DOI:10.12441/spyswjs.20231204001 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0071-09

酸胁迫下乳酸乳球菌IMAU51121的代谢组学研究

薄晓宇[1,2] 王会莹[1,2] 袁保壹[1,2] 刘湘芸[1,2] 包秋华[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:【目的】探究酸胁迫下乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*,*L. lactis*)IMAU51121的代谢物变化。**【方法】**将*L. lactis* IMAU51121在pH为4.0的GM17肉汤培养基中酸胁迫0.5 h,用液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术检测酸胁迫前后的代谢物变化,采用多元统计方法对代谢组学数据进行比较分析。**【结果】**共鉴定到1 178种代谢物,根据变量投影重要性(VIP)≥1、P<0.05和差异倍数(FC)>1.2的条件共筛选到20种主要差异代谢物。在酸胁迫后,*L*-组氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸等11种代谢物相对含量增加,瓜氨酸、β-酪氨酸、尿苷二磷酸(UDP)-葡萄糖等9种代谢物相对含量下降。KEGG通路富集及拓扑分析表明,酸胁迫影响了精氨酸生物合成、半乳糖代谢等5条关键差异代谢通路。**【结论】**酸胁迫影响*L. lactis* IMAU51121的生长和代谢,*L. lactis* IMAU51121通过调整氨基酸、糖、脂类、核苷酸等物质水平及代谢通路来抵御酸胁迫。

关键词:乳酸乳球菌;酸胁迫;代谢组学;差异代谢物

Metabolomics Analysis of *Lactococcus lactis* IMAU51121 Under Acid Stress

BO Xiaoyu[1,2] *WANG Huiying*[1,2] *YUAN Baoyi*[1,2] *LIU Xiangyun*[1,2] *BAO Qiuhua*[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: [**Objective**] The aim of the study is to investigate the metabolite changes of *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) IMAU51121 under acid stress. [**Method**] *L. lactis* IMAU51121 was exposed to acid stress in the GM17 liquid medium at pH 4.0 for 0.5 h. The metabolites changes before and after acid stress were detected by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The multivariate statistical analysis was performed for metabolomics data. [**Result**] In total, 1 178 metabolites were identified, from which 20 major differential metabolites were screened based on variable importance in projection (VIP)≥1, P<0.05, and fold change (FC)> 1.2. After acid stress, 11 metabolites showed increased relative content, including *L*-histidine, aspartic acid, and isoleucine, while 9 metabolites demonstrated decreased relative content, including citrulline, β-tyrosine, and uridine diphosphate (UDP)-glucose. KEGG pathway enrichment and topological analysis revealed that acid stress affected five key differential metabolic pathways, including arginine biosynthesis and galactose metabolism. [**Conclusion**] Acid stress affects the growth and metabolism of *L. lactis* IMAU51121, which responds to acid stress by adjusting the levels of amino acids, sugars, lipids, and nucleotides and the metabolic pathways.

Keywords: *Lactococcus lactis*; acid stress; metabolomics; differential metabolite

---

基金项目:内蒙古自然科学基金项目(2023MS03046);内蒙古农业大学食品科学与工程学院科技计划重点项目(SPKJ202205)。

通信作者:包秋华(1973—),女,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要从事乳品微生物研究。E-mail: nmgbqh@126.com

收稿日期:2023-12-04 **修回日期:**2024-02-12

*L. lactis*是发酵工业中有重要作用的乳酸菌，主要用于生产发酵乳、奶酪和奶油等发酵制品[1-2]。*L. lactis*是嗜中性乳酸菌，生长的最佳pH为6.3~6.9[3-4]。发酵过程中产生的酸性产物（主要是乳酸）的积累会使介质酸化，导致pH持续降低，因此酸胁迫是*L. lactis*面临的主要胁迫之一[5-6]。酸胁迫严重影响*L. lactis*的正常生长、代谢活性及其作为发酵剂的工业性能[7]。

代谢组学分析是观察细胞整体代谢情况的有效方法，并能在特定条件下对细胞状态进行无偏估计，常用于分析微生物特征，如细胞应激反应、高产机制和微生物群落的相互作用[8-9]。利用代谢组学比较乳酸菌在环境应激状态下代谢产物的差异，进一步阐明代谢途径的变化，是揭示乳酸菌在逆境下应激策略的重要方法[10]。近年来，已有越来越多的研究利用代谢组学成功地揭示了代谢物在抵御外源性应激因素中的重要作用。Zhang等[11]利用非靶向代谢组学分析发现戊糖片球菌（*Pediococcus pentosaceus*）R1在氧化应激下产生了大量代谢产物，如氨基酸、碳水化合物、去甲肾上腺素和甘油，以提供能量并修复细胞损伤。Zhai等[12]通过LC-MS分析代谢组学得出，植物乳植杆菌通过调节细胞外聚合物物质的生物合成、维持相对稳定的核酸代谢和启动能量守恒来抵御镉胁迫。Nugroho等[13]利用毛细管电泳-飞行时间质谱法（CE-TOFMS）分析了酿酒酵母在不同浓度乳酸胁迫下代谢产物的变化，发现酸胁迫下三磷酸腺苷（ATP）、谷胱甘肽和脯氨酸的浓度增加，能量代谢、氧化还原平衡和氨基酸组成的变化有助于提高酿酒酵母对乳酸胁迫的耐受性。

