

微生物代谢组学研究及应用进展

席晓敏, 张和平*

(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: 代谢组学是系统生物学的重要研究领域, 具有独特的优势。近年来, 微生物代谢组学这一新兴领域已受到广泛的关注, 它不仅提供了代谢途径的广阔图谱, 而且还阐明了微生物与宿主之间的相互作用机制。本文主要阐述了微生物代谢组学研究过程中样品制备、代谢物分析鉴定以及数据分析等主要研究方法, 介绍了微生物代谢组学在乳酸菌、肠道菌群、病原菌以及食品和营养学研究领域中的研究进展及其应用, 并讨论了微生物代谢组学中的主要问题和发展趋势。

关键词: 微生物; 代谢组学; 研究方法; 应用

Progress in Microbial Metabolomics and Its Application

XI Xiaomin, ZHANG Heping*

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

Abstract: Metabolomics is a significant research field of system biology with unique advantages. Recently, microbial metabolomics has gained much attention. It not only offers a broad picture of metabolic pathways, but also elaborates the mechanisms of the interaction between microbes and their hosts. This article summarizes the major methods involved in the research process of microbial metabolomics, including sampling preparation, analysis, metabolite identification and data analysis. Besides, this review also introduces the development and application of microbial metabolomics in research on lactic acid bacteria, the gut microbiota, pathogens, food science and nutrition. Moreover, we discuss the major issues and future trends in microbial metabolomics.

Key words: microbe; metabolomics; analytical methods; application

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201611049

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 11-0283-07

引文格式:

席晓敏, 张和平. 微生物代谢组学研究及应用进展[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 283-289. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201611049. <http://www.spkx.net.cn>

XI Xiaomin, ZHANG Heping. Progress in microbial metabolomics and its application[J]. Food Science, 2016, 37(11): 283-289. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201611049. <http://www.spkx.net.cn>

代谢组学是对某一生物或生物系统内所有代谢物进行定性和定量分析的一门科学, 能够为人们进一步了解相关代谢途径及其变化提供关键的信息。代谢组学源自代谢组一词, 代谢组 (metabolome) 是指一个生物或细胞在一定生理时期内所有低分子质量代谢物的集合 (包括代谢中间产物、激素、信号分子和次生代谢产物), 它是细胞变化和表型之间相互联系的核心, 直接反映了细胞的生理状态^[1-2]。

由于微生物在生物体系中的重要性, 代谢组学技术在微生物研究领域受到了广泛的关注。1992年

Elmroth等^[3]首次进行了微生物代谢组学研究, 使用气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 技术检测了脂肪酸、氨基酸和糖类物质以评估肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 在培养过程中细菌污染情况。目前, 微生物代谢组学已被广泛应用于不同的研究领域, 如微生物的鉴定及诱变育种、功能基因研究、代谢工程和发酵工程等。本文就微生物代谢组学的研究方法及其研究进展进行概述, 以期进一步推动微生物代谢组学的应用。

收稿日期: 2015-09-10

作者简介: 席晓敏 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为乳品生物技术与加工工程。E-mail: xxmhazou@126.com

*通信作者: 张和平 (1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为乳品生物技术与工艺学。E-mail: hepingdd@vip.sina.com

1 微生物代谢组学的研究过程

精确、灵敏、高通量的研究方法是微生物代谢组学研究的基础。微生物代谢组学的研究过程通常包括样品制备、信号获取、数据处理分析和生物学解释。

1.1 样品制备

为了获得有意义的代谢组学数据,微生物代谢组学研究需要采用合适的样品制备步骤,包括快速取样、淬灭以及代谢物的提取。

快速取样不仅能够防止底物浓度发生巨大变化而且有助于维持微生物代谢物的稳定性,因此许多简单的样品采集装置应运而生,如BioScope装置^[4]和fast swinnex filtration (FSF)装置^[5]等,均可实现样品的快速采集。

为了保证特定时间内样品的真实信息,通常需要迅速对样品进行淬灭以终止代谢反应,理想的淬灭技术应快速淬灭酶活力并且保持细胞或生物的完整性。然而很多淬灭方法,如有机溶剂淬灭等方法会破坏细胞壁和细胞膜导致胞内代谢物大量的渗漏。目前,Wang Xiyue等^[6]采用流式细胞仪评价了不同淬灭方法引起的细胞膜破坏程度,研究发现-80℃的生理盐水淬灭大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)仅导致6%的细胞膜受损,仅仅是常规甲醇淬灭引起细胞膜破坏的1/10,减少了代谢物的渗漏。快速过滤也是目前减少代谢物渗漏的有效方法之一, Kim等^[7]通过分析酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的110种胞内代谢物比较了体积分数60%的甲醇、-40℃纯甲醇、体积分数75%沸腾的乙醇和快速过滤4种淬灭方法,表明快速过滤法能够很大程度上减少代谢物的损失。

