蒙古传统酸马奶的干酪乳酪杆菌 Zhang,是一株发酵性能优良的益生菌。本研究以干酪乳酪杆菌 Zhang 及其甲基化转移酶突变体为研究对象,采用液相色谱-质谱联用技术对其在 10%乙醇胁迫下生长 12 h 的差异代谢物进行系统分析,目的是阐明乙醇胁迫下 DNA 甲基化对干酪乳酪杆菌代谢物的影响。在甲基化转移酶突变体和野生型之间共鉴定得到 199 个差异代谢物,进一步富集分析显示差异代谢物主要在氨基酸代谢、ABC 转运体、双组分系统以及丙酮酸代谢途径显著富集。这些研究结果对乳酸菌工业育种具有重要意义。

关键词 DNA 甲基化;干酪乳酪杆菌;乙醇胁迫;代谢组学;液质联用

文章编号 1009-7848(2024)06-0024-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.06.003

DNA 甲基化是一种存在于多种生物体内的化学修饰现象,它的原理是在 DNA 甲基化转移酶的催化下,甲基供体 S-腺苷蛋氨酸(SAM)的甲基基团被转移到 DNA 胞嘧啶或腺嘌呤上^[1]。这种修饰现象在动物、植物、真菌和细菌中普遍存在,在真核生物中已得到大量研究^[2]。然而,细菌中的 DNA 甲基化并未被深入研究。细菌中的 DNA 甲基化主要有 3 种形式,包括 N6-甲基腺嘌呤(6mA)、N4-甲基胞嘧啶(4mC)和 5-甲基胞嘧啶(5mC)^[3]。

乳酸菌存活会受到外界环境中多种因素的影响,如酸、温度、氧气、乙醇等。在乳饮料(如马奶酒、新型乳酸菌饮料)的生产中,乳酸菌面临的乙醇胁迫会引发一系列应激反应^[4]。了解菌株的耐受机制和提高菌株对乙醇胁迫的抵抗力对含乳饮料的生产十分重要。大肠杆菌的乙醇耐受性可以通过改造其全局转录因子 cAMP 受体蛋白(CRP)来提高^[5]。目前很少人关注甲基化对乳酸菌乙醇耐受性的影响。

代谢组学是研究生物体代谢物(内源性代谢物)的种类、数量和变化的科学^[6]。超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(Ultra Performance Liq-

uid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry,UPLC-Q-TOF MS)具有定性能力强、速度快的特点,在代谢组学研究中应用广泛。很多研究者利用代谢组学呈现出的代谢物变化规律来阐述微生物的胁迫耐受机制或应答机制^[7-8]。干酪乳酪杆菌 Zhang (*Lactocaseibacillus casei* Zhang, *L.casei* Zhang)是从内蒙古传统酸马奶中分离得到的,因其优异的益生特性和对低 pH 值环境和胆汁的高耐受性,而被应用于益生菌产品生产^[9-11]。之前的研究通过单分子实时测序技术在干酪乳酪杆菌 Zhang 的基因组中发现了 6mA 的 DNA 甲基化表型^[12]。惠文彦等^[13-14]对干酪乳酪杆菌 Zhang 的 6mA 甲基化转移酶基因 *pglX* 进行了敲除,同时构建了 DNA 甲基化表型缺失菌株干酪乳酪杆菌 Zhang Δ *pglX*。此外,本课题组前期研究发现干酪乳酪杆菌 Zhang Δ *pglX* 比干酪乳酪杆菌 Zhang 的乙醇胁迫耐受性更强,两种菌株在含有 10%乙醇的 MRS 液体培养基生存时,甲基化转移酶突变菌株的活菌数显著高于野生型。本研究在此基础上,比较干酪乳酪杆菌 Zhang Δ *pglX* 和干酪乳酪杆菌 Zhang 在 10%乙醇下胁迫 12 h 的产物,旨在探究乙醇胁迫下 DNA 甲基化表型缺失对于菌株细胞代谢物的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