代谢组学在*L. lactis*对乳酸胁迫的应激变化中的应用研究相对较少，因此作者以课题组前期筛选的1株发酵特性良好的耐酸*L. lactis* IMAU51121为研究对象，用LC-MS技术分析*L. lactis* IMAU51121在酸胁迫前后的代谢产物变化，探索*L. lactis* IMAU51121应答酸胁迫的代谢机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

L. lactis IMAU51121（原始编号XGL9-3）：内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室；甲醇、乙腈：色谱级，美国Fisher Chemical公司；甲酸：色谱级，德国CNW科技公司；异丙醇：色谱级，德国Merck公司；*L*-2-氯苯丙氨酸：海泰坦科技股份有限公司；M17肉汤培养基：广东中山百微生物技术有限公司；葡萄糖、乳酸：分析纯，天津市鑫铂特化工有限公司。

1.2 仪器与设备

超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱：UHPLC-Q Exactive HF-X型，美国赛默飞世尔科技公司；色谱柱（100 mm×2.1 mm×1.8 μm）：HSS T3型，美国Waters公司；氮气吹扫仪：JXDC-20型，上海净信实业发展有限公司；恒温培养箱：DHP-9272型，上海一恒科技有限公司；高压蒸汽灭菌锅：SX-700型，日本Tomy Digital Biology公司。

1.3 菌株活化

将保存于冻存管的*L. lactis* IMAU51121接种到GM17肉汤培养基（M17肉汤培养基中添加5 g/L的葡萄糖）中，30 ℃培养12~14 h，按接种体积分数2%活化2次，第3代菌液用于后续试验。

1.4 *L. lactis* IMAU51121酸胁迫处理

1.4.1 不同pH下活菌数的测定

从5 mL活化后的菌液中取500 μL作为对照组，置于质量分数0.85%生理盐水中，进行10倍梯度稀释，用平板计数法进行活菌计数。然后将剩余4.5 mL菌液于4 000 *g*离心3 min，收集菌泥，用质量分数0.85%生理盐水洗涤并重悬于等体积的pH分别为4.5、4.0、3.5（乳酸调节）的GM17液体培养基中，于30 ℃培养2 h，取500 μL菌液进行10倍梯度稀释至合适浓度，进行平板活菌计数。

1.4.2 酸处理时间的确定

从5 mL活化后的菌液中取500 μL作为对照组，处理方法同1.4.1。将剩余4.5 mL菌液于4 000 *g*离心3 min，收集菌泥，用生理盐水洗涤后，加入等体积pH 4.0（乳酸调节）的GM17液体培养基进行酸胁迫，于30 ℃培养。在15、30、45、60、75、90、105、120 min时，取500 μL菌液分别稀释1×10^{-4}倍、1×10^{-5}倍、1×10^{-6}倍，之后进行平板活菌计数。

1.5 代谢组学分析

1.5.1 样品制备

将*L. lactis* IMAU51121置于pH为4.0的GM17液体培养基中酸胁迫30 min作为酸处理样本，以未进行酸处理的样本为对照组，每组重复6次。分别吸取200 μL样本于1.5 mL离心管中，

加入400 μL提取液，提取液为*V*（乙腈）∶*V*（甲醇）=1∶1，涡旋30 s，超声（5 ℃、40 kHz）30 min，然后于−20 ℃下静置30 min，于4 ℃、13 000 *g*离心15 min，移取上清液，氮气吹干，加入100 μL复溶液，复溶液为*V*（乙腈）∶*V*（水）=1∶1，超声（5 ℃、40 kHz）5 min，于4 ℃、13 000 *g*条件下离心5 min，移取上清液至带有内衬管的进样小瓶中，上机分析。另外，每个样本分别移取20 μL上清液，混合后作为质控（quality control，QC）样本。

1.5.2　色谱条件

色谱柱为HSS T3；流动相A为体积分数95.0%超纯水和体积分数5.0%乙腈（含体积分数0.1%甲酸），流动相B为体积分数47.5%乙腈、体积分数47.5%异丙醇和体积分数5.0%超纯水（含体积分数0.1%甲酸）。进样量2 μL，柱温40 ℃，梯度洗脱程序见表1。

表1　流动相梯度洗脱程序

Table 1　Gradient elution procedure of mobile phase

时间/min	流量/（μL/min）	流动相A体积分数/%	流动相B体积分数/%
0	400	100.0	0
3.5	400	75.5	24.5
5.0	400	35.0	65.0
5.5	400	0	100.0
7.4	600	0	100.0
7.6	600	48.5	51.5
7.8	500	100.0	0
9.0	400	100.0	0
10.0	400	100.0	0