代谢物的提取是微生物代谢组学研究的重要步骤,目前,常用的代谢物提取方法有冷甲醇、热甲醇、高氯酸或碱、氯仿-甲醇混合液以及乙腈等。Kim^[8]通过GC-MS分析比较了7种*E. coli*代谢物提取方法,结果表明丁醇中添加铵和乙醇是最有效的提取方法,共检测到289种物质。然而,由于代谢物的多样性,通常很难通过单一的一种提取方法提取全部胞内代谢物,因此结合不同的方法有利于提高代谢物提取效果。

1.2 代谢物的检测、分析及鉴定

代谢物的检测、分析及鉴定是代谢组学研究的核心部分。质谱(mass spectrometry, MS)和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术是两种应用于微生物代谢组学研究的主要平台。

1.2.1 质谱

质谱技术具有高特异性和高灵敏度等优点,广泛的应用于微生物代谢组学分析。其中,GC-MS是发展较为成熟的分析平台,也是最早用于微生物代谢组学研究的分析方法。GC-MS能够同时对几百种化合物(包括有机酸、

氨基酸、糖类、糖醇、芳香胺和脂肪酸等)进行分析,且配有标准的代谢物谱库,可以快速准确对代谢物进行定性分析,但需要对样品进行衍生化处理。Villas-Bôas^[9]和Khoomrung^[10]等进行了很多基于GC-MS的微生物代谢组学的研究,他们采用氯甲酸酯衍生处理获得了不同丝状真菌产生的氨基酸图谱,采用微波衍生化法分析了酵母样品中的脂肪酸。二维GC-MS技术显著提高了复杂样品的分离效果和检测的灵敏度,有效的应用于微生物代谢组学。Bean等^[11]应用全二维气相色谱-飞行时间质谱联用技术(GC×GC-time-of-flight-MS, GC×GC-TOF-MS)分析了铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)培养基顶空的挥发性代谢物图谱,共鉴定了28种新的挥发性物质,包括醇类、醛类、酮类、功能性苯类以及芳香分子,检测数量提高了1倍。液相色谱-质谱联用(liquid chromatograph-mass spectrometry, LC-MS)技术是另一个重要的分析平台,适用于不稳定、难挥发和非极性化合物的分析,不需要对样品进行衍生化处理。亲水作用液相色谱-质谱联用(hydrophilic interaction liquid chromatography-MS, HILIC-MS)技术是一种高通量的胞内代谢组学分析技术,能同时对极性和非极性代谢物进行分析,其数据采集和分析速度是常规方法的两倍, Fan Fei等^[12]采用HILIC-MS技术获得了苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)代谢提取物中92.2%的可检测的极性和脂类代谢物。Coulier等^[13]研发了一种离子色谱-电喷雾质谱(ion-pair-LC coupled to electrospray-ionization MS, IP-LC-ESI-MS)技术,该技术能够同时对几类极性代谢物,如核酸、辅酶A酯、糖核苷酸和二磷酸糖等进行定量分析,是一种有效的微生物代谢物定量分析平台。虽然LC-MS已被应用于许多研究中,但是基于LC-MS的微生物代谢组学研究仍存在问题,如培养基中的高盐浓度会抑制ESI的离子化效率、阻塞泵,最终影响定量分析的有效性和重复性。毛细管电泳-质谱联用(capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE-MS)技术具有分析迅速、样品需要量少、试剂消耗少和相对便宜等优点。Soga等^[14]早在2003年利用CE-MS分析了1692种从枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中提取的代谢物,鉴定了其中的150种,并且对核苷、乙酰辅酶A、阳离子代谢物和阴离子代谢物分别采用了不同的CE-MS平台进行了分析,为了解*B. subtilis*孢子形成过程中代谢物的变化提供了图谱。2007年Soga等^[15]又采用压力辅助毛细管电泳-质谱联用技术(pressure-assisted capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry, PACE-MS)分析了*E. coli*的E. coli的主要酶蛋白。

1.2.2 核磁共振

核磁共振技术能快速准确的对样品进行高通量分析,且无损性,是鉴定有机化合物结构的重要分析技术,能够提供一定条件下生物组织或体液的完整代谢图谱,在微生物代谢组学的研究中有着广阔的应用前景。Son等^[16]运用¹H NMR技术监测了不同酿酒酵母作用下白酒发酵过程中代谢物的变化,实现了对酵母菌株发酵特性的评价。Boroujerdi等^[17]使用NMR分别检测了27℃(剧毒型)和24℃(无毒型)培养温度下的溶珊瑚弧菌(*Vibrio coralliilyticus*)的胞内代谢物,并结合主成分分析(principal components analysis, PCA)发现不同培养温度的*Vibrio coralliilyticus*在PC1、PC2以及PC3主成分下显著分离,且随温度升高,甜菜碱减少,琥珀酸和谷氨酸增加。但是由于微生物胞内代谢物的组成较复杂,包括有机酸、疏水物质以及复杂的天然产物,分子浓度变化跨越了好几个数量级(从pmol到mmol),而NMR灵敏度较低,很难同时检测到生物体系中共存的浓度相差较大的代谢物,一定程度上限制了它在微生物代谢组学中的应用。