干酪乳酪杆菌 Zhang Δ *pglX* 和干酪乳酪杆菌

收稿日期: 2023-06-11

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

第一作者: 闫珈铭,女,硕士生

通信作者: 张文羿 E-mail: zhangwenyizi@163.com

Zhang 由内蒙古农业大学乳酸菌菌种资源库保存和提供。色谱纯乙腈、甲酸、氨水、甲酸钠, Sigma 公司; 异亮氨酸脑啡肽, Waters 公司。

1.2 仪器与设备

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪, Waters 公司; Xevo G2 Q-TOF MS 质谱仪, Waters 公司; Eppendorf 5810 R 台式高速离心机, Eppendorf 公司; Milli-Q 纯水仪, Millipore 公司; 涡旋振荡器, Scientific Industries 公司; 隔水式恒温培养箱, 上海一恒有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株培养 干酪乳酪杆菌 Zhang Δ pglX 和干酪乳酪杆菌 Zhang 以 2% (体积分数) 的接种量接入 MRS 液体培养基中, 置于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h, 活化到第 3 代。

1.3.2 胁迫处理 将活化后的菌株在 MRS 液体培养基中培养至 $OD_{600nm}=1$, 摇匀后装入 50 mL 离心管中 3 900 r/min 离心 5 min 弃上清, 用灭菌的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 对沉淀进行清洗并重复一次, 然后用适量的 PBS 缓冲液将菌体细胞重悬并接入含 10% (体积分数) 乙醇的 MRS 液体培养基中。控制接种量, 使两株菌的刚接入培养基时的 OD_{600nm} 为 0.1。在含有乙醇的 MRS 液体培养基中培养 12 h。最后在 12 h 时收集代谢组学样本, 在 4 °C 下将培养好的菌体细胞 3 900 r/min 离心 5 min, 取离心后的上清液装入 15 mL 离心管中, 液氮急冻后置于 -80 °C 保存备用。

1.3.3 UPLC-Q-TOF MS 分析

1.3.3.1 样品前处理 将样品置于室温下解冻, 吸取样品至 2 mL EP 管中, 加入等量的乙腈溶液, 在 4 °C 条件下静置 20 min, 振荡 15 s 之后于室温下 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 用 0.22 μ m 的微孔滤膜进行过滤, 然后将滤液分装至上样瓶中。质量控制样本 (Quality Control, QC) 是将每个样本取 20 μ L 等量混合而成, 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。

1.3.3.2 UPLC 分离 用 ACQUITY UPLC BEH C18 柱 (1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm) 进行液相分离, 运行时间为 15 min。正离子模式下 A 相: 0.1% 甲

酸水溶液, B 相: 0.1% 甲酸和乙腈溶液; 负离子模式下 A 相: 0.1% 的氨水水溶液, B 相: 乙腈溶液。样本采用梯度洗脱模式进行分离, 正离子模式梯度洗脱条件为: 0~1 min, 95% A; 1~2 min, 80% A; 2~3 min, 50% B; 3~5 min, 70% B; 5~13.5 min, 80% B; 13.5~15 min, 95% A。负离子模式梯度洗脱条件为: 0~3 min, 98% A; 3~8 min, 50% A; 8~9.5 min, 2% B; 9.5~15 min, 98% A。进样体积 5 μ L, 流速 0.3 mL/min。

1.3.3.3 质谱条件 质谱采用 ESI 源正离子 (ESI⁺) 与负离子 (ESI⁻) 模式进行扫描。为确保数据的可重复性, 采用质量浓度为 200 ng/ μ L 的亮氨酸脑啡肽校正液进行质量校正。在正离子模式下将质量数锁定为 556.2771, 负离子模式下将质量数锁定为 554.2615。MS 扫描范围是 50~1 200 m/z , 毛细管电压 3.0 kV, 锥孔电压 40 kV, 离子源温度 100 °C, 锥孔气流速 50 h/L。

1.3.3.4 数据处理 采用 MassLynx 4.1 工作站对获得的原始数据 (质荷比、保留时间、离子强度) 进行采集, 然后将数据导入 Progenesis QI 软件进行峰对齐、保留时间校正等处理。下一步将质荷比、样本名和分组信息导入网站 MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) 进行数据标准化、主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA 分析) 和差异代谢物筛选分析。采用两组间差异倍数 (Fold change, FC) >2 或 <0.5 和 $P < 0.05$ 相结合的方法筛选出突变体和野生型之间差异显著的代谢物。最后借助在线分析网站 Mbrole 2 (csbg.cnb.csic.es/mbrole2) 进行 KEGG 功能富集分析。

2 结果与分析

2.1 主成分分析

主成分分析能够体现代谢组学数据的特征, 找到最能解释数据集差异的方向。本研究对突变体和野生型的样本进行了 PCA 分析, 结果如图 1 所示。图中的每个点都代表一个样本, M 代表突变体, W 代表野生型, 其位置取决于自身代谢物。每个点之间距离的远近代表样本之间的代谢物差异, 距离越近表明样本之间的代谢物越相似, 因此通过 PCA 得分图可以观察到不同组之间的差异。在本研究中干酪乳酪杆菌 Zhang 的突变体和野生

