

正丙醇对浑浊红球菌 PD630 影响的代谢组学分析

Metabolomics analysis of 1-propanol effect on *Rhodococcus opacus* PD630

楚美云¹张林尚¹娄文勇¹宗敏华¹CHU Mei-yun¹ ZHANG Lin-shang¹ LOU Wen-yong¹ ZONG Min-hua¹唐语谦^{1,2} 徐晓飞² 杨继国^{1,2}TANG Yu-qian^{1,2} XU Xiao-fei² YANG Ji-guo^{1,2}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510640; 2. 华南协同创新研究院, 广东 东莞 523808)

(1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 2. South China Institute of Collaborative Innovation, Dongguan, Guangdong 523808, China)

摘要:采用超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱法(UPLC-Triple-TOF/MS)对正丙醇存在条件下浑浊红球菌 PD630 体内的代谢物进行非靶标代谢组学分析。然后对其进行多元统计分析,识别差异代谢物。研究结果显示,在 48 h 试验组与对照组的差异代谢物共有 54 种,在 72 h 差异代谢物有 61 种,主要体现在短肽减少和磷脂的不饱和度增加。同时丙酰辅酶 A(CoA)显著性增加($P < 0.001$),且通过气相色谱测脂肪酸组成时发现奇数碳脂肪酸的含量从 32.91% 提高到 79.66%,提升了 2.4 倍。说明正丙醇对脂肪酸的合成途径影响较大。

关键词:正丙醇;浑浊红球菌 PD630;代谢组学;代谢物

Abstract: Ultra Performance Liquid Chromatography-Triple-Time of Flight Mass Spectrometer (UPLC-Triple-TOF/MS) was used for non-target metabolomics analysis of metabolites in *Rhodococcus opacus* PD630 in the presence of 1-propanol. Then a multivariate statistical analysis as well as an identification of differential metabolites was conducted for it. The results showed that there were 54 differential metabolites between the experimental group and the control group at 48 h, and 61 differential metabolites at 72 h. The decrease of short peptides and the increase in the degree of unsaturation of phospholipids were major metabolite changes. Meanwhile, a significant increase in propionyl CoA was observed ($P < 0.001$). The fatty acid composition was also determined by gas chromatography. The content of odd carbon fatty acids increased from 32.91% to 79.66%, with an increase of 2.4 times. This indicated that 1-propanol also had a

great influence on the synthesis pathway of fatty acids.

Keywords: 1-propanol; *Rhodococcus opacus* PD630; metabolomics; metabolites

浑浊红球菌 PD630 拥有高脂质产量^[1-2],适合于高细胞密度的方式来进行培养,并且可以代谢多种碳源^[3-4]。该菌是用于工业生产微生物油脂极具潜力的菌株之一^[5],其基因组信息已被公布,遗传改造体系也已建立。浑浊红球菌 PD630 可以将醇类作为其碳源实现油脂的合成^[6],合成的油脂在医疗、保健领域以及生物能源领域都具有重要的应用前景^[7-8]。

一般而言,自然条件下油脂中偶数碳脂肪酸的含量比较高,奇数碳脂肪酸的含量低。而近些年的一些报道显示奇数碳脂肪酸具有重要的功能特性。奇数碳脂肪酸可用作抗过敏、抗炎和抗真菌剂^[9]。奇数碳脂肪酸在人体健康中也起着重要作用^[10]。有文献^[11]报道正丙醇的添加对于提高浑浊红球菌 PD630 中奇数碳脂肪酸的含量至关重要。然而,对于微生物而言,醇类可能会对其产生一定的毒害作用。比如对其细胞膜的结构会产生破坏作用,进而使得胞内的物质发生外泄,原因是醇能改变细胞膜的流动性并破坏磷脂层^[12]。此外,许多生理功能,包括营养物和离子的转运以及细胞代谢都会受到醇的影响^[13]。目前正丙醇对红球菌 PD630 的毒害作用尚不清楚,红球菌在正丙醇存在时的应激机制尚不明确。

UPLC-Triple-TOF/MS 非靶标代谢组学分析可以通过检测微生物在经受外部刺激前后,其体内小分子代谢物的变化进而阐明微生物对外界刺激的应激机制。红球菌在正丙醇存在时的应激机制还未见研究。试验拟采用 UPLC-Triple-TOF/MS 对正丙醇存在条件下浑浊红球菌 PD630 体内的代谢物进行非靶标代谢组学分析,并结合

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2018YFC1602106, 2017YFC1601005)