1.5.3　质谱条件

样品质谱信号采集采用正负离子扫描模式，扫描范围*m*/*z*为70~1 050。鞘气的气压为345 kPa，辅助气的气压为90 kPa，辅助气加热温度为425 ℃，正模式离子喷雾电压设置为3 500 V，负模式离子喷雾电压设置为−3 500 V，离子传输管温度为325 ℃。一级质谱分辨率为60 000，二级质谱分辨率为7 500，用数据依赖采集（data dependent acquisition，DDA）模式采集数据。

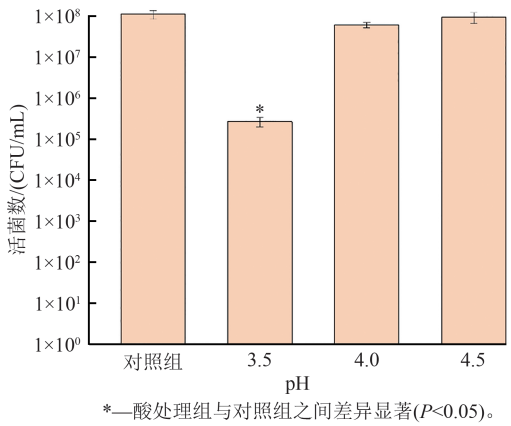
1.6　数据分析

将LC-MS原始数据导入代谢组学处理软件Progenesis QI进行数据前处理，将质谱信息与代谢公共数据库KEGG（http://www.kegg.jp/kegg/compound/）、HMDB（http://www.hmdb.ca/）和Metlin（https://metlin.scripps.edu/）进行匹配注释，得到代谢物信息。原始数据经前处理后采用主成分分析（principal component analysis，PCA）观察所有样品的聚类模式和组内样品的重复性，用正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least-square discriminate analysis，OPLS-DA）方法区分组间差异以及筛选潜在标志代谢物。以VIP≥1、*P*<0.05及FC>1.2为标准筛选显著差异代谢物，并进行分类分析。利用KEGG通路富集分析和拓扑分析对显著差异代谢物进行关键代谢通路筛选。

2　结果与讨论

2.1　不同pH条件下酸胁迫对*L. lactis* IMAU51121活菌数的影响

在乳酸乳球菌生长过程中，由于酸性代谢产物的积累，细胞外pH通常会降至4.5~5.0[14]。因此分别在pH为4.5、4.0、3.5条件下对*L. lactis* IMAU51121进行酸胁迫，2 h后测定活菌数，以未进行酸处理的菌液作为对照组。由图1可知，*L. lactis* IMAU51121对照组的活菌数为1.071×10^8 CFU/mL，在pH 4.5和pH 4.0胁迫2 h的条件下，活菌数分别为9.550×10^7、5.888×10^7 CFU/mL，与对照组相比没有显著性差异。然而*L. lactis* IMAU51121在pH 3.5条件下的活菌数下降到2.818×10^5 CFU/mL，与对照组相比差异显著，表明此时*L. lactis* IMAU51121的活力受到了酸胁迫的严重影响。



*—酸处理组与对照组之间差异显著（*P*<0.05）。

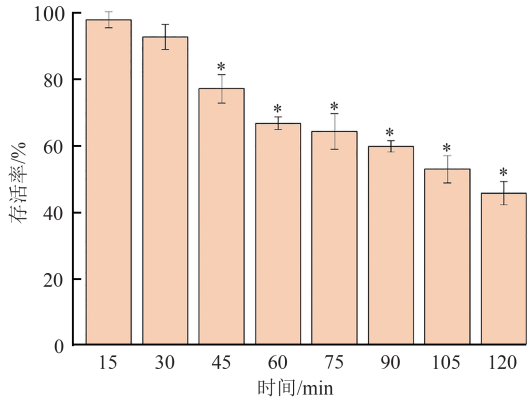
图1　*L. lactis* IMAU51121在不同pH下的活菌数

Fig. 1　Viable count of *L. lactis* IMAU51121 exposed to different pH

2.2 酸处理时间的确定

为了确定酸处理时间，在 pH 4.0 条件下测定不同胁迫时间对 *L. lactis* IMAU51121 存活率的影响，见图 2。*L. lactis* IMAU51121 经乳酸胁迫 15 min 时的存活率为 97.9%，胁迫 30 min 时的存活率为 92.8%，未发生显著变化。胁迫 45 min 时 *L. lactis* IMAU51121 的存活率显著下降，为 77.1%，且存活率随着酸胁迫时间的延长而逐渐降低，到 120 min 时存活率为 45.8%。

L. lactis IMAU51121 在 pH 4.0 条件下胁迫 30 min 时的存活率未显著下降，此时菌体既受到了充分的酸刺激又保持了一定的菌活力，因此选择此条件作为 *L. lactis* IMAU51121 后续代谢组学分析的酸处理条件。



*—酸处理组与对照组之间差异显著(P<0.05)。

图 2 *L. lactis* IMAU51121 在 pH 4.0 的条件下处理不同时间的存活率

Fig. 2 Survival rate of *L. lactis* IMAU51121 exposed to pH 4.0 for different time periods