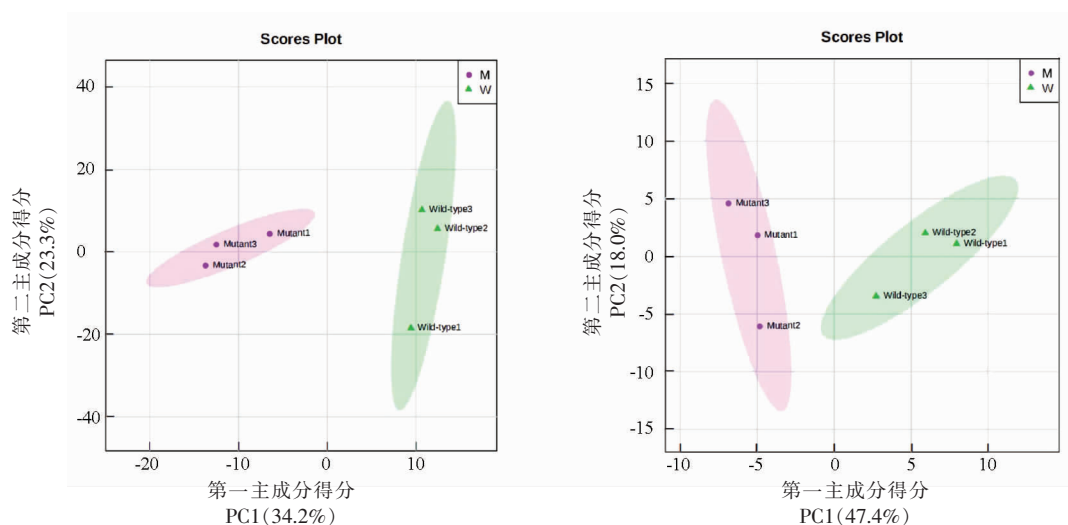


图1 正负离子模式下的PCA得分图

Fig.1 PCA score plots in positive and negative modes

型呈现出明显的分离,这表明两株菌之间的代谢物差异明显。

2.2 差异代谢物鉴定与分析

采用差异倍数 (Fold change, FC) >2 或 <0.5 结合 $P < 0.05$ 的条件来筛选差异代谢物。分别对正离子模式和负离子模式下突变体与野生型之间的差异代谢物进行筛选。图2为两种模式下差异代谢物的火山图,横坐标为 $\log_2(\text{FC})$;纵坐标为

$-\lg(P)$,图中的每个点都代表一个代谢物,红色为显著增加的代谢物,蓝色为显著降低的代谢物,灰色代表没有显著差异的代谢物。结果显示在正离子模式下,与野生型相比在突变株中显著增加的代谢物有95个,显著降低的代谢物有66个,然而负离子模式下鉴定到的代谢物数量较少并且38个代谢物全部是显著降低的。表1为鉴定到的主要差异代谢物。

