

基于非靶向代谢组学分析甲基化对副干酪乳酪杆菌发酵剂贮藏特性的影响

游明坤, 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, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 副干酪乳酪杆菌 (*Lacticaseibacillus paracasei*) Zhang 是一株具有调节免疫反应、抗氧化等益生特性的优良菌株。DNA 甲基化是一种重要的表观遗传机制, 在细菌的很多生理过程中发挥关键作用。为更好利用该菌株, 本研究重点关注甲基化对 *L. paracasei* Zhang 发酵剂贮藏特性的影响。利用 *L. paracasei* Zhang 及其 DNA 甲基化突变株 $\Delta pgIX$ 制备发酵剂并在 30 °C 条件下贮藏 90 d。结果表明: 与野生型相比, 甲基化突变株在贮藏 90 d 后活菌数极显著提高 ($P < 0.01$); 利用非靶向代谢组学方法分析贮藏 90 d 后野生型及其甲基化突变体的代谢物差异发现, 与野生型相比, 突变体的差异代谢物质有 269 种, 在负离子模式下主要富集到核苷酸代谢、嘌呤代谢、嘧啶代谢、柠檬酸循环、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢等多条代谢通路, 在正离子模式下主要富集到生物素代谢等多条代谢通路。研究结果证实 DNA 甲基化可以通过生成和利用碳水化合物类、脂肪酸类物质等提高 *L. paracasei* Zhang 的贮藏特性。

关键词: 副干酪乳酪杆菌; DNA 甲基化; 贮藏特性; 发酵剂; *pgIX*; 非靶向代谢组学

Effect of Methylation on Storage Properties of *Lacticaseibacillus paracasei* as Analyzed by Untargeted Metabolomics

YOU Mingkun, ZHANG Wenyi*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education,
Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: *Lacticaseibacillus paracasei* Zhang is an excellent strain with probiotic properties such as immunomodulatory and antioxidant activities. DNA methylation is an important epigenetic mechanism that plays a key role in many physiological processes in bacteria. In order to better utilize the strain, this study focused on the effect of methylation on the storage properties of two starter cultures of *L. paracasei* Zhang and its DNA methylation mutant ($\Delta pgIX$) at 30 °C. The results showed that after 90 d of storage, the viable number of the mutant significantly increased compared with the wild type ($P < 0.01$). Using untargeted metabolomics, 269 differential metabolites were observed in the mutant compared with the wild type, which were mainly enriched in the nucleotide metabolism, purine metabolism, pyrimidine metabolism, citrate cycle, glyoxylate, and dicarboxylate metabolism pathways in the negative ion mode. In the positive ion mode, they were mainly enriched in the biotin metabolism pathway. These findings confirmed that DNA methylation could improve the storage properties of *L. paracasei* Zhang through the generation and utilization of carbohydrates and fatty acids.

Keywords: *Lacticaseibacillus paracasei*; DNA methylation; storage properties; starter culture; *pgIX*; untargeted metabolomics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20231218-137

中图分类号: TS252.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2025) 01-0049-07

引文格式:

游明坤, 张文羿. 基于非靶向代谢组学分析甲基化对副干酪乳酪杆菌发酵剂贮藏特性的影响[J]. 食品科学, 2025, 46(1): 49-55. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20231218-137. <http://www.spkx.net.cn>

YOU Mingkun, ZHANG Wenyi. Effect of methylation on storage properties of *Lacticaseibacillus paracasei* as analyzed by untargeted metabolomics[J]. Food Science, 2025, 46(1): 49-55 (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20231218-137. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-12-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32372304); 内蒙古青年科技人才发展创新团队项目 (NMGIRT2411)

第一作者简介: 游明坤 (1998—) (ORCID: 0009-0003-3576-035X), 女, 硕士, 研究方向为乳酸菌资源的开发与利用。

E-mail: youmingkun07@163.com

*通信作者简介: 张文羿 (1981—) (ORCID: 0000-0001-5530-4210), 男, 教授, 博士, 研究方向为乳酸菌资源的开发与利用。

E-mail: zhangwenyizi@163.com

DNA甲基化是由DNA甲基转移酶催化,将甲基从S-腺苷甲硫氨酸转移到基因组CpG二核苷酸胞嘧啶上的过程,由表观遗传修饰网络控制。目前共有3种核苷酸甲基化形式: N^6 -甲基腺嘌呤(N^6 -methyadenosine, m6A)、 N^4 -甲基胞嘧啶和5-甲基胞嘧啶^[1-2]。其中m6A主要发生在原核生物和原生生物中,还有大约25%的哺乳动物mRNA中存在相同氮位置的普遍修饰^[3]。m6A在原核生物的DNA复制、修复、转位和转录中起着重要作用^[4]。

副干酪乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus paracasei*)由于其商业和健康应用潜力,已经成为研究最多的乳酸菌物种之一^[5]。*L. paracasei* Zhang是一株分离自内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗传统发酵酸马奶的益生菌^[6],具有调节免疫反应、抗氧化^[7-8]等益生特性。利用单分子实时测序技术发现,在*L. paracasei* Zhang基因组中存在m6A的DNA甲基化表型,经注释发现了甲基转移酶[9]。pglX基因是抗噬菌体BREX系统的重要组成部分。基于Cre-Lox的基因敲除系统,成功构建了甲基转移酶pglX基因突变菌株(*L. paracasei* Zhang Δ pglX)^[10]。Yan Jiaming等^[11]研究发现,DNA甲基化在*L. paracasei* Zhang及*L. paracasei* Zhang Δ pglX的乙醇和渗透胁迫反应中发挥作用。