2.3 酸胁迫下 *L. lactis* IMAU51121 代谢物的 PCA 分析

PCA 是一种反映群体之间总体差异和相似性的统计方法，该方法根据样本之间的差异对样本进行分离，并确保没有显著的异常值。对 *L. lactis* IMAU51121 对照组（未进行酸处理）和酸处理组（pH 4.0 下胁迫 30 min）的检测数据进行 PCA 分析，见图 3。在正离子（ESI^+）和负离子（ESI^-）模式下，QC 样本紧密靠拢，说明该方法具有良好的稳定性和重复性。2 种模式下对照组和酸处理组的组内数据较为聚集，说明试验数据具有平行性；2 组距离较远且分离明显，说明酸胁迫可以明显改变 *L. lactis* IMAU51121 的细胞内代谢产物。

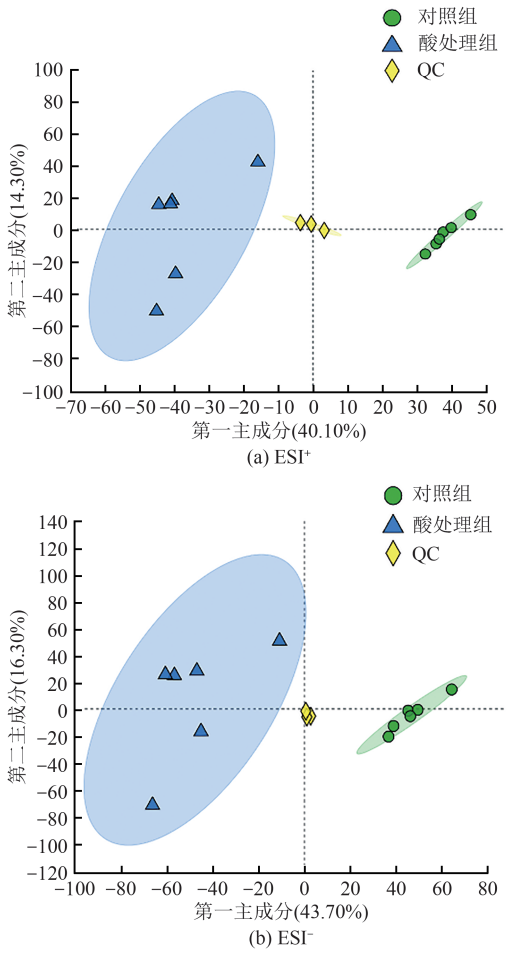


图 3 不同处理样本和 QC 样本的 PCA

Fig. 3 PCA of different treatment samples and QC samples

2.4 酸胁迫下 *L. lactis* IMAU51121 代谢物的 OPLS-DA 分析

使用 OPLS-DA 模型对 *L. lactis* IMAU51121 的胞内代谢物进行比较，OPLS-DA 模型可以确定组间模型的稳健性、预测能力、可靠性和显著性。如图 4 所示，正离子模式下 OPLS-DA 模型的可解释度 R^2_y=0.996，预测度 Q^2=0.96；负离子模式下解释度 R^2_y=0.997，预测度 Q^2=0.965。表明 OPLS-DA 的结果可信度较高，并确定了所有样本之间的大部分变化。此外，为避免 OPLS-DA 的过度拟合，进行了交叉验证，对正、负离子模式下的 2 组数据进行 200 次置换检验，Q^2 在 y 轴上的置换检验截距分别为 −0.079 2 和 −0.112 7，均小于 0，表明 OPLS-DA 模型在该研究中有效性较高。