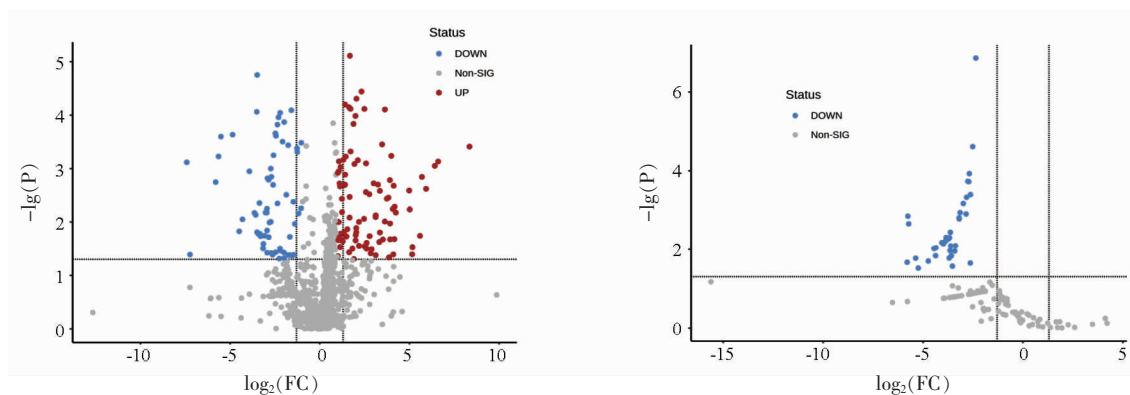


图2 正负离子模式下的差异代谢物火山图

Fig.2 Volcano plot of differential metabolites in positive and negative modes

表1 突变株与野生型之间的差异代谢物

Table 1 Differential metabolites between mutant and wild type

序号	化学式	代谢物	保留时间/ min	质荷比/ (m/z)	\log_2 差异 倍数	假阳性率
1	$\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_8\text{O}_7$	环肽	3.65	1 194.6357	-3.513	0.0097725
2	$\text{C}_{47}\text{H}_{73}\text{NO}_{17}$	两性霉素 B	3.69	956.5239	2.4859	0.0097725

(续表 1)

序号	化学式	代谢物	保留时间/ min	质荷比/ (m/z)	log ₂ 差异 倍数	假阳性率
3	CHI ₃	假尿嘧啶核苷	3.66	851.4562	2.3251	0.0097725
4	C ₂₈ H ₄₃ NO ₆	疏螺旋体素	10.38	1 042.6381	1.6792	0.0097725
5	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₁	那拉霉素	11	782.5402	-1.5843	0.0097725
6	C ₁₁ H ₆ Br ₃ NOS	替布罗凡	3.68	912.5029	1.8785	0.010856
7	C ₁₇ H ₃₃ NO ₄	C10 肉碱	11.16	694.4978	-5.5109	0.014872
8	C ₁₉ H ₃₇ N ₅ O ₆	伊斯塔霉素 C1	5.11	904.5841	-2.444	0.014872
9	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	杜松酸	18.52	305.2687	-2.0757	0.01714
10	C ₉ H ₆ Cl ₈	1,2,3,4,7,7-六氯-5-(二氯甲基)双环庚二烯	10.92	826.5598	-1.0322	0.01714
11	C ₁₇ H ₃₃ NO ₄	三甲基(3-三甲氧基硅丙基)铵	13.41	696.5122	-5.6458	0.020335
12	C ₂₀ H ₂₆ N ₂	曲米帕明	11.93	606.4542	-2.5796	0.020335
13	C ₂₂ H ₃₁ FO ₃	16β-氟睾酮丙酸酯	3.61	763.4133	1.3197	0.022642
14	C ₁₅ H ₁₃ Br ₃ O ₂	三溴双酚 A	16.43	962.6549	1.0686	0.022832
15	C ₁₉ H ₃₁ FO	3β-氟-5α-雄甾烷-17-酮	13.48	652.4905	-7.4189	0.023025
16	C ₅₂ H ₉₇ NO ₁₈ S	卢博霉素 B	12.38	1 088.6745	2.5782	0.023555
17	C ₁₂ H ₁₂ N ₂	二苯胺	2.07	149.0861	-2.734	0.027047
18	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	蛇床内酯	2.86	177.1276	1.0061	0.030425
19	C ₅₅ H ₈₇ NO ₁₄	乌米莫司	11.83	1 018.6453	5.6943	0.033832
20	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₂	寡霉素 B	10.68	822.5324	-2.9161	0.035224
21	C ₂₅ H ₄₁ NO ₉	乌头原碱	3.61	1 062.5729	-2.8521	0.036771
22	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	鼠尾草苷 III 型	3.71	960.5548	3.0054	0.040409
23	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	积雪草苷	3.71	1 000.5453	3.2423	0.040505

2.3 差异代谢物的功能富集分析

对筛选得到的差异代谢物进行功能富集分析,将全部差异代谢物导入 Mbrole 2 中,选择网站提供的背景集干酪乳杆菌 BL23 进行 KEGG 功能注释和富集分析。结果显示在数据库中注释到的代谢物有 76 个,这些代谢物共富集到 52 条不同的代谢通路中。其中显著富集的通路有 26 条 ($P < 0.05$),此外有 13 条通路的显著性比较明显 ($P < 0.001$),其中主要以氨基酸代谢为主。图 3 为 KEGG 富集气泡图,横坐标为富集率,纵坐标为代谢通路的名称,图中包含的 20 条代谢通路均显著富集 ($P < 0.05$),每个气泡代表在代谢通路中富集的代谢物,气泡越大代表富集的代谢物数量越多。表 2 中包含了全部富集的代谢通路以及每条代谢通路中富集的代谢物的 KEGG ID。KEGG 富集分析的结果表明乙醇胁迫后干酪乳酪杆菌 Zhang 的突变体在氨基酸代谢、物质运输、碳水化合物代谢