发酵剂是指一种或几种微生物的大量细胞,在原料中加快或引导发酵过程,生产发酵食品的微生物培养物^[12]。冷冻干燥法是制备发酵剂最简单、经济的方法之一^[13]。但在冷冻干燥过程中,细胞会受到由晶体形成、脱水和渗透应激引起的物理应力^[14],由此带来一些不良反应,如敏感蛋白的变性和细胞生存能力的下降^[15]。发酵剂的稳定性一般随着贮藏时间的延长而降低。

代谢组学被定义为生物系统在特定时刻的代谢物组成及其变化规律,研究病理生理变化与代谢物之间的关系和基因修饰的动态多参数反应的定量测定^[16]。目前代谢组学主要有3种分析技术:核磁共振波谱、液相色谱-质谱联用和气相色谱-质谱联用技术^[17]。代谢组学在乳制品科学领域取得了相当大的进展,可以用于评估益生菌的作用,还可以用于改善益生菌类食品^[18-19]。

冷冻、干燥和贮藏对乳酸菌发酵剂造成的损害和保护机制很复杂,迄今为止还没有被完全了解,本研究运用非靶向代谢组学方法从表观遗传学角度提出新的见解,以期提高乳酸菌发酵剂的存活率,使其得到更好的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本实验所用菌株*L. paracasei* Zhang及*L. paracasei* Zhang Δ pglX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。

甲醇、乙腈(均为色谱纯) 德国Merck公司; 甲酸、2-氯苯丙氨酸(均为色谱纯) 美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 仪器与设备

DRC-1000真空冷冻干燥机 日本Eyela公司; Triple TOF-6600质谱仪 美国AB Sciex公司; LC20超高效液相色谱仪 日本Shimadzu公司; MIX-200涡旋混合器 上海净信公司; 5427R离心机 德国艾本德公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株活化

用固体MRS培养基分离纯化在冷冻甘油中保藏的*L. paracasei* Zhang和*L. paracasei* Zhang Δ pglX。选取有代表性的菌落,在37℃ MRS液体培养基中连续活化培养3代。

1.3.2 菌粉的制备及贮藏

将活化好的*L. paracasei* Zhang和*L. paracasei* Zhang Δ pglX以7%的接种量接种于MRS液体培养基中,于小型发酵罐中恒定pH 5.9条件下培养。直至细菌培养液浓度不再增加,即为发酵终点。3 900 r/min离心15 min收集菌体,按菌体质量的1.5倍添加保护剂(质量分数11.5%脱脂乳粉、6.0%海藻糖和1.0%谷氨酸钠)并与之混合均匀。真空冷冻干燥机中冷冻干燥20 h(冷阱温度-60℃,真空压力5 Pa)。测定菌粉的活菌数,计算冷冻干燥过程中的存活率。随后将菌粉在30℃条件下贮藏,90 d后测定菌粉活菌数和存活率。-80℃保存5 g样品,以待后续代谢组学分析。平行制备3个生物重复。

1.3.3 平板菌落计数法

将制备好的发酵剂贮藏90 d后取1 g,在99 mL生理盐水中充分混合,进行10倍稀释(每个梯度取上一梯度0.5 mL细菌溶液于4.5 mL生理盐水中稀释),直到 10^{-9} CFU/mL。然后采用平板计数法计算细菌活力。

1.3.4 代谢组样品的提取

从-80℃冰箱中取出样品,将其放置在冰上解冻。然后,取20 mg样品放入离心管中,加入400 μ L体积分数70%甲醇水内标提取液,涡旋混合3 min。将混合物转移至冰水浴中进行超声处理10 min,取出样品并再次涡旋混合1 min。最后,将样品在-20℃冰箱中静置30 min,在4℃条件下,12 000 r/min离心10 min,然后将300 μ L上清液移至另一对应编号的离心管中。

1.3.5 超高效液相色谱-质谱分析

1.3.5.1 超高效液相色谱条件

使用Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m);柱温40℃,流速0.40 mL/min;进样量2 μ L;流动相A为体积分数0.1%甲酸水溶液,B为体积分数0.1%甲酸乙腈溶液,洗脱条件如表1所示。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间/min	流速/(mL/min)	流动相A/%	流动相B/%
0	0.4	95	5
11	0.4	10	90
12	0.4	10	90
12.1	0.4	95	5
14	0.4	95	5

1.3.5.2 质谱条件

电喷雾电离 (electron spray ionization, ESI) 源正、负离子模式下的质谱条件如表2所示。

表2 正、负离子模式质谱条件

参数	ESI ⁺	ESI ⁻
离子化电压/V	5 500	-4 500
喷雾气压力/psi	50	50
去簇电压/V	60	-60
气帘气压力/psi	35	35
温度/℃	550	550
辅助加热气压力/psi	60	60
碰撞能量/V	30	-30

1.4 数据处理及统计学分析

将质谱下机原始数据转换为mzXML格式, 并使用XCMS程序进行峰提取、对齐和保留时间校正。采用向量回归方法对峰面积进行校正, 并对各组样本中缺失率大于50%的峰进行过滤。经过校正和筛选后的峰, 通过检索整合公共数据库、AI预测数据库及metDNA方法, 获得代谢物鉴定信息^[20-21]。多元统计分析采用正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 利用变量投影重要性 (variable importance in projection, VIP) > 1、 $P < 0.05$ (t 检验) 及差异变化倍数 (fold change, FC) ≥ 2 或 $FC \leq 0.5$ 确定显著差异代谢物。鉴定出的代谢物使用KEGG Compound数据库 (<http://www.kegg.jp/kegg/compound/>) 进行标注, 然后将标注的代谢物映射到KEGG Pathway数据库 (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)。对于给定的代谢物列表, 通过超几何测试的 P 值确定显著富集的途径。