1.3 数据处理及分析

数据处理和数据分析是代谢组学研究的关键环节,需要对原始数据进行预处理,消除干扰因素。数据处理一般包括基线校正、特征检测、滤噪、峰对齐、标准化和归一化等步骤。目前,已经有大量软件能将MS获得的原始数据进行预处理转化为二维数据表格,如MZmine^[18]、XCMS^[19]和METIDEA^[20]等软件。许多仪器公司也开发了他们自己的专有软件,如MarkerLynx(Waters)、Progenesis QI(Waters)、MassProfiler(Agilent)、MarkerView(Applied Biosystems/MDS SCIEX)和SIEVE(Thermo Fisher Scientific)等。

预处理后的数据需要进行PCA和偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)等多元统计分析和生物信息学分析,从中获得潜在的有效信息,找出生物标志物及代谢途径等。表1列出了一些具有代表性的(微生物)代谢组学研究相关数据库^[21-23],能够有效地进行生物标志物的鉴定。代谢途径分析不仅有助于了解代谢物之间的相互作用,而且能够探索基因表达数据以完成功能基因组学的研究。

表1 (微生物)代谢组学研究相关数据库
Table 1 Relevant database for (microbial) metabolomics

微生物代谢组学数据库	网址	代谢组学数据库	网址
ECMDB	http://www.ecmdb.ca/	HMDB	http://www.hmdb.ca/
YMDB	http://www.ymdb.ca/	KEGG	www.genome.jp/kegg/
HMP	http://www.hmpdacc.org/	LIPID MAPS	www.lipidmaps.org/
EcoCyc	http://www.ecocyc.org/	METLIN	http://metlin.scripps.edu/
NMD	http://www.foodsafety.govt.nz/industry/general/nmd/	MetaCyc Encyclopedia of Metabolic Pathways	http://metacyc.org/
MNPD	http://naturalprod.ucsd.edu/	PubChem Compound	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcccompound/
UMBB	http://umbb.ethz.ch/	SYSTEMONAS	http://systemonas.tu-bs.de/
BioCyc Pathway	http://biocyc.org/	PathDB	http://www.ncgr.org/pathdb/

2 微生物代谢组学的研究进展及应用

微生物代谢组学是结合了生物信息学和系统微生物学的一门学科,它不仅有助于探索各物种之间的相互关系而且是微生物演化和发展动力学研究的可靠分析工具^[24-25]。本文将从以下四个方面阐述微生物代谢组学的最新研究进展及应用。

2.1 微生物代谢组学在乳酸菌研究领域中的应用

近几年,微生物代谢组学在乳酸菌研究领域取得了很大进展和突破,比如菌株的筛选和鉴定、代谢途径分析、发酵工程以及益生效果等方面。

传统的乳酸菌分类主要通过形态学观察以及生化实验进行表型分类。随着分子生物学技术的发展,基因型分类方法如微生物全基因组测序、16S rDNA序列分析、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)指纹图谱以及DNA杂交技术等得到了广泛的应用。然而,某些菌株的基因型和表型不一致,会得到不一样的分类结果。代谢轮廓分析能够通过比较胞外代谢物特征峰来区别和鉴定不同的菌种或菌株,逐渐成为了一种有效、快速、高通量的方法。熊萍等^[26]基于¹H-NMR代谢组学方法对变异链球菌、血链球菌和嗜酸乳杆菌的细胞外代谢产物进行研究,证实了代谢组学方法能够检测不同菌株的差别,在微生物鉴定中有良好的应用前景。Samelis等^[27]采用傅里叶变换红外光谱(Fourier transformed infra-red, FTIR)方法获得了传统希腊Graviera奶酪中乳酸菌胞外代谢物的红外光谱图,通过与数据库比较实现了乳酸菌的鉴定。Dušková等^[28]比较了PCR、16S-扩增核糖体DNA限制性片段长度多态性分析(16S-amplified rDNA restriction analysis, 16S-ARDRA)以及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术对乳酸菌的鉴定能力,结果表明在种的水平上MALDI-TOF-MS更具有优势,且准确率达到93%。

微生物代谢组学也被广泛地应用于监测发酵过程中组分和菌相变化以及评定发酵食品的感官和营养品质。le Boucher等^[29]以MS技术为基础,利用代谢组学技术获得了干酪生产过程中不同时间的代谢指纹图谱,有效的确定了发酵过程中代谢组的变化,实现了干酪生产监控。Jung等^[30]采用高通量测序技术和¹H NMR技术对韩国泡菜(kimchi)发酵过程中微生物菌群和代谢物的变化进行了监测,结果表明肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)作为发酵剂不仅会增加发酵过程中明串珠菌属的比例、降低乳杆菌属的比例而且缩短了发酵时间,产生更多的有机酸和甘露醇,这为kimchi的发酵调控提供了方向。Meiju是韩国的传统发酵豆酱,通常是由芽孢杆菌、曲霉菌和毛霉菌等发酵形成。Kang等^[31]利