2.5 差异代谢物筛选

对代谢组原始数据进行处理后共鉴定出 1 178

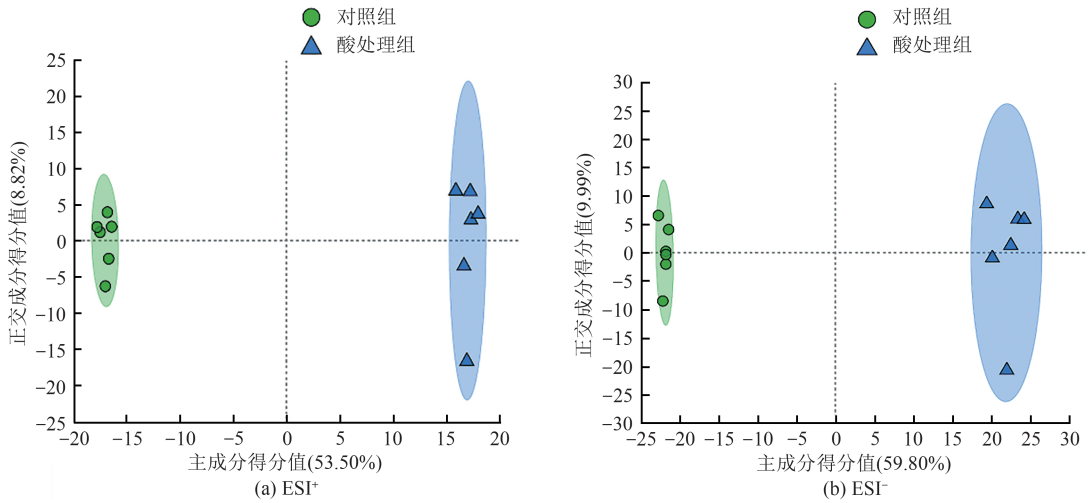


图4　不同处理样本的OPLS-DA分析

Fig. 4　OPLS-DA analysis of different treatment samples

种已知代谢物，在正离子模式下鉴定出640种代谢物，在负离子模式下鉴定出538种代谢物。为了研究酸胁迫前后*L. lactis* IMAU51121的代谢物差异，根据OPLS-DA模型分析结果，以VIP≥1、P<0.05和FC>1.2为标准，共筛选出20种主要差异代谢物，见表2。酸胁迫处理后，*L. lactis* IMAU51121的细胞差异代谢物主要分为5类，分别为氨基酸类、糖类、脂类、核苷酸类以及其他类。

表2　酸处理下*L. lactis* IMAU51121的主要差异代谢物

Table 2　Main differential metabolites of *L. lactis* IMAU51121 under acid treatment

类别	名称	分子式	保留时间/min	质荷比	变化趋势
氨基酸类	*L*-组氨酸	$C_6H_{11}N_3O$	3.366 4	346.197	↑
	天冬氨酸	$C_4H_7NO_4$	6.002 9	286.310	↑
	异亮氨酸	$C_6H_{13}NO_2$	2.183 1	242.186	↑
	赖氨酸	$C_6H_{14}N_2O_2$	2.516 6	332.181	↑
	L-谷氨酰胺	$C_5H_{10}N_2O_3$	0.630 7	147.076	↑
	瓜氨酸	$C_6H_{13}N_3O_3$	0.623 1	176.103	↓
	β-酪氨酸	$C_9H_{11}NO_3$	3.116 8	180.066	↓
糖类	乳果糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	0.630 7	365.105	↑
	UDP-葡萄糖	$C_{15}H_{24}N_2O_{17}P_2$	0.635 0	565.048	↓
	UDP-*D*-半乳糖	$C_{15}H_{24}N_2O_{17}P_2$	0.801 9	565.047	↓
脂类	3-甲基亚油酸	$C_9H_{16}O_4$	6.126 3	171.101	↑
	10-硝基亚油酸	$C_{18}H_{31}NO_4$	5.618 5	308.222	↑
	棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	6.002 9	274.274	↑
	豆蔻酸	$C_{14}H_{28}O_2$	5.541 7	292.227	↓
核苷酸类	尿苷	$C_9H_{12}N_2O_6$	1.791 6	243.062	↑
	一磷酸鸟苷（GMP）	$C_{10}H_{14}N_5O_8P$	0.690 5	362.051	↓
	黄嘌呤	$C_5H_4N_4O_2$	2.460 4	151.025	↓
	肌苷	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	2.053 8	267.074	↓
其他类	去甲肾上腺素	$C_8H_{11}NO_3$	1.696 2	389.166	↑
	琥珀酸	$C_4H_6O_4$	1.591 1	117.018	↓

注：“↑”、“↓”分别代表*L. lactis* IMAU51121酸胁迫组与对照组相比差异代谢物显著增加或显著下降（P<0.05）。

2.6 主要差异代谢物分类分析

2.6.1 氨基酸类

L. lactis IMAU51121 在酸胁迫后，氨基酸类的主要差异代谢物有 7 种，其中 *L*-组氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、赖氨酸和 *L*-谷氨酰胺的相对含量显著增加。氨基酸可作为前体参与调节胞内 pH 稳态、ATP 生成和蛋白质合成，与调节细胞耐酸性能密切相关[15]。Broadbent 等[16]研究表明，细胞内组氨酸的积累有助于干酪乳酪杆菌 ATCC334 抵抗酸损伤，并使其在 pH 2.5 时的存活率提高了 100 倍以上。这可能与组氨酸咪唑基团在细胞内的缓冲作用有关[17]。Wu 等[18]发现外源添加天冬氨酸可提高 H^+-ATP 酶活性和细胞内 ATP 浓度，促进细胞排出 H^+；同时天冬氨酸还产生过量的 NH_4^+，可通过中和细胞内质子来保护细胞免受酸胁迫。异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸是必需氨基酸，也被称为支链氨基酸（BCAA）[19]。有报道称，暴露于酸性条件下的变形链球菌的异亮氨酸水平升高，异亮氨酸的生物合成会产生 NH_3^+，它可以通过与质子反应生成氨来改善细胞质的酸化，BCAA 的脱氨作用可通过维持细胞内 pH 稳定来抵御酸胁迫[20]。异亮氨酸还可以作为细菌的能源和支链脂肪酸的前体，而支链脂肪酸是主要的膜脂肪酸[21]。此外，氨基酸脱羧已被证明是细菌在酸胁迫下维持细胞内部 pH 稳态的有效方法之一，其中赖氨酸可以在赖氨酸脱羧酶的催化作用下消耗细胞内 H^+，从而减轻酸胁迫的负面影响[22]。*L*-谷氨酰胺在氮的分解代谢和合成代谢中起着重要作用，也是其他氨基酸和核苷酸生物合成的前体[23]。因此推测，细胞可能通过合成更多的前体来应对酸胁迫。在本研究中，瓜氨酸与 *β*-酪氨酸在酸胁迫下相对含量的减少可能是由于 *L. lactis* IMAU51121 利用消耗导致的。