2 结果与分析

2.1 发酵剂不同贮藏时间活菌数的比较

如图1所示, 在30℃贮藏过程中, 与贮藏0 d时相比, *L. paracasei* Zhang Δ pglX和*L. paracasei* Zhang的活菌数均下降, 但突变体的活菌数极显著高于野生型 ($P < 0.01$)。贮藏90 d后, *L. paracasei* Zhang Δ pglX的活菌数为10.81 (lg (CFU/mL)), 高于*L. paracasei* Zhang的9.94 (lg (CFU/mL))。

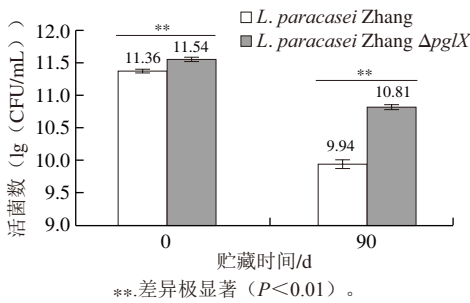
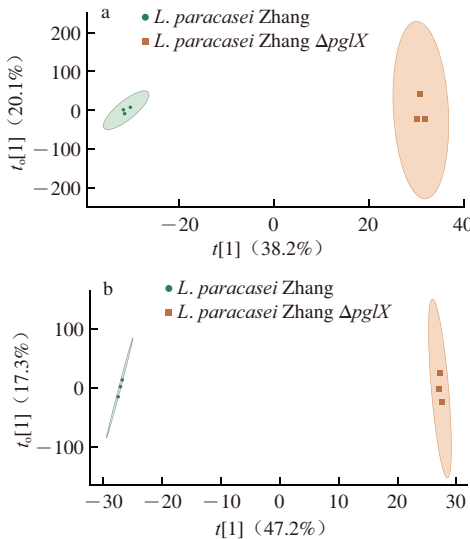


图1 *L. paracasei* Zhang和*L. paracasei* Zhang Δ pglX贮藏90 d前后活菌数的比较

Fig. 1 Comparison of viable counts between *L. paracasei* Zhang and *L. paracasei* Zhang Δ pglX before and after storage for 90 d

2.2 数据质控分析

本研究采用OPLS-DA方法, 以了解2组样本之间的代谢差异和组内样本之间的相似程度。图2横坐标表示预测成分得分值 (t), 该方向可以看出2组之间的差距; 纵坐标表示正交成分得分值 (t_o), 该方向可以看出每组组内3个平行样的差距。由图2可知, 正、负离子模式下, *L. paracasei* Zhang和*L. paracasei* Zhang Δ pglX样本分别聚集在一起, 表明实验结果重复性较好; 组间分离效果良好, 表明2株菌株存在差异代谢物质。



a. 正离子模式; b. 负离子模式。图3~5同。

图2 贮藏90 d的*L. paracasei* Zhang Δ pglX和*L. paracasei* Zhang的OPLS-DA图

Fig. 2 OPLS-DA plots of *L. paracasei* Zhang Δ pglX and *L. paracasei* Zhang stored for 90 d

OPLS-DA评价模型的具体预测参数如图3所示, 正离子模式: $R^2_Y = 0.999$, $Q^2 = 0.871$; 负离子模式: $R^2_Y = 1$, $Q^2 = 0.93$ 。其中 R^2_Y 表示该模型对 Y 矩阵的解释率, Q^2 表示该模型的预测能力, R^2_Y 与 $Q^2 \geq 0.871$, 该模型稳定可靠。以上结果表明, OPLS-DA模型有效, 可以区分2组样本并用于后续的差异代谢物分析。

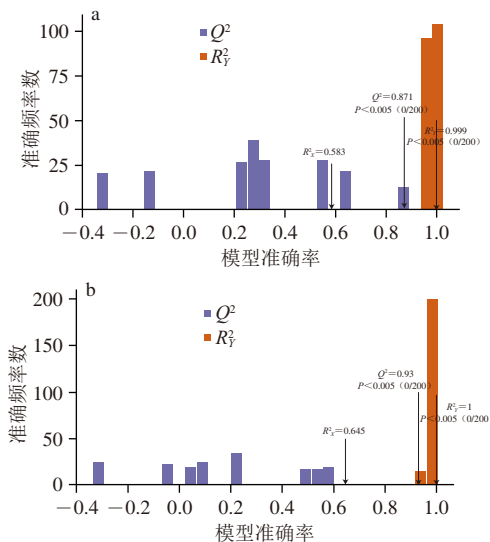


图3 贮藏90 d的*L. paracasei* Zhang Δ pglX和*L. paracasei* Zhang的OPLS-DA验证图

Fig. 3 Permutation test of OPLS-DA model for discriminating between *L. paracasei* Zhang Δ pglX and *L. paracasei* Zhang stored for 90 d

2.3 差异代谢物分析

根据OPLS-DA模型（生物学重复为3）得到的VIP初步筛选出2株菌株间的差异代谢物，结合VIP>1、 $P<0.05$ 、 $FC\geq 2$ 或 $FC\leq 0.5$ ，筛选出269种显著差异代谢物。如图4所示，在正离子模式下，显著上调差异代谢物15种，显著下调差异代谢物155种；在负离子模式下，显著上调差异代谢物29种，显著下调差异代谢物70种。表3、4为正、负离子模式下贮藏90 d的*L. paracasei* Zhang Δ pglX和*L. paracasei* Zhang的部分差异代谢物。