用UPLC-Q-TOF MS技术揭示了Meiju发酵过程中的22种标志物,包括氨基酸、小肽、核酸、鸟氨酸循环中间体以及有机酸等,并构建了Meiju发酵代谢途径,为提高Meiju产品的营养和品质提供了理论参考。由此可见,通过代谢组学技术可以直接检测到乳酸菌发酵产品中各组分的变化,为工艺优化和品质调控提供了有效的工具。

近年,乳酸菌对健康的作用受到了国内外研究者的广泛关注,运用基因组学、转录组学、蛋白组学以及代谢组学等方法探索其对肠道的影响已成为了研究的热点。其中,代谢组学方法不仅能够检测到乳酸菌作用下肠道中代谢物变化而且能够阐明益生菌代谢物对细胞因子表达的影响。Hong等^[32]利用基于¹H NMR的代谢组学技术评估了益生菌对结肠炎小鼠的影响,结果显示益生菌处理的结肠炎小鼠粪便中短链脂肪酸(醋酸和丁酸)和谷氨酰胺水平升高,而三甲胺水平下降,表明益生菌对结肠炎具有有效的保护作用。之后,Hong等^[33]又利用高分辨魔角旋转(high resolution magic-angle spinning, HRMAS)-NMR技术评估了益生菌对肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者的影响,研究发现饮用2个月含有乳杆菌和双歧杆菌发酵乳的IBS患者血浆中葡萄糖、酪氨酸和乳酸浓度逐渐趋于正常,为探索益生菌对IBS的调节机制提供了基础。Shi Xue等^[34]结合GC×GC-TOF-MS技术和多元统计分析指出鼠李糖乳杆菌GG(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGGs)能有效调节酒精性脂肪肝小鼠模型的肠道菌群结构和代谢从而改善宿主健康,研究发现灌服LGGs不仅能够增加肠道中的长链脂肪酸而且降低了肝中的脂肪酸含量并提高了肝中的氨基酸含量。因此,代谢组学是研究益生菌对宿主健康影响的有效工具,能够提供益生菌作用下宿主菌群代谢反应,为探寻调节机理奠定基础。

2.2 微生物代谢组学在肠道菌群研究中的应用

人体内微生物的数量远多于人体内细胞数,其中肠道菌群是目前系统生物学和代谢组学研究的重点之一^[35]。定殖在宿主肠道中的微生物是胃肠道生态系统的重要部分,其功能和代谢与宿主的健康和疾病密切相关,不仅能够预防病原体的感染,而且能够通过自身代谢为宿主提供能量、增强机体免疫力以及与宿主相互作用调节代谢表型等^[36]。Martin等^[37]采用多种技术研究了小鼠模型中肠道微生物与宿主的代谢相互作用,包括使用¹H NMR技术对肝脏、血浆、尿液以及回肠内容物进行代谢轮廓分析,使用LC-MS对胆汁酸进行靶向分析及使用GC技术对盲肠中脂肪酸指纹图谱进行检测,结果发现与普通小鼠相比,植入婴儿肠道菌群的无菌小鼠回肠胆汁酸浓度和肝脏甘油三酯含量较高,而血浆脂蛋白水平降低,这些数据充分表明肠道微生物能够调节肠道吸收以及能量的存储和获得。Wikoff等^[38]采用基于MS的代谢组学技术对无菌小鼠和普通小鼠的血浆进行研究,发现肠道菌群对

哺乳动物血浆代谢物具有显著的影响,如抗氧化剂3-吡啶丙酸仅存在于普通小鼠血浆中,但在无菌小鼠中植入产芽孢梭状芽孢杆菌(*Clostridium sporogenes*)后,血浆中也检测到了3-吡啶丙酸,表明宿主3-吡啶丙酸的产生受肠道微生物区系的影响。Sarik等^[39]采用¹H NMR技术比较人体、小鼠和大鼠的水溶性粪便代谢物,研究发现三者具有独特的粪便代谢物图谱,如 β -丙氨酸仅存在于大鼠粪便中,而甘油和丙二酸盐为人类粪便所特有,证实了不同胃肠道微生物对粪便代谢组具有显著的影响。由此可见,微生物代谢组学技术可以直接检测到肠道菌群变化下宿主代谢表型变化,为进一步阐明肠道微生物与人体相互作用机制提供了新的研究策略和研究方法。