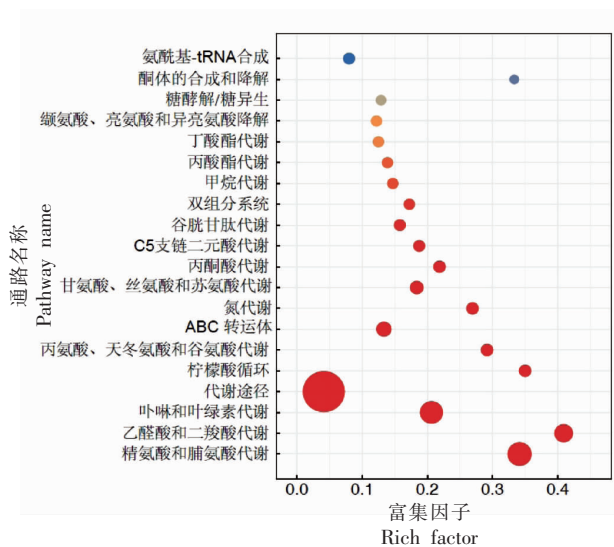


图 3 KEGG 富集气泡图

Fig.3 KEGG enrichment bubble diagram

等通路显著富集,这些变化与突变体的 DNA 甲基化引发的对抗环境胁迫的应激反应。化表型缺少是密切相关的,并且可能是由 DNA 甲

表 2 KEGG 富集通路表

Table 2 Table of KEGG enriched pathways

通路名称	P 值	数量	KEGG 编号
精氨酸和脯氨酸代谢	8.69×10^{-27}	28	C00011, C00014, C00019, C00022, C00025, C00048, C00062, C00064, C00077, C00134, C00148, C00179, C00315, C00334, C00533, C00555, C01137, C01165, C02714, C02946, C03287, C03912, C04281, C05933, C05936, C05938, C05946, C05947
乙醛酸和二羧酸代谢	7.68×10^{-19}	18	C00011, C00022, C00024, C00036, C00048, C00058, C00149, C00158, C00160, C00168, C00209, C00258, C00311, C00417, C00552, C00898, C01127, C03459
卟啉和叶绿素代谢	1.44×10^{-18}	26	C00025, C00032, C00037, C00194, C00430, C00748, C00853, C00931, C01024, C01051, C01079, C02191, C02463, C03263, C03741, C05766, C05768, C05770, C05774, C05778, C06505, C06506, C06508, C14818, C15670, C15672
代谢途径	7.10×10^{-9}	60	C00007, C00011, C00014, C00019, C00022, C00024, C00025, C00032, C00033, C00036, C00037, C00048, C00058, C00062, C00064, C00065, C00077, C00100, C00134, C00148, C00149, C00158, C00160, C00168, C00179, C00194, C00209, C00258, C00311, C00315, C00332, C00334, C00417, C00430, C00632, C00683, C00748, C00931, C01024, C01051, C01079, C01137, C01165, C01213, C02191, C02463, C02714, C02946, C03263, C03287, C03741, C03912, C04281, C05778, C05936, C05946, C05947, C06505, C06506, C06508
柠檬酸循环	2.41×10^{-7}	7	C00022, C00024, C00036, C00149, C00158, C00311, C00417
ABC 转运体	1.15×10^{-6}	12	C00025, C00032, C00037, C00062, C00064, C00065, C00077, C00134, C00148, C00315, C00430, C14818
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	9.94×10^{-7}	7	C00014, C00022, C00025, C00036, C00064, C00334, C03912
氮代谢	1.82×10^{-6}	7	C00011, C00014, C00025, C00037, C00058, C00064, C00533
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	1.84×10^{-6}	9	C00011, C00014, C00022, C00037, C00048, C00065, C00168, C00258, C00430
丙酮酸代谢	8.26×10^{-6}	7	C00022, C00024, C00033, C00036, C00058, C00149, C00332
C5 支链二元酸代谢	9.68×10^{-5}	6	C00022, C00025, C00033, C00048, C00100, C00417
谷胱甘肽代谢	2.62×10^{-4}	6	C00024, C00025, C00037, C00077, C00134, C00315
双组分系统	5.80×10^{-4}	5	C00007, C00036, C00064, C00149, C00158
甲烷代谢	0.001	5	C00011, C00024, C00037, C00058, C00065
丙酸酯代谢	0.002	5	C00024, C00100, C00332, C00683, C01213