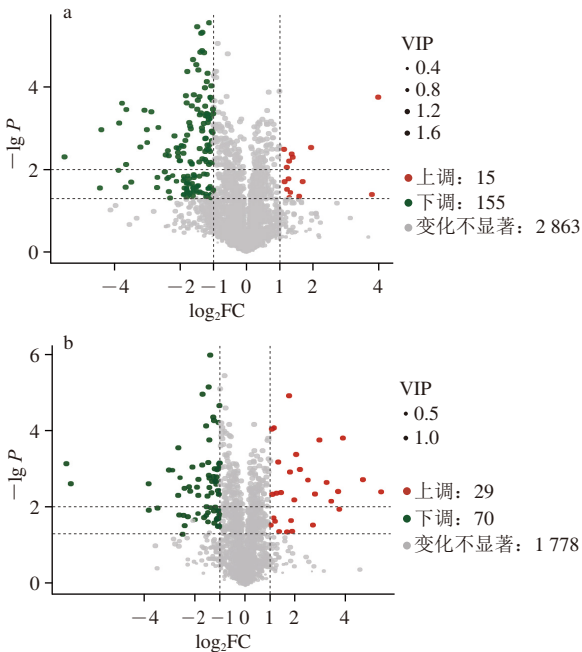


图4 贮藏90 d的*L. paracasei* Zhang Δ pglX与*L. paracasei* Zhang的差异代谢物火山图

Fig. 4 Volcano plots for differential metabolites between *L. paracasei* Zhang Δ pglX and *L. paracasei* Zhang stored for 90 d

表3 正离子模式下贮藏90 d的*L. paracasei* Zhang Δ pglX和*L. paracasei* Zhang的部分差异代谢物

Table 3 Selected differential metabolites between *L. paracasei* Zhang Δ pglX and *L. paracasei* Zhang stored for 90 d in the positive ion mode

分子式	差异代谢物	保留时间/min	m/z	VIP	P	FC	log ₂ FC	类型
C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃	组氨酸-异亮氨酸	0.88	269.16	1.61	0.003 05	3.86	1.95	上调
C ₈ H ₆ N ₂ O	次黄嘌呤	1.20	137.04	1.54	0.020 66	0.09	-3.48	下调
C ₁₈ H ₃₀ O ₂	松油酸	6.78	296.26	1.53	0.007 79	0.08	-3.63	下调
C ₁₆ H ₂₆ N ₂ O ₄ S	半胱氨酸-谷氨酸-精氨酸	8.57	407.17	1.51	0.020 06	3.24	1.70	上调
C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O	西肽普兰	2.95	342.20	1.51	0.006 46	2.44	1.29	上调
C ₁₆ H ₂₆ O ₅	13,14-二氢-15-酮四氢前列腺素D2	7.79	597.37	1.47	0.040 97	13.79	3.79	上调
C ₄₆ H ₈₀ O ₇	Myxol 2'-岩藻糖苷	11.44	713.48	1.26	0.048 24	2.45	1.29	上调
C ₈ H ₁₄ O ₇	灵芝酸A	11.07	481.29	1.21	0.036 64	2.51	1.33	上调

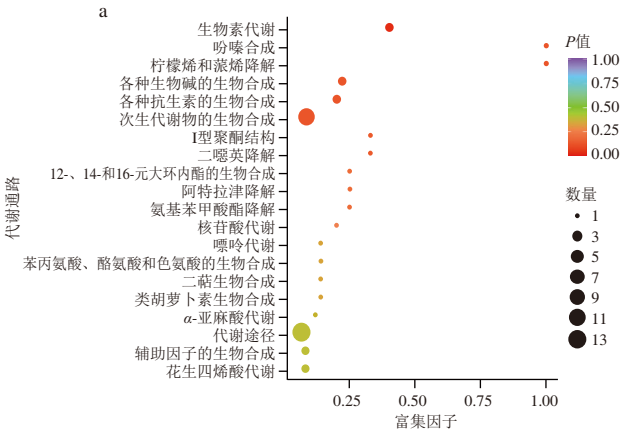
表4 负离子模式下贮藏90 d的*L. paracasei* Zhang Δ pglX和*L. paracasei* Zhang的部分差异代谢物

Table 4 Selected differential metabolites between *L. paracasei* Zhang Δ pglX and *L. paracasei* Zhang stored for 90 d in the negative ion mode

分子式	差异代谢物	保留时间/min	m/z	VIP	P	FC	log ₂ FC	类型
C ₆ H ₄ O ₃	草酰乙酸	0.89	191.02	1.46	0.000 74	0.007 4	-7.07	下调
C ₆ H ₄ O ₇	柠檬酸	1.16	191.02	1.46	0.002 42	0.008 4	-6.89	下调
C ₆ H ₁₀ O ₇ P ₂	D-肌醇-1,4-二磷酸	0.71	360.97	1.45	0.003 83	12.676 1	3.66	上调
C ₁₅ H ₂₃ N ₂ O ₇ P ₂	二磷酸尿苷葡萄糖	1.29	565.05	1.44	0.004 45	6.730 3	2.75	上调
C ₁₈ H ₃₀ O ₃	9,10,18-三羟基硬脂酸	6.58	331.25	1.42	0.000 18	7.598 8	2.93	上调
C ₂₂ H ₃₀ O ₁₃	胭脂红	0.71	376.94	1.39	0.001 90	24.985 8	4.64	上调
C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₇	γ-谷氨酰谷氨酸	1.07	313.04	1.36	0.002 42	0.070 8	-3.82	下调
C ₃₀ H ₅₂ O ₃	11β,13,14-双氢-15-酮基-前列腺素PGF2a	6.58	413.25	1.34	0.000 16	14.448 3	3.85	上调
C ₆ H ₁₀ O ₁₂ P ₂	D-果糖-1,6-二磷酸	0.97	372.11	1.31	0.028 01	6.355 9	2.67	上调
C ₆ H ₁₀ O ₇ P	6-磷酸山梨糖醇	0.72	261.04	1.31	0.003 92	41.138 2	5.36	上调
C ₂₈ H ₄₄ O ₁₄	迪迪明	1.09	593.20	1.30	0.002 24	9.247 2	3.21	上调
C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	对羟基罗格列酮	1.06	507.09	1.26	0.010 98	13.083 1	3.71	上调
C ₁₈ H ₁₈ O ₇ P	D-甘露醇-1-磷酸	1.03	261.04	1.22	0.006 82	10.503 8	3.39	上调
C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O	雷莫司琼	5.78	278.14	1.01	0.001 09	0.136 3	-2.88	下调