正常情况下,肠道菌群结构对疾病的预防与控制有着重要的作用,但是肠道菌群失调以及微生物生物多样性改变都会对宿主产生一系列的不利影响,导致各类胃肠道疾病、代谢疾病和免疫类疾病的发生。很多研究人员已经运用代谢组学技术对肠道菌群与宿主代谢产物进行了研究以探寻肠道菌群对宿主健康和疾病的作用,并取得很多重要成果。Raman等^[40]采用GC-MS和焦磷酸测序技术分析非酒精性脂肪肝肥胖患者粪便样品中挥发性代谢物及肠道菌群结构变化,结果表明非酒精性脂肪肝肥胖患者粪便中酯类物质的增加与其肠道菌群结构变化有关。Ahmed等^[41]使用GC-MS技术IBS、克罗恩病(crohn's disease, CD)、溃疡性结肠炎患者以及健康人群的粪便挥发性有机物(volatile organic metabolites, VOMs)进行了代谢组学研究,结果显示IBS发生于短链脂肪酸、环乙酸和乙酸有关。Wang Zeneng等^[42]基于代谢组学技术和无菌小鼠实验发现肠道菌群的磷脂酰胆碱代谢能够促进心血管疾病的发生,并且肠道菌群在氧化三甲胺的产生以及泡沫细胞形成等方面起着重要作用。因此,采用微生物代谢组学技术分析肠道微生物和宿主共代谢对揭示肠道微生物的代谢功能及其对宿主健康和疾病的作用至关重要。

2.3 微生物代谢组学在病原菌研究中的应用

目前,代谢组学技术已广泛的应用于病原菌研究领域,能够对病原菌多个方面进行详细分析,这将快速促进其发展。MS是真菌植物病原菌研究中最常用的代谢组学分析技术,广泛用于分析病原菌的突变和次级代谢产物的检测及筛选^[43]。Tan等^[44]通过GC-MS发现缺少*Sch1*基因的赭壳壳针孢(*Stagonospora nodorum*)突变菌株的次生代谢产物浓度是野生菌株的200倍,并通过ESI-MS/MS确定该次生代谢产物是交链孢酚,为阐明*Sch1*基因的功能和作用奠定了理论基础。Lowe等^[45]采用GC-MS对小麦病原菌*Stagonospora nodorum*孢子形成过程中相关代谢物进行了非靶向分析,研究发现壳聚糖在孢子形成过程中起着重要的作用。

此外,微生物代谢组学也被应用于病原菌感染引起的疾病诊断。目前,粪便中挥发性有机化合物的GC-MS分析揭示了代谢组学技术可用于区分不同病原菌引起的腹泻,Probert等^[46]研究发现艰难梭菌(*Clostridium difficile*)感染的腹泻粪便中会检测到呋喃,而粪便中十二烷酸盐化合物的出现表明腹泻是轮状病毒(*Rotavirus*)感染所引起的,弯曲杆菌(*Campylobacter*)感染则会导致粪便中萜类物质的增加,十二烷酸盐化合物的减少和氨基化合物的增加是其他肠病毒感染的生物标志物,该研究不仅为腹泻病因的快速诊断提供了理论依据而且为不同腹泻病原菌的鉴定提供了参考。还有一些研究表明一些挥发性物质与真菌感染宿主引起的病害密切相关。Cao Mingshu等^[47]以感染内生真菌(*Neotyphodium lolii*, *N. lolii*)的黑麦草和未感染*N. lolii*的黑麦草的3块不同组织(不成熟的叶片、叶片和叶鞘)为研究对象,使用LC-MS研究了其代谢物,揭示了感染*N. lolii*的黑麦草中存在甘露醇和波胺。这些研究结果充分说明微生物代谢组学不仅能够通过病原菌分泌的代谢物实现菌种的鉴定,而且是病原菌感染诊断的有效工具。

2.4 微生物代谢组学在食品和营养学中的应用

多年来,食品安全一直都受到各国政府和人民的重视。微生物降解食品产生的病原体、毒素以及副产品都与食品安全问题有着密切的关系。因此,监测这些相关代谢物对于食品安全非常重要。微生物代谢组学为食品安全评价提供了新策略,已成功应用于食品中的有毒物质的检测,如采用GC-MS技术研究特定微生物污染有关的挥发性代谢物的指纹图谱,使用LC-MS和NMR技术检测食品中微生物毒素等。Qian Mingrong等^[48]形成一套可靠的三重串联四极杆气相色谱质谱联用(gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, GC-QqQ MS)分析方法,用于检测食用植物油中镰刀菌产生的玉米烯酮等毒素。Ediage等^[49]采用LC-MS/MS实现了对不同高粱品种中23种真菌毒素的检测和定量分析。

另外,微生物代谢组学也被应用于评估营养素缺乏与过量对机体代谢平衡的影响,更精确地监测饮食对机体的影响,减少混杂因素如年龄、性别、生理状态和生活方式等的干扰^[50]。Ibáñez等^[51]采用CE、反相/超高效液相色谱(reverse phase /ultra-performance liquid chromatography, RP/UPLC)和HILIC/UPLC-TOF-MS联用技术揭示了饮食中多酚类物质对人体结肠癌HT29细胞抗增生具有显著的影响,通过使用非靶向代谢分析方法发现多酚物质处理后抗氧化剂谷胱甘肽比率上升,且维持细胞增殖和调节基因表达的多胺类物质出现了表达差