(续表 2)

t 通路名称	P 值	数量	KEGG 编号
丁酸酯代谢	0.003	5	C00022, C00024, C00025, C00332, C00334
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	0.003	5	C00024, C00100, C00332, C00683, C01213
糖酵解/糖异生	0.006	4	C00022, C00024, C00033, C00036
酮体的合成和降解	0.008	2	C00024, C00332
氨酰基-tRNA 合成	0.009	6	C00025, C00037, C00062, C00064, C00065, C00148
牛磺酸和次牛磺酸代谢	0.012	3	C00022, C00024, C00033
羧氨基酸代谢	0.017	4	C00011, C00014, C00037, C00065
次生代谢物的生物合成	0.025	34	C00019, C00022, C00024, C00025, C00032, C00033, C00036, C00037, C00062, C00065, C00077, C00100, C00134, C00148, C00149, C00158, C00311, C00332, C00417, C00430, C00748, C00931, C01024, C01051, C01079, C01165, C02191, C02463, C03263, C03741, C03912, C05778, C15670, C15672
D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢	0.033	2	C00025, C00064
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	0.047	4	C00019, C00022, C00065, C01137
萜类骨架生物合成	0.046	3	C00022, C00024, C00332

显著富集的通路中很大一部分都与氨基酸代谢相关, 其中富集显著性最明显的是精氨酸和脯氨酸代谢。在此通路中有 3 个代谢物显著降低分别是亚精胺 (Spermidine, C00315)、N-乙酰腐胺 (N-Acetylputrescine, C02714) 和 D-4-羟基-2-酮戊二酸 (D-4-Hydroxy-2-oxoglutarate, C05946)。多胺是原核生物和真核生物的生长因子, 亚精胺属于其中一种^[15]。然而亚精胺的积累会抑制细菌和哺乳动物细胞的生长^[16]。除此之外, 亚精胺在谷胱甘肽代谢和 ABC 转运体 (ATP binding cassette transporters) 两条通路中也表现为显著减少。亚精胺可以转化成精胺, 在长期盐胁迫的细胞中发现亚精胺的减少可能会导致精胺代偿性增加。而在植物缺水时, 加入外源性亚精胺可以增加植物叶绿素含量、光合作用速率和抗氧化酶的活性^[17]。关于亚精胺在乳酸菌的乙醇胁迫耐受性中的分子机制的研究很少, 本研究中在干酪乳酪杆菌 Zhang Δ pglX 的代谢物中观测到亚精胺显著降低, 因此可以推测亚精胺的显著减少与干酪乳酪杆菌 Zhang Δ pglX 的乙醇胁迫耐受性增加之间可能存在关联。具体的分子机制则需要进一步的研究来验证。其次, 羟基丙酮酸 (Hydroxypyruvate, C00168) 和 4-羟基-2-氧代戊二酸 (4-Hydroxy-2-

oxoglutaric acid, C01127) 也显著减少, 它们都参与乙醛酸盐和二羧酸盐代谢。

其它氨基酸代谢通路也呈现显著富集, 包括甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 半胱氨酸和蛋氨酸代谢, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。除此之外还观察到 ABC 转运体和双组分系统的显著富集。ABC 转运体在原核生物中的功能是跨生物膜主动运输多种物质, 包括无机离子、氨基酸、碳水化合物、蛋白质等^[18]。ABC 转运体可分为内向转运体和外向转运体两类^[19]。外向转运体存在于多种生物体内, 而内向转运体仅存在于细菌和植物中^[20]。在本研究中观察到 L-谷氨酸、甘氨酸、L-精氨酸、L-丝氨酸、鸟氨酸、腐胺、L-脯氨酸、L-谷氨酰胺在 ABC 转运体通路显著富集。在其它受到胁迫的菌体细胞中也出现了类似情况, 干酪乳杆菌 SMN-LBK 在受到乙醇胁迫时 8 个参与 ABC 转运体的基因在转录水平显著下调表达^[21], 可能是乙醇胁迫使正常的跨膜运动与物质运输遭受破坏。酿酒酵母在响应甲酸胁迫时细胞内的 L-谷氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、黄嘌呤酸、奎宁酸等显著下调, 而 L-谷氨酰胺、L-色氨酸、L-苯丙氨酸等则显著上调^[8]。唾液乳杆菌在高渗胁迫下甘氨酸、苯丙氨酸、天冬