2.4 差异代谢物的KEGG富集分析

对KEGG代谢途径中已鉴定的差异代谢物进行富集分析，如图5所示，在正离子模式下主要富集到生物素代谢等多条代谢通路，在负离子模式下主要富集到核苷酸代谢、嘌呤代谢、嘧啶代谢、柠檬酸循环、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢等多条代谢通路。



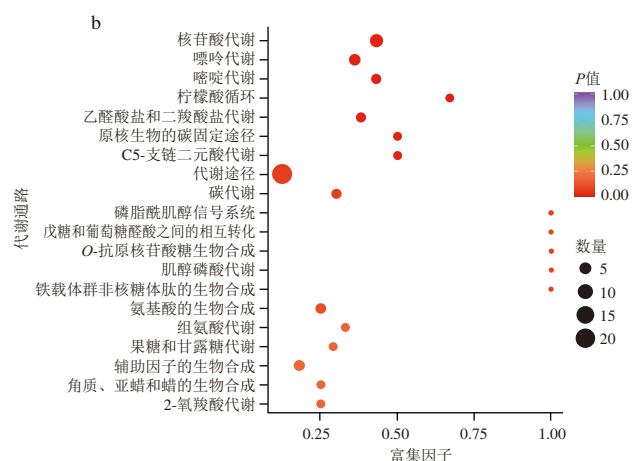


图5 贮藏90 d的*L. paracasei* Zhang Δ pglX与*L. paracasei* Zhang的差异代谢物富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis of differential metabolites between *L. paracasei* Zhang Δ pglX and *L. paracasei* Zhang stored for 90 d

3 讨论

3.1 甲基化对副干酪乳杆菌贮藏期间碳水化合物及其代谢物的影响

与*L. paracasei* Zhang相比, *L. paracasei* Zhang Δ pglX有6-磷酸山梨糖醇、D-甘露醇-1-磷酸等磷酸糖类差异代谢物存在显著差异, 磷酸糖类物质在细菌细胞各类代谢途径及其他重要生物分子合成中作为前体成分或关键中间体发挥重要作用, 促使这些化合物的类似物包含相当稳定的含磷部分^[22]。6-磷酸山梨糖醇可以调节葡萄糖的代谢。D-甘露醇-1-磷酸是果糖和甘露糖代谢的中间体, 参与磷酸烯醇式丙酮酸依赖性基团易位(磷酸转移酶系统), 这是细菌吸收碳水化合物的主要机制^[23]。与*L. paracasei* Zhang相比, *L. paracasei* Zhang Δ pglX可能通过提高6-磷酸山梨糖醇、D-甘露醇-1-磷酸等磷酸糖类物质的产量, 从而利用碳水化合物来应对贮藏胁迫。

3.2 甲基化对副干酪乳杆菌贮藏期间有机酸及其衍生物的影响

在贮藏90 d时, *L. paracasei* Zhang Δ pglX与*L. paracasei* Zhang相比, 主要差异代谢物为果糖-1,6-二磷酸、草酸、柠檬酸、灵芝酸A等有机酸类差异代谢物质。果糖-1,6-二磷酸在许多代谢途径中具有直接调节作用, 尤其是糖酵解途径中。果糖-1,6-二磷酸通过刺激糖酵解增加碳水化合物的利用, 同时抑制糖异生, 防止糖原分解并刺激其合成^[24]。许多双歧杆菌、链球菌菌株的乳酸脱氢酶需要果糖-1,6-二磷酸特异性激活, 该糖酵解中间体可能作为乳酸脱氢酶的变构激活剂^[25-26]。果糖-1,6-二磷酸是参与抑制粪肠球菌乳酸氧化酶系统的几种糖酵解中间体之一, 也是诱导粪肠球菌中苹果酸脱氢酶/脱羧酶的负效应物的几种化合物之一^[27]。果糖-1,6-二磷酸还在许多生物体中激活丙酮酸激酶、磷酸果糖激酶^[28-29]。

在糖异生过程中, 果糖双磷酸酶催化果糖-1,6-二磷酸形成果糖-6-磷酸^[30]。草酸、柠檬酸参与柠檬酸循环, 其中草酰乙酸在第1步中与乙酰辅酶A和水反应形成柠檬酸, 随后, 柠檬酸经过异构化形成异柠檬酸, 然后继续经历氧化、脱羧、氧化脱羧等过程, 转化为琥珀酸、延胡索酸、L-苹果酸, 最后又形成4个碳原子的草酰乙酸。灵芝酸A是一种高度氧化的羊毛甾烷型三萜化合物^[31], 具有抗真菌、5 α -还原酶抑制剂、醛糖还原酶等特性^[32]。其中醛糖还原酶是多元醇通路的限速酶, 可以催化葡萄糖转变成山梨醇, 再进一步氧化生成果糖。由此可以看出, 与*L. paracasei* Zhang相比, *L. paracasei* Zhang Δ pglX能够通过利用有机酸来应对贮藏胁迫。