异,抑制细胞生长,这为预防和治疗结肠癌提供了理论依据。Wang Yulan等^[52]使用基于NMR的代谢组学技术监测了正常小狗和饮食限制小狗的尿液代谢图谱,结果表明饮食限制能够改变小狗肠道微生物活性,主要表现在饮食限制小狗的尿液中芳香族代谢物和肌酸/肌酐以及醋酸化合物浓度增加,而研究表明这些化合物都与肠道菌群密切相关。Merrifield等^[53]通过对小猪尿液¹H NMR代谢图谱分析证实了不同的断奶饮食会产生不同的代谢类型,进而导致肠道菌群与宿主代谢物发生变化。另外,他们还发现与IgA和IgM相关的肠道黏膜产物是由断奶饮食过程中双歧杆菌NCC2818的摄入产生的,为评估黏膜免疫状态提供的新的研究策略。这些研究结果充分说明微生物代谢组学能快速有效地对动物机体健康、疾病预测和诊断做出全面的评估,更深入地了解营养与机体代谢的相互作用。

3 结 语

综上所述,代谢组学已广泛地用于微生物学研究,为微生物学研究提供了全面系统的分析手段。而且,随着样品制备方法的不断完善以及分析技术的快速发展,微生物代谢组学在过去的20 a里取得了重大进展,不仅能用于微生物代谢过程中生物标志物的研究,为发酵工艺监测、安全性检测以及病原菌感染诊断提供全面有效的评估方法,还能用于肠道菌群与宿主代谢机制研究,为预防和治疗代谢疾病提供理论依据。但是,微生物代谢组学仍然存在一些问题亟待解决:缺乏标准的代谢物淬灭和提取方法;目前微生物代谢组学数据库主要局限于特定微生物,主要是酵母和大肠杆菌,缺乏囊括不同微生物代谢数据的标准数据库,尤其是针对细菌和真菌的代谢组学数据库;目前微生物代谢组学研究很大程度上仅仅关注代谢物本身而忽略了它们的来源。例如,来自宿主和微生物代谢的葡萄糖虽然化学组成及结构上是完全相同的,但它们的生物学意义及参与的代谢通路却使得它们的调控不径相同。

与代谢组学在药物研发、疾病诊断等领域的应用以及植物代谢组学相比,微生物代谢组学研究仍处于发展初期。然而,微生物代谢组学研究存在很多优势,比如微生物系统简单,基因数据丰富以及微生物生理特征了解全面等。同时,将微生物代谢组学与基因组学、转录组学以及蛋白组学等相整合,能够深入的研究代谢途径、调控反应以及体内平衡机制,帮助人们更系统的认识生物体。综上所述,微生物代谢组学作为快速发展的新型研究领域,是系统生物学的重要组成部分和技术平台,促进了系统微生物学的发展。

参考文献:

- [1] RAAMSDONK L M, TEUSINK B, BROADHURST D, et al. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(1): 45-50. DOI:10.1038/83496.
- [2] PALSSON B. Metabolic systems biology[J]. *FEBS Letters*, 2009, 583(24): 3900-3904. DOI:10.1016/j.febslet.2009.09.031.
- [3] ELMROTH I, SUNDIN P, VALEUR A, et al. Evaluation of chromatographic methods for the detection of bacterial contamination in biotechnical processes[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1992, 15(3): 215-228. DOI:10.1016/0167-7012(92)90042-3.
- [4] VISSER D, van ZUYLEN G A, van DAM J C, et al. Rapid sampling for analysis of *in vivo* kinetics using the BioScope: a system for continuous-pulse experiments[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 79(6): 674-681. DOI:10.1002/bit.10328.
- [5] MCCLOSKEY D, UTRILLA J, NAVIAUX R K, et al. Fast swinex filtration (FSF): a fast and robust sampling and extraction method suitable for metabolomics analysis of cultures grown in complex media[J]. *Metabolomics*, 2015, 11(1): 198-209. DOI:10.1007/s11306-014-0686-2.
- [6] WANG X Y, XIE Y G, PENG G, et al. A metabolomics-based method for studying the effect of *yfcC* gene in *Escherichia coli* on metabolism[J]. *Analytical Biochemistry*, 2014, 451(8): 48-55. DOI:10.1016/j.ab.2014.01.018.
- [7] KIM S, LEE D Y, WOHLGEMUTH G, et al. Evaluation and optimization of metabolome sample preparation methods for *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(4): 2169-2176. DOI:10.1021/ac302881e.
- [8] KIM J H. An assessment of extraction methods for global metabolic profiling of *Escherichia coli*[C]/37th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. San Diego: California, 2015.
- [9] VILLAS-BÔAS S G, DELICADO D G, NIELSEN J, et al. Simultaneous analysis of amino and nonamino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 322(1): 134-138. DOI:10.1016/j.ab.2003.07.018.
- [10] KHOOMRUNG S, CHUMNANPUEN P, NIELSEN J, et al. Fast and accurate preparation fatty acid methyl esters by microwave-assisted derivatization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(6): 1637-1646. DOI:10.1007/s00253-012-4125-x.
- [11] BEAN H D, DIMANDJA J M D, HILL J E. Bacterial volatile discovery using solid phase microextraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences*, 2012, 901(14): 41-46. DOI:10.1016/j.jchromb.2012.05.038.
- [12] FAN F, BOWDISH D M E, MCCARRY B E. Comprehensive and simultaneous coverage of lipid and polar metabolites for endogenous cellular metabolomics using HILIC-TOF-MS[J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(15): 3723-3733. DOI:10.1007/s00216-014-7797-5.
- [13] COULIER L, BAS R, JESPERSEN S, et al. Simultaneous quantitative analysis of metabolites using ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(18): 6573-6582. DOI:10.1021/ac0607616.
- [14] SOGA T, OHASHI Y, UENO Y, et al. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry[J]. *Journal of Proteome Research*, 2003, 2(5): 488-494. DOI:10.1021/pr034020m.
- [15] SOGA T, ISHIKAWA T, IGARASHI S, et al. Analysis of nucleotides by pressure-assisted capillary electrophoresis-mass spectrometry using silanol mask technique[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1159(1/2): 125-133. DOI:10.1016/j.chroma.2007.05.054.
- [16] SON H S, HWANG G S, KIM K M, et al. ¹H NMR-based metabolomic approach for understanding the fermentation behaviors of wine yeast strains[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 81(3): 1137-1145. DOI:10.1021/ac802305c.
- [17] BOROUJERDI A F B, VIZCAINO M I, MEYERS A, et al. NMR-based microbial metabolomics and the temperature-dependent coral pathogen *Vibrio coralliilyticus*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(20): 7658-7664. DOI:10.1021/es901675w.
- [18] PLUSKAL T, CASTILLO S, VILLAR-BRIONES A, et al. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11(1): 1859-1860. DOI:10.1186/1471-2105-11-395.
- [19] TAUTENHAHN R, PATTI G J, RINEHART D, et al. XCMS online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(11): 5035-5039. DOI:10.1021/ac300698c.
- [20] BROECKLING C D, REDDY I R, DURAN A L, et al. MET-IDEA: data extraction tool for mass spectrometry-based metabolomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(13): 4334-4341. DOI:10.1021/ac0521596.
- [21] XU Y J, WANG C, HO W E, et al. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 56: 37-48. DOI:10.1016/j.trac.2013.12.009.
- [22] TAUTENHAHN R, CHO K, URITBOONTHAI W, et al. An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(9): 826-828. DOI:10.1038/nbt.2348.
- [23] VERMA M, LAL D, SAXENA A, et al. Understanding alternative fluxes/effluxes through comparative metabolic pathway analysis of phylum actinobacteria using a simplified approach[J]. *Gene*, 2013, 531(2): 306-317. DOI:10.1016/j.gene.2013.08.076.
- [24] REAVES M L, RABINOWITZ J D. Metabolomics in systems microbiology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(1): 17-25. DOI:10.1016/j.copbio.2010.10.001.
- [25] WU L, van DAM J, SCHIPPER D, et al. Short-term metabolome dynamics and carbon, electron, and ATP balances in chemostat-grown *Saccharomyces cerevisiae* CEN. PK 113-7D following a glucose pulse[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3566-3577. DOI:10.1128/AEM.72.5.3566-3577.2006.
- [26] 熊萍, 肖丽英, 李继遥. 变异链球菌, 血链球菌及嗜酸乳杆菌代谢组学鉴定的初步研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2008, 26(5): 537-540. DOI:10.3321/j.issn:1000-1182.2008.05.023.
- [27] SAMELIS J, BLEICHER A, DELBÈS-PAUS C, et al. FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(1): 76-83. DOI:10.1016/j.fm.2010.08.009.
- [28] DUŠKOVÁ M, ŠEDO O, KŠICOVÁ K, et al. Identification of *Lactobacilli* isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 159(2): 107-114. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029.