2.6.2 糖类

L. lactis IMAU51121 在酸胁迫后的糖类差异代谢物有 3 种，其中乳果糖的相对含量显著升高，UDP-葡萄糖和 UDP-*D*-半乳糖的相对含量显著减少。乳果糖是一种由乳糖异构化的二糖[24]，作为一种公认的益生元，有助于乳酸菌和益生菌的生存、生长及活性提高[25]。UDP-葡萄糖和 UDP-*D*-半乳糖是碳水化合物、乳糖及糖脂类的代谢前体[26]。细胞在酸胁迫下消耗更多的 ATP，糖代谢的能量主要用于抵御酸环境[27]。一些研究表明，UDP-葡萄糖作为一种内部信号分子，可控制耐受高渗透压、高温和酸胁迫所需基因的表达[28]。

2.6.3 脂类

L. lactis IMAU51121 在酸胁迫后的主要脂类差异代谢物有 4 种，其中不饱和脂肪酸 3-甲基亚油酸和 10-硝基亚油酸与饱和脂肪酸棕榈酸的相对含量显著增加，饱和脂肪酸肉豆蔻酸的相对含量显著减少。乳酸菌可以通过调节膜脂肪酸的组成改变膜流动性以减少细胞损伤[19]。膜的流动性取决于不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值（U/S），增加不饱和脂肪酸含量来提高膜的流动性是乳酸菌应对酸胁迫的方式之一[29-30]。研究表明，植物乳植杆菌 ZDY2013 经过酸预适应后显著增加了饱和脂肪酸和环丙烷的比例[31]。饱和脂肪酸含量的增加可增强细胞膜的刚性，限制了质子流入，从而维持细胞内 pH 稳态，这也是乳酸菌抵御酸胁迫的一种方式[32]。

2.6.4 核苷酸类

L. lactis IMAU51121 在酸胁迫后的主要核苷酸类差异代谢物有 4 种，其中 GMP、黄嘌呤和肌苷在酸胁迫后受到严重抑制，相对含量显著降低。推测是因为酸胁迫对细胞中 ATP 造成损伤，并增加了能量消耗。核苷酸是 DNA 和 RNA 合成的前体，是细胞生长和繁殖的基本物质[33]。核苷酸的合成需要消耗能量，例如腺苷（AMP）或 GMP 从头合成需要消耗 5 个 ATP、6 个高能磷酸键和 1 个 ATP[23]。因此 *L. lactis* IMAU51121 可通过减少核苷酸的合成来保存能量，提高对乳酸的耐受性。而尿苷相对含量显著增加，这有助于 *L. lactis* IMAU51121 在酸胁迫下维持细胞功能和稳态[34]。

2.6.5 其他类

去甲肾上腺素在酸胁迫后相对含量显著增加，琥珀酸相对含量显著减少。ATP 对乳酸菌在逆境下的生存至关重要。去甲肾上腺素含有许多甲基，可以促使细菌生长[11]。推测去

甲肾上腺素是作为*L. lactis* IMAU51121生长的能量来源来应对酸胁迫。细菌的生长繁殖会产生琥珀酸，琥珀酸是一种有机酸，会抑制细胞生长[35]。琥珀酸的相对含量显著下降可能是由于酸胁迫抑制*L. lactis* IMAU51121的生长导致的。

2.7　差异代谢物的KEGG关键代谢通路分析

为了确定差异代谢物参与的高度相关的代谢通路，对筛选的20个差异代谢物进行KEGG通路富集分析和拓扑分析，再通过*P*值及Impact值综合筛选，得到5条在酸胁迫条件下对菌体重要的代谢通路，见表3。差异代谢物参与了5个关键代谢通路，其中3条代谢通路与氨基酸代谢有关，说明酸胁迫对*L. lactis* IMAU51121的氨基酸代谢产生了显著影响。精氨酸是乳酸菌耐受酸胁迫的重要物质，乳酸菌将精氨酸转运到胞内，伴随ATP的产生，经过多种酶的催化生成NH_3和CO_2，NH_3和CO_2可中和酸性质子，产生的ATP可将质子泵出胞外来维持胞内pH稳定[36]。天冬氨酸代谢生成的草酰乙酸和谷氨酸分别参与三羧酸循环和谷氨酸脱羧酶途径，为细胞提供能量[37]。赖氨酸通过脱羧来消耗胞内质子，维持胞内pH平衡[22]。半乳糖参与糖酵解途径产生能量，碳水化合物代谢是细胞产生能量的主要途径，对乳酸菌的耐酸性至关重要[38]。嘌呤核苷酸对能量代谢以及DNA、RNA和蛋白质合成发挥关键作用，Ryssel等[39]研究发现，嘌呤代谢中的PurA和GuaB可催化转化AMP和GMP，这有助于乳酸乳球菌在酸胁迫下生存。