3.3 甲基化对副干酪乳杆菌贮藏期间脂肪酰类代谢物的影响

在贮藏90 d时, *L. paracasei* Zhang Δ pglX与*L. paracasei* Zhang相比, 有9,10,18-三羟基硬脂酸、松油酸等游离脂肪酸类差异代谢物质。9,10,18-三羟基硬脂酸是一种长链饱和脂肪酸。松油酸是一种长链不饱和脂肪酸, 具有抗炎作用, 可改善淋巴细胞功能, 还可以控制食欲^[33]。细菌的脂肪酸组成随着生长温度的变化而变化, 在芽孢杆菌等细菌中异构脂肪酸含量随着生长温度的升高而增加, 反异构脂肪酸含量随着生长温度的降低而增加^[34]。不饱和脂肪酸可以增加细胞膜的流动性, 以提高其抗冷冻能力。由此, 本研究推测*L. paracasei* Zhang Δ pglX在30℃的贮藏期生成9,10,18-三羟基硬脂酸、松油酸等游离脂肪酸类差异代谢物质以应对贮藏胁迫。

3.4 甲基化对副干酪乳杆菌贮藏期间核苷酸代谢物的影响

在贮藏90 d时, *L. paracasei* Zhang Δ pglX与*L. paracasei* Zhang相比, 主要差异代谢物为二磷酸尿苷葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDPG)、次黄嘌呤等核苷酸类物质。UDPG作为糖基供体, 可在UDP-糖基转移酶的催化下糖基化修饰受体分子羟基、羧基等活性位点, 得到溶解性更好、生理活性更高的糖苷化合物^[35]。UDPG及其类似物是显示抗病毒活性的蛋白糖基化抑制剂^[36]。嘌呤类物质在细胞生理学、食品添加剂和药物中具有多种功能, 在干酪乳杆菌和大肠杆菌中都可以产生次黄嘌呤, 可以利用微生物大规模生产^[37]。与*L. paracasei* Zhang相比, *L. paracasei* Zhang Δ pglX可以通过生成核苷酸类物质调节贮藏特性。

3.5 甲基化对副干酪乳杆菌贮藏期间苯及其衍生物的影响

L. paracasei Zhang Δ pglX与*L. paracasei* Zhang相比, 主要差异代谢物有对羟基罗格列酮、西酞普兰、雷莫司琼和胭脂红等苯系物。氢溴化西酞普兰是一种外消旋双环邻苯二甲酸衍生物, 是一种5-羟色胺选择性再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI), 对一系列神经递质靶点受体几乎没有亲和力^[38]。SSRI具有抗菌特性, 主要对革兰氏阳性菌有效^[39]。西酞普兰对

伤寒沙门氏菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌均有活性,其最低抑菌质量浓度为6~7 mg/mL^[40]。雷莫司琼在突变株中表达下调,它是针对5-羟色胺3受体的拮抗型止吐药,具有选择性,在治疗肠易激综合征时可显著改善大便性状,缓解腹部疼痛等不适^[41]。胭脂红一直被用作染料,在食品、化妆品和制药等领域广泛使用,研究^[42]证明它是无害的,而其他染料对健康有不利影响。罗格列酮是一种噻唑烷二酮类抗糖尿病药物的胰岛素增敏剂,对羟基罗格列酮是它的主要代谢产物之一^[43]。因此推测*L. paracasei* Zhang Δ pglX的显著差异代谢产物可以抑制致病菌的生长,在食品、制药等领域有潜在的应用价值。

3.6 甲基化对副干酪乳杆菌贮藏期间激素及激素相关物质的影响

前列腺素是一类含氧花生四烯酸代谢物,包括前列腺素F2 α 、前列腺素D2、前列腺素E2、血栓素A2和前列环素。依前列醇别名前列环素。前列腺素参与控制许多生理过程,可以调节炎症、过敏反应,如抗肠炎,帮助恢复肠道内环境稳态^[44]。表明*L. paracasei* Zhang Δ pglX与*L. paracasei* Zhang相比,生成的显著差异代谢产物可能具有益生功能。

3.7 甲基化对副干酪乳杆菌贮藏期间其他代谢物质的影响

肌醇是一种六碳环醇,除了可以饮食摄取,还能通过葡萄糖-6-磷酸的多步骤转化得到,先转化为磷脂酰肌醇,磷脂酰肌醇通过相应的激酶和磷酸酶催化代谢为磷酸肌醇4,5二磷酸等磷酸肌醇,磷酸肌醇是细胞膜的次要成分,参与动态过程^[45]。*L. paracasei* Zhang Δ pglX与*L. paracasei* Zhang的差异代谢产物有组氨酸-异亮氨酸、半胱氨酸-谷氨酸-精氨酸、 γ -谷氨酰谷氨酸等肽类物质。乳酸菌的蛋白水解酶系能分解生成丰富的小分子多肽和氨基酸。由2~4个氨基酸以肽键相连组成的叫做小肽,可能具有抗氧化应激、调节免疫、调节胃肠道系统等功能^[46]。黄酮类化合物是具有C6—C3—C6结构的一类化合物的总称,具有参与衰老过程、触发抗氧化活性、避免氧化应激、组织损伤和炎症等作用。迪迪明属于黄酮类化合物,是一种典型的膳食糖苷,是纯天然抗氧化剂^[47]。黏液醇-2'-岩藻糖苷是单环蓝藻叶黄素,属于类胡萝卜素,被称为抗氧化剂、抗炎剂和抗肿瘤剂^[48]。说明*L. paracasei* Zhang Δ pglX的代谢产物参与细胞代谢过程,可能具有提高抗氧化能力等益生特性。