- [29] le BOUCHER C, COURANT F, JEANSON S, et al. First mass spectrometry metabolic fingerprinting of bacterial metabolism in a model cheese[J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 1032-1040. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.03.094.
- [30] JUNG J Y, LEE S H, LEE H J, et al. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(3): 378-387. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.030.
- [31] KANG H J, YANG H J, KIM M J, et al. Metabolomic analysis of meju during fermentation by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS)[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1056-1064. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.01.080.
- [32] HONG Y S, AHN Y T, PARK J C, et al. ¹H NMR-based metabonomic assessment of probiotic effects in a colitis mouse model[J]. Archives of Pharmacal Research, 2010, 33(7): 1091-1101. DOI:10.1007/s12272-010-0716-1.
- [33] HONG Y S, HONG K S, PARK M H, et al. Metabonomic understanding of probiotic effects in humans with irritable bowel syndrome[J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2011, 45(5): 415-425. DOI:10.1097/MCG.0b013e318207f76c.
- [34] SHI X, WEI X, YIN X, et al. Hepatic and fecal metabolomic analysis of the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on alcoholic fatty liver disease in mice[J]. Journal of Proteome Research, 2015, 14(2): 1174-1182. DOI:10.1021/pr501121c.
- [35] PETERSON J, GARGES S, GIOVANNI M, et al. The NIH human microbiome project[J]. Genome Research, 2009, 19(12): 2317-2323. DOI:10.1101/gr.096651.109.
- [36] NICHOLSON J K, HOLMES E, KINROSS J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions[J]. Science, 2012, 336: 1262-1267. DOI:10.1126/science.1223813.
- [37] MARTIN F P J, DUMAS M E, WANG Y, et al. A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model[J]. Molecular Systems Biology, 2007, 3(1): 112-128. DOI:10.1038/msb4100153.
- [38] WIKOFF W R, ANFORA A T, LIU J, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(10): 3698-3703. DOI:10.1073/pnas.0812874106.
- [39] SARIC J, WANG Y, LI J, et al. Species variation in the fecal metabolome gives insight into differential gastrointestinal function[J]. Journal of Proteome Research, 2007, 7(1): 352-360. DOI:10.1021/pr070340k.
- [40] RAMAN M, AHMED I, GILLEVET P M, et al. Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2013, 11(7): 868-875. DOI:10.1016/j.cgh.2013.02.015.
- [41] AHMED I, GREENWOOD R, COSTELLO B D E L, et al. An investigation of fecal volatile organic metabolites in irritable bowel syndrome[J]. PLoS ONE, 2013, 8(3): e58204. DOI:10.1371/journal.pone.0058204.
- [42] WANG Z N, KLIPFEL E, BENNETT B J, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. Nature, 2011, 472(7341): 57-63. DOI:10.1038/nature09922.
- [43] NIELSEN K F, SMEDSGAARD J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1002(1/2): 111-136. DOI:10.1016/S0021-9673(03)00490-4.
- [44] TAN K C, TRENGOVE R D, MAKER G L, et al. Metabolite profiling identifies the mycotoxin alternariol in the pathogen *Stagonospora nodorum*[J]. Metabolomics, 2009, 5(3): 330-335. DOI:10.1007/s11306-009-0158-2.
- [45] LOWE R G T, LORD M, RYBAK K, et al. Trehalose biosynthesis is involved in sporulation of *Stagonospora nodorum*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2009, 46(5): 381-389. DOI:10.1016/j.fgb.2009.02.002.
- [46] PROBERT C S J, JONES P R H, RATCLIFFE N M. A novel method for rapidly diagnosing the causes of diarrhoea[J]. Gut, 2004, 53(1): 58-61. DOI:10.1136/gut.53.1.58.
- [47] CAO M S, KOULMAN A, JOHNSON L J, et al. Advanced data-mining strategies for the analysis of direct-infusion ion trap mass spectrometry data from the association of perennial ryegrass with its endophytic fungus, *Neotyphodium lolii*[J]. Plant Physiology, 2008, 146(4): 1501-1514. DOI:10.1104/pp.107.112458.
- [48] QIAN M M, ZHANG H, WU L, et al. Simultaneous determination of zearalenone and its derivatives in edible vegetable oil by gel permeation chromatography and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2015, 166: 23-28. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.05.133.
- [49] EDIAGE E N, van POUCKE C, de SAEGER S. A multi-analyte LC-MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: the forgotten sample matrix[J]. Food Chemistry, 2015, 177: 397-404. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.01.060.
- [50] SCALBERT A, BRENNAN L, FIEHN O, et al. Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research[J]. Metabolomics, 2009, 5(4): 435-458. DOI:10.1007/s11306-009-0168-0.
- [51] IBÁÑEZ C, SIMÓ C, GARCÍA-CAÑAS V, et al. CE/LC-MS multiplatform for broad metabolomic analysis of dietary polyphenols effect on colon cancer cells proliferation[J]. Electrophoresis, 2012, 33(15): 2328-2336. DOI:10.1002/elps.201200143.
- [52] WANG Y L, LAWLER D, LARSON B, et al. Metabonomic investigations of aging and caloric restriction in a life-long dog study[J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(5): 1846-1854. DOI:10.1021/pr060685n.
- [53] MERRIFIELD C A, LEWIS M C, CLAUS S P, et al. Weaning diet induces sustained metabolic phenotype shift in the pig and influences host response to *Bifidobacterium lactis* NCC2818[J]. Gut, 2013, 62(6): 842-851. DOI:10.1136/gutjnl-2011-301656.