氨酸、丝氨酸和异亮氨酸含量明显上调,而谷氨酰胺显著下降^[22]。这些研究结果表明菌体细胞在受到环境胁迫时氨基酸含量会发生明显改变,同时氨基酸跨膜运输活动在干酪乳酪杆菌的突变体和野生型之间表现出明显差异可能与DNA甲基化密切相关。双组分系统(Two-Component System)是细菌感受和适应环境变化或自身细胞状态的一种信号转导机制^[23]。在本研究中干酪乳酪杆菌的突变体和野生型之间双组分系统显示出明显差异,草乙酸、L-谷氨酰胺、L-苹果酸、柠檬酸在双组分系统显著富集。丙酮酸代谢属于碳水化合物代谢的组成部分,它能够调控生物体内的能量平衡^[24],在此通路中丙酮酸、乙酰辅酶A、甲酸、乙酸、草乙酸等显著富集。有研究发现保加利亚乳杆菌在酸适应过程中丙酮酸代谢也发生改变^[25]。

3 结论

综上所述,甲基化转移酶突变菌株的乙醇胁迫耐受性增强在代谢物水平表现为亚精胺、羟基丙酮酸和4-羟基-2-氧代戊二酸显著减少。其次,功能富集分析结果显示突变体和野生型之间的差异代谢物在氨基酸代谢、ABC转运体、双组分系统以及丙酮酸代谢等途径的富集显著性十分明显。由此可见DNA甲基化通过调节物质运输、信号传导、碳水化合物代谢以及氨基酸代谢影响干酪乳酪杆菌 Zhang 的乙醇胁迫耐受性,而阐明干酪乳酪杆菌 Zhang 响应乙醇胁迫的分子机制则需要进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] MALONE T, BLUMENTHAL R M, CHENG X. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyl-transferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1995, 253(4): 618-632.
- [2] MAHMOOD A M, DUNWELL J M. Evidence for novel epigenetic marks within plants[J]. *AIMS Genetics*, 2019, 6(4): 70-87.
- [3] BUTKUS V, KLIMAŠAUSKAS S, PETRAUSLRIENÉ L, et al. Synthesis and physical characterization of DNA fragments containing N4-methylcytosine and 5-methylcytosine[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(20): 8467-8478.
- [4] DE ANGELIS M, GOBETTI M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review[J]. *Proteomics*, 2004, 4(1): 106-122.
- [5] CHONG H, HUANG L, YEOW J, et al. Improving ethanol tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein (CRP)[J]. *PLoS one*, 2013, 8(2): e57628.
- [6] NICHOLSON J K, LINDON J C. Systems biology: metabolomics[J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1054-1056.
- [7] 孟露, 刘哈诚, 刘雅涵, 等. 基于代谢组学和转录组学分析工业面包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) ABY3 冷冻胁迫应答机制[J]. *食品科学*, 2021, 42(10): 193-200.
- [8] MENG L, LIU H C, LIU Y H, et al. Metabolomic and transcriptomic analysis of response mechanism of baker's yeast to freezing stress[J]. *Food Science*, 2021, 42(10): 193-200.
- [9] 曾令杰, 丰丕雪, 黄锦翔, 等. 基于非靶向代谢组学分析酿酒酵母甲酸胁迫的响应和耐受性机制[J]. *食品科学*, 2022, 43(4): 95-104.
- [10] ZENG L J, FENG P X, HUANG J X, et al. Non-targeted metabolomic analysis of response and tolerance mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* to formic acid stress[J]. *Food Science*, 2022, 43(4): 95-104.
- [11] 张勇. 从单菌株组学到宏基因组学: *Lactobacillus casei* Zhang 益生功能[J]. *科学通报*, 2019, 64(3): 307-314.
- [12] ZHANG Y. Probiotic effects of *Lactobacillus casei* Zhang: From single strain omics to metagenomics[J]. *Chin Sci Bull*, 2019, 64(3): 307-314.
- [13] 张和平, 武婷. 干酪乳酪杆菌 Zhang 的益生特性及其在发酵乳制品中的应用研究[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(5): 1-7.
- [14] ZHANG H P, WU T. Beneficial properties of *Lactobacillus casei* Zhang and its application in fermented dairy products[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(5): 1-7.
- [15] PAN L, YU J, REN D, et al. Metabolomic analysis of significant changes in *Lactobacillus casei* Zhang during culturing to generation 4,000 under condi-