4 结 论

本研究基于超高效液相色谱-质谱联用非靶向代谢组学分析方法,比较*L. paracasei* Zhang Δ pglX与*L. paracasei* Zhang制备的发酵剂贮藏90 d时的差异代谢产物,利用OPLS-DA共筛选出269种显著差异代谢物质。在正离子模式下主要富集到生物素代谢等多条代

谢通路;在负离子模式下主要富集到核苷酸代谢、嘌呤代谢、嘧啶代谢、柠檬酸循环、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢等多条代谢通路。说明*L. paracasei* Zhang Δ pglX主要通过生成和利用碳水化合物类物质、脂肪酸类物质等来应对贮藏胁迫环境。与*L. paracasei* Zhang相比,*L. paracasei* Zhang Δ pglX贮藏90 d后产生很多具有抗菌活性、益生活性的代谢产物,由于这些物质是由益生菌代谢产生的,因此对人体很安全,是人类开发安全、有效的健康产品的较佳原料。本研究结果为揭示DNA甲基表型缺失后*L. paracasei* Zhang应对贮藏胁迫的分子机制提供了理论支持,为实现*L. paracasei*发酵剂大规模工业化生产提供了新思路。

参考文献:

- [1] MARINUS M G, CASADESUS J. Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(3): 488-503. DOI:10.1111/j.1574-6976.2008.00159.x.
- [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(1): 2635. DOI:10.1038/s41467-023-38291-1.
- [3] BOULIAS K, GREER E L. Means, mechanisms and consequences of adenine methylation in DNA[J]. Nature Reviews Genetics, 2022, 23(7): 411-428. DOI:10.1038/s41576-022-00456-x.
- [4] BENGGOA A A, DARDIS C, GARROTE G L, et al. Health-promoting properties of *Lactocaseibacillus paracasei*: a focus on kefir isolates and exopolysaccharide-producing strains[J]. Foods, 2021, 10(10): 2239. DOI:10.3390/foods10102239.
- [5] HILL D, SUGRUE I, TOBIN C, et al. The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2107. DOI:10.3389/fmicb.2018.02107.
- [6] WU R N, WANG L P, WANG J C, et al. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia[J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(3): 318-326. DOI:10.1002/jobm.200800047.
- [7] YA T, ZHANG Q J, CHU F L, et al. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: a newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China[J]. BMC Immunology, 2008, 9(1): 68. DOI:10.1186/1471-2172-9-68.
- [8] ZHANG Y, DU R T, WANG L F, et al. The antioxidative effects of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on the hyperlipidemic rats[J]. European Food Research and Technology, 2010, 231(1): 151-158. DOI:10.1007/s00217-010-1255-1.
- [9] ZHANG W Y, SUN Z H, MENGHE B L G, et al. Short communication: 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. DOI:10.3168/jds.2014-9272.
- [10] 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. DOI:10.1128/AEM.01001-19.
- [11] 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(3): 1347-1361. DOI:10.1002/fft.279.
- [12] LEROY F, DE VUYST L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry[J]. Trends in Food Science and Technology, 2004, 15(2): 67-78. DOI:10.1016/j.tifs.2003.09.004.
- [13] BEGUM R, SARKER M A K, ISLAM M A, et al. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from indigenous dairy product