表3　关键代谢通路分析表

Table 3　Analysis of key metabolic pathways

代谢通路	KEGG通路ID	*P*值	FDR	Impact值
精氨酸生物合成	map00220	0.002 02	0.017 65	0.119 35
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	map00250	0.002 99	0.020 91	0.097 83
赖氨酸降解	map00310	0.009 32	0.040 79	0.053 21
半乳糖代谢	map00052	0.007 93	0.039 66	0.039 84
嘌呤代谢	map00230	0.000 17	0.003 06	0.076 65

3　结论

作者向培养基中添加乳酸诱导*L. lactis* IMAU51121酸胁迫应激，利用LC-MS分析*L. lactis* IMAU51121在酸胁迫前后的代谢物变化。通过多变量统计分析方法共筛选出20个主要差异代谢物，分别为氨基酸类、糖类、脂类、核苷酸类和其他类代谢物。酸胁迫后氨基酸类物质的相对含量普遍增加，如*L*-组氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸等；大部分糖类物质的相对含量减少，如UDP-葡萄糖、UDP-*D*-半乳糖；脂类物质中不饱和脂肪酸3-甲基亚油酸和10-硝基亚油酸的相对含量增加；核苷酸类物质的相对含量普遍减少，如GMP、黄嘌呤、肌苷；有机酸如琥珀酸的相对含量减少。此外，酸胁迫下代谢通路也会发生改变。推测酸胁迫下*L. lactis* IMAU51121通过代谢调节胞内pH平衡、细胞膜流动性和能量的产生来抵御酸胁迫。该研究为了解*L. lactis* IMAU51121在酸胁迫下的代谢调控机制提供理论基础，并为后续菌株的开发利用提供参考。

参考文献

[1] ZHU Z M，YANG P S，YANG J H，et al. Comparative transcriptome analysis reveals the contribution of membrane transporters to acid tolerance in *Lactococcus lactis*[J]. Journal of Biotechnology，2022，357：9-17.

[2] YERLIKAYA O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains[J]. Journal of Dairy Science，2019，102(1)：124-134.

[3] DUWAT P，CESSELIN B，SOURICE S，et al. *Lactococcus lactis*，a bacterial model for stress responses and survival[J]. International Journal of Food Microbiology，2000，55(1)：83-86.

[4] ZHANG J，FU R Y，HUGENHOLTZ J，et al. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress[J]. Applied and Environmental Microbiology，2007，73(16)：5268-5275.

[5] SONG A A，IN L L A，LIM S H E，et al. A review on *Lactococcus lactis*：from food to factory[J]. Microbial

Cell Factories，2017，16(1)：139.

[6] ZHU Z M，YANG J H，YANG P S，et al. Enhanced acid-stress tolerance in *Lactococcus lactis* NZ9000 by overexpression of ABC transporters[J]. Microbial Cell Factories，2019，18(1)：136.

[7] CARVALHO A L，TURNER D L，FONSECA L L，et al. Metabolic and transcriptional analysis of acid stress in *Lactococcus lactis*，with a focus on the kinetics of lactic acid pools[J]. PLoS One，2013，8(7)：e68470.

[8] WANG W W，HE J Y，PAN D D，et al. Metabolomics analysis of *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 adhesion activity under initial acid and alkali stress[J]. PLoS One，2018，13(5)：e0196231.

[9] GUAN N Z，LI J H，SHIN H D，et al. Comparative metabolomics analysis of the key metabolic nodes in propionic acid synthesis in *Propionibacterium acidipropionici*[J]. Metabolomics，2015，11(5)：1106-1116.

[10] WU W Q，ZHAO N. Metabolomics of lactic acid bacteria[M]. Singapore City：Springer Nature Singapore Pte Ltd. and Science Press，2019：167-182.

[11] ZHANG H，LIU J M，WEN R，et al. Metabolomics profiling reveals defense strategies of *Pediococcus pentosaceus* R1 isolated from Harbin dry sausages under oxidative stress[J]. LWT-Food Science and Technology，2021，135：110041.

[12] ZHAI Q X，XIAO Y，NARBAD A，et al. Comparative metabolomic analysis reveals global cadmium stress response of *Lactobacillus plantarum* strains[J]. Metallomics，2018，10(8)：1065-1077.

[13] NUGROHO R H，YOSHIKAWA K，SHIMIZU H. Metabolomic analysis of acid stress response in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering，2015，120(4)：396-404.