- tions of glucose restriction[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(5): 3851–3867.
- [12] ZHANG W Y, SUN Z H, MENGHE B, et al. Single molecule, real-time sequencing technology revealed species- and strain-specific methylation patterns of 2 *Lactobacillus* strains[J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(5): 3020–3024.
- [13] 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): e01001–19.
- [14] 惠文彦. *Lactobacillus casei* Zhang BREX 系统鉴定及 DNA 甲基化与菌株生物学特性的相关性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- HUI W Y. Identification of BREX system in *Lactobacillus casei* Zhang and correlation analysis between DNA methylation and biological characteristics [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [15] IGARASHI K, KASHIWAGI K. Polyamine modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines[J]. Journal of Biochemistry, 2006, 139(1): 11–16.
- [16] HE Y, KASHIWAGI K, FUKUCHI J, et al. Correlation between the inhibition of cell growth by accumulated polyamines and the decrease of magnesium and ATP[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 217(1): 89–96.
- [17] XU J, CAI M, LI J, et al. Physiological, biochemical and metabolomic mechanisms of mitigation of drought stress-induced tobacco growth inhibition by spermidine[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 181(7): 114844.
- [18] 易豪. ABC 转运蛋白 Mse1046 在粘虫幼虫固醇吸收中的功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- YI H. Functional analysis of an ABC transporter in sterol uptake in *Mythimna separata* larvae[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022.
- [19] 陈福暖, 黄瑜, 蔡佳, 等. ABC 转运蛋白结构及其在细菌致病性中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 43–52.
- CHEN F N, HUANG Y, CAI J, et al. Structure of ABC transporter and research progress of it in bacterial pathogenicity[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(6): 43–52.
- [20] 曲俊泽, 陈天华, 姚明东, 等. ABC 转运蛋白及其在合成生物学中的应用[J]. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1754–1766.
- QU J Z, CHEN T H, YAO M D, et al. ABC transporter and its application in synthetic biology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(9): 1754–1766.
- [21] 郭金凤, 杨婕, 李宝坤, 等. 副干酪乳杆菌 SMN-LBK 在乙醇胁迫下的转录组分析[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 116–122.
- GUO J F, YANG J, LI B K, et al. Transcriptome analysis of *Lactobacillus paracasei* SMN-LBK under ethanol stress[J]. Food Science, 2020, 41(6): 116–122.
- [22] 龚霄, 齐宁利, 林丽静, 等. 基于气质联用技术的唾液乳杆菌胁迫响应代谢组学研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(19): 10–12.
- GONG X, QI N L, LIN L J, et al. GC/MS based metabolomics study on osmotic response of *Lactobacillus salivarius* [J]. Food Research and Development, 2014, 35(19): 10–12.
- [23] 马世林. 嗜水气单胞菌双组分系统 ENVZ/OMPR 的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
- MA S L. Functional analysis of two-component systems ENVZ/OMPR in *Aeromonas hydrophila* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021.
- [24] SU Y B, PENG B, LI H, et al. Pyruvate cycle increases aminoglycoside efficacy and provides respiratory energy in bacteria [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 115(7): E1578–E1587.
- [25] FERNANDEZ A, OGAWA J, PENAUD S, et al. Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus* [J]. Proteomics, 2008, 8(15): 3154–3163.

Effect of Ethanol on Methylated Transferase Mutant of *Lacticaseibacillus casei* Zhang

Yan Jiaming, Zhang Wenyi*

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

Abstract Lactic acid bacteria will face ethanol stress when used to produce alcoholic beverages, so it is particularly important to enhance the ethanol stress tolerance of lactic acid bacteria in industrial breeding. *Lacticaseibacillus casei* Zhang (*L.casei* Zhang), isolated from traditional koumiss in Inner Mongolia, is a probiotic strain with excellent fermentation performance. In this study, the differential metabolites between *L.casei* Zhang and its methylated transferase mutant were systematically analyzed by Liquid Chromatograph Mass Spectrometer (LC-MS) under 10% ethanol stress for 12 h. The aim of this study was to investigate the effects of DNA methylation on metabolites of *L.casei* Zhang under ethanol stress. A total of 199 differential metabolites were identified between the methylated transferase mutant and the wild-type. Further enrichment analysis showed that the differential metabolites were mainly enriched in amino acid metabolism, ABC transporters, two-component system and pyruvate metabolism pathways. These findings have important implications for industrial breeding of lactic acid bacteria.

Keywords DNA methylation; *Lacticaseibacillus casei*; ethanol stress; metabolomics; LC-MS