- and preparation of starter culture by freeze-drying[J]. *Bioresearch Communications*, 2017, 3(1): 302-308.
- [14] BROECKX G, VANDENHEUVEL D, CLAES I J J, et al. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 505(1/2): 303-318. DOI:10.1016/j.ijpharm.2016.04.002.
- [15] RAJEEV K A, VLADIMIR S. Metabolomics technology and bioinformatics for precision medicine[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2019, 20(6): 1957-1971. DOI:10.1093/bib/bbx170.
- [16] LENZ E M, WILSON I D. Analytical strategies in metabolomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6(2): 443-458. DOI:10.1021/pr0605217.
- [17] SUNDEKILDE U, LARSEN L, BERTRAM H. NMR-Based milk metabolomics[J]. *Metabolites*, 2013, 3(2): 204-222. DOI:10.3390/metabo3020204.
- [18] SUH J H. Critical review: metabolomics in dairy science-evaluation of milk and milk product quality[J]. *Food Research International*, 2022, 154: 110984. DOI:10.1016/j.foodres.2022.110984.
- [19] MOZZI F, ORTIZ M E, BLECKWEDEL J, et al. Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria[J]. *Food Research International*, 2013, 54(1): 1152-1161. DOI:10.1016/j.foodres.2012.11.010.
- [20] HERMAN M A, BIRNBAUM M J. Molecular aspects of fructose metabolism and metabolic disease[J]. *Cell Metabolism*, 2021, 33(12): 2329-2354. DOI:10.1016/j.cmet.2021.09.010.
- [21] WISHART D S, GUO A, OLER E, et al. HMDB 5.0: the human metabolome database for 2022[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D622-D631. DOI:10.1093/nar/gkab1062.
- [22] FELDMAN-SALIT A, HERING S, MESSIHA H L, et al. Regulation of the activity of lactate dehydrogenases from four lactic acid bacteria[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(29): 21295-21306. DOI:10.1074/jbc.M113.458265.
- [23] MEHMETI I, FAERGESTAD E M, BEKKER M, et al. Growth rate-dependent control in *Enterococcus faecalis*: effects on the transcriptome and proteome, and strong regulation of lactate dehydrogenase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(1): 170-176. DOI:10.1128/AEM.06604-11.
- [24] MARKOV A K, NEELY W A, DIDLAKE R H, et al. Metabolic responses to fructose-1,6-diphosphate in healthy subjects[J]. *Metabolism*, 2000, 49(6): 698-703. DOI:10.1053/meta.2000.6249.
- [25] SAY R F, FUCHS G. Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme[J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 1077-1081. DOI:10.1038/nature08884.
- [26] ZHANG X Q, GAO X X, LONG G Q, et al. Lanostane-type triterpenoids from the mycelial mat of *Ganoderma lucidum* and their hepatoprotective activities[J]. *Phytochemistry*, 2022, 198: 113131. DOI:10.1016/j.phytochem.2022.113131.
- [27] ANGULO-SANCHEZ L T, LÓPEZ-PEÑA D, TORRES-MORENO H, et al. Biosynthesis, gene expression, and pharmacological properties of triterpenoids of *Ganoderma* species (Agaricomycetes): a review[J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2022, 24(6): 1-17. DOI:10.1615/IntJMedMushrooms.2022044016.
- [28] BAKER E J, MILES E A, CALDER P C. A review of the functional effects of pine nut oil, pinolenic acid and its derivative eicosatrienoic acid and their potential health benefits[J]. *Progress in Lipid Research*, 2021, 82: 101097. DOI:10.1016/j.plipres.2021.101097.
- [29] HASSAN N, ANESIO A M, RAFIQ M, et al. Temperature driven membrane lipid adaptation in glacial psychrophilic bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 824. DOI:10.3389/fmicb.2020.00824.
- [30] LU X, HUANG L J, SCHELLER H V, et al. Medicinal terpenoid UDP-glycosyltransferases in plants: recent advances and research strategies[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(5): 1343-1357. DOI:10.1093/jxb/erac505.
- [31] KROL E, WANDZIK I, KREJMER-RABALSKA M, et al. Biological evaluation of uridine derivatives of 2-deoxy sugars as potential antiviral compounds against influenza A virus[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(8): 1700. DOI:10.3390/ijms18081700.
- [32] FATMAWATI S, KONDO R, SHIMIZU K. Structure-activity relationships of lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma lingzhi* as α -glucosidase inhibitors[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23(21): 5900-5903. DOI:10.1016/j.bmcl.2013.08.084.
- [33] XIE K, MILES E A, CALDER P C. A review of the potential health benefits of pine nut oil and its characteristic fatty acid pinolenic acid[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 23: 464-473. DOI:10.1016/j.jff.2016.03.003.
- [34] KOGA Y. Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes[J]. *Archaea*, 2012, 2012: 789652. DOI:10.1155/2012/789652.
- [35] DE BRUYN F, MAERTENS J, BEAUPREZ J, et al. Biotechnological advances in UDP-sugar based glycosylation of small molecules[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(2): 288-302. DOI:10.1016/j.biotechadv.2015.02.005.
- [36] FUKUDO S, KINOSHITA Y, OKUMURA T, et al. Ramosetron reduces symptoms of irritable bowel syndrome with diarrhea and improves quality of life in women[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(2): 358-366. DOI:10.1053/j.gastro.2015.10.047.
- [37] LIU M, FU Y X, GAO W J, et al. Highly efficient biosynthesis of hypoxanthine in *Escherichia coli* and transcriptome-based analysis of the purine metabolism[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(3): 525-535. DOI:10.1021/acssynbio.9b00396.
- [38] POLLOCK B G. Citalopram: a comprehensive review[J]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2001, 2(4): 681-698. DOI:10.1517/14656566.2.4.681.
- [39] MUNOZ-BELLIDO J L, MUNOZ-CRIADO S, GARCÍA-RODRÍGUEZ J A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs: selective serotonin reuptake inhibitors[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 14(3): 177-180. DOI:10.1016/s0924-8579(99)00154-5.
- [40] AYAZ M, SUBHAN F, AHMED J, et al. Citalopram and venlafaxine differentially augments antimicrobial properties of antibiotics[J]. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 2015, 72(6): 1269-1278.
- [41] QI Q, ZHANG Y, CHEN F, et al. Ramosetron for the treatment of irritable bowel syndrome with diarrhea: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *BMC Gastroenterology*, 2018, 18(1): 5. DOI:10.1186/s12876-017-0734-2.
- [42] BUSTAMANTE-BRITO R, VERA-PONCE DE LEÓN A, ROSENBLUETH M, et al. Metatranscriptomic analysis of the bacterial symbiont *Dactylopiibacterium carminicum* from the carmine cochineal *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae)[J]. *Life*, 2019, 9(1): 4. DOI:10.3390/life9010004.
- [43] DEEKS E D, KEAM S J. Rosiglitazone[J]. *Drugs*, 2007, 67(18): 2747-2779. DOI:10.2165/00003495-200767180-00008.
- [44] WU C R, XU Y W, HE Q, et al. Ligand-induced activation and G protein coupling of prostaglandin F2 α receptor[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2668. DOI:10.1038/s41467-023-38411-x.
- [45] MONSERRATE J P, YORK J D. Inositol phosphate synthesis and the nuclear processes they affect[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010, 22(3): 365-73. DOI:10.1016/j.ceb.2010.03.006.
- [46] SÁNCHEZ A, VÁZQUEZ A. Bioactive peptides: a review[J]. *Food Quality and Safety*, 2017, 1(1): 29-46. DOI:10.1093/fqsafe/fyx006.
- [47] YAO Q, LIN M T, ZHU Y D, et al. Recent trends in potential therapeutic applications of the dietary flavonoid didymin[J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2547. DOI:10.3390/molecules23102547.
- [48] MOCHIMARU M, MASUKAWA H, TAKAICHI S. The cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 has two distinct β -carotene ketolases: CrtO for echinenone and CrtW for ketomyxol synthesis[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(27): 6111-6114. DOI:10.1016/j.febslet.2005.09.081.