[14] 朱政明，张娟，堵国成，等. 乳酸乳球菌硫胺素转运蛋白ThiT提高酸耐受性的机制[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(9)：16-24.
ZHU Z M，ZHANG J，DU G C，et al. Mechanism of thiamine transporter thiT improving acid tolerance in *Lactococcus lactis* NZ9000[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(9)：16-24.(in Chinese)

[15] FERNÁNDEZ M，ZÚÑIGA M. Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria[J]. Critical Reviews in Microbiology，2006，32(3)：155-183.

[16] BROADBENT J R，LARSEN R L，DEIBEL V，et al. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress[J]. Journal of Bacteriology，2010，192(9)：2445-2458.

[17] ABE H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle[J]. Biochemistry，2000，65(7)：757-765.

[18] WU C D，ZHANG J，DU G C，et al. Aspartate protects *Lactobacillus casei* against acid stress[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2013，97(9)：4083-4093.

[19] WU C D，HUANG J，ZHOU R Q. Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2014，98(3)：1055-1063.

[20] SANTIAGO B，MACGILVRAY M，FAUSTOFERRI R C，et al. The branched-chain amino acid aminotransferase encoded by *ilvE* is involved in acid tolerance in *Streptococcus mutans*[J]. Journal of Bacteriology，2012，194(8)：2010-2019.

[21] YEHUALAESHET T. Metabolomic responses of *Yersinia enterocolitica* under acid stress[J]. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research，2021，38(2)：30271-30280.

[22] XU J N，GUO L，ZHAO N，et al. Response mechanisms to acid stress of acid-resistant bacteria and biotechnological applications in the food industry[J]. Critical Reviews in Biotechnology，2023，43(2)：258-274.

[23] ZENG L J，SI Z Y，ZHAO X M，et al. Metabolome analysis of the response and tolerance mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* to formic acid stress[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology，2022，148：106236.

[24] ZHAI S X，ZHU L M，QIN S，et al. Effect of lactulose intervention on gut microbiota and short chain fatty acid composition of C57BL/6J mice[J]. Microbiology Open，2018，7(6)：e00612.

[25] AIDER-KACI F A，AIDARBEKOVA S，AIDER M. Impact of electro-activated whey on growth，acid and bile resistance of *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356[J]. Heliyon，2023，9(1)：e13154.

[26] 戴军，关惠琴，陈尚卫，等. 高效液相色谱法分析谷氨酸棒杆菌细胞内尿苷二磷酸葡萄糖和尿苷二磷酸半乳糖[J]. 色谱，2003，21(6)：580-583.
DAI J，GUAN H Q，CHEN S W，et al. Separation and determination of uridine diphosphoglucose (UDPGlu) and uridine diphosphogalactose (UDPGal) in the cell

free extracts of *Corynebacterium glutamicium* by high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2003, 21(6): 580-583. (in Chinese)

[27] ZHANG J, CAIYIN Q, FENG W J, et al. Enhance nisin yield *via* improving acid-tolerant capability of *Lactococcus lactis* F44[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27973.

[28] CHASSAING D, AUVRAY F. The *lmo1078* gene encoding a putative UDP-glucose pyrophosphorylase is involved in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperature[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 275(1): 31-37.

[29] GUAN N Z, LIU L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(1): 51-65.

[30] WU C D, ZHANG J, WANG M, et al. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(7): 1031-1039.

[31] HUANG R H, PAN M F, WAN C X, et al. Physiological and transcriptional responses and cross protection of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 under acid stress[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(2): 1002-1010.

[32] WU P Y, ZHU Q Y, YANG R, et al. Differences in acid stress response of *Lacticaseibacillus paracasei* Zhang cultured from solid-state fermentation and liquid-state fermentation[J]. Microorganisms, 2021, 9(9): 1951.

[33] GIANNATTASIO S, GUARAGNELLA N, CORTE-REAL M, et al. Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death[J]. Gene, 2005, 354: 93-98.

[34] ZHU Z M, YANG P S, WU Z M, et al. Systemic understanding of *Lactococcus lactis* response to acid stress using transcriptomics approaches[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(11): 1621-1629.

[35] HU S M, YOU Y, XIA F F, et al. Genome shuffling improved acid-tolerance and succinic acid production of *Actinobacillus succinogenes*[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(3): 817-822.

[36] 朱政明. 乳酸乳球菌抗酸元器件的高效筛选及其作用分析[D]. 无锡: 江南大学, 2019.

[37] 张彦位. 调控天冬氨酸代谢途径提高*Lactococcus lactis* NZ9000的酸胁迫抗性[D]. 无锡: 江南大学, 2019.

[38] EVEN S, LINDLEY N D, COCAIGN-BOUSQUET M. Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG 1363 grown in continuous acidic cultures[J]. Microbiology-SGM, 2003, 149(Pt 7): 1935-1944.

[39] RYSSEL M, HVIID A M, DAWISH M S, et al. Multi-stress resistance in *Lactococcus lactis* is actually escape from purine-induced stress sensitivity[J]. Microbiology-SGM, 2014, 160(Pt 11): 2551-2559.

（责任编辑：闫林红）