作者简介:楚美云,女,华南理工大学在读硕士研究生。

通信作者:杨继国(1977—),男,华南理工大学教授级高级工程师,博士。E-mail: yangjg@scut.edu.cn

收稿日期:2019-11-01

主成分分析(PCA)和正交最小偏二乘判别分析(OPLS-DA)对其进行多元统计分析、识别差异代谢物,分析短肽、磷脂和丙酰辅酶 A(CoA)等代谢物的变化以探究浑浊红球菌 PD630 对正丙醇的应激机制;同时采用气相色谱仪测定脂肪酸的变化,为后续的深入研究提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

浑浊红球菌 PD630 (*Rhodococcus opacus* PD630, DSMZ44193);北京北纳创联生物技术研究院。菌种保藏于体积浓度为 25% 的甘油溶液中, -80 °C 冰箱冻存。

1.2 主要仪器

高压蒸汽灭菌锅:SQ510C 型,广州科朋科学仪器有限公司;

振荡培养箱:ZQLY-180S 型,上海知楚仪器有限公司;

医用型洁净工作台:AIRTECH SW-CJ-2FD 型,苏州安泰空气技术有限公司;

气相色谱仪:GC-2010PlusAF 型,岛津企业管理(中国)有限公司;

超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱仪:TripleTOF® 6600 型,美国 AB Sciex 公司;

-80 °C 超低温冰箱:DW-86L578J 型,广州科晓科学仪器有限公司。

1.3 主要培养基

NB 培养基配方:牛肉膏粉 3.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,氯化钠 5.0 g/L,最终 pH 7.4±0.2,250 mL 三角瓶,装液量为 50 mL;

对照组发酵培养基配方:葡萄糖 12 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9 g/L, 尿素 0.6 g/L, FeNaEDTA 5 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg/L, H_3BO_3 0.3 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mg/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 mg/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 mg/L^[14-15];

试验组发酵培养基配方:在对照组发酵培养基的基础上添加体积分数 1% 正丙醇;

配置后装入 250 mL 三角瓶,装液量为 100 mL。其中对照组和试验组每组 6 个生物学重复。以上培养基均在 121 °C, 20 min 条件下灭菌,冷却备用。

1.4 培养方法

(1) 种子培养:将菌种接入上述种子培养基,在温度为 30 °C、转速为 160 r/min 的摇床上培养 24 h,即为种子液。

(2) 发酵培养:接种量 1%,培养温度和转速分别为 30 °C、160 r/min。分别在 48 h(对应于指数期)和 72 h(对应于稳定期)取样,液氮淬灭,并置于 -80 °C 冰箱备用。

1.5 GC 测定脂肪酸

发酵培养 84 h 后,收集菌体、破壁提油。具体步骤:称

取 1 g 湿菌体置于 10 mL 提脂瓶中,加入 4 mL 3 mol/L 盐酸、2 mL 正己烷,振荡 30 s 充分混匀;然后沸水浴煮 5 min,边煮边振荡;冷却至室温,离心($5\,000 \times g$, 5 min),收集正己烷层(上层)^[16]。再对试样进行甲酯化^[17],分析脂肪酸组成。色谱柱为 HP-88 (100 m × 0.32 mm, 0.22 μm),FID 检测器,检测器温度 270 °C,汽化室温度 250 °C,分流比 20:1,进样体积 2 μL,载气 N_2 。程序升温设置:180 °C 保持 5 min,以 2 °C/min 的速度提高到 220 °C,保持 20 min^[18]。以 37 种脂肪酸甲酯混合标准品的保留时间为标准进行定性分析,由相对质量校正因子来修正的峰面积归一化法进行计算脂肪酸的含量。

1.6 UPLC-MS 分析

使用超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱(UPLC-Triple-TOF/MS)对样品进行分析。色谱柱:Waters UPLC BEH C_{18} 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)。流动相 A 为体积比 1:1 乙腈-异丙醇溶液(含 0.1% 甲酸),流动相 B 为水(含 0.1% 甲酸)。梯度洗脱,洗脱程序:0 min, 5% A; 3 min, 20% A; 9 min, 95% A; 13 min, 95% A; 14 min, 5% A; 16 min, 5% A。柱温 40 °C,进样体积 5 μL。质谱条件:离子源温度 120 °C;载气流量 900 L/h;电喷雾毛细管电压 1.0 kV;进样电压 40 V;质谱扫描范围(m/z) 50~1 000;分辨率 30 000^[11]。

1.7 数据处理与统计分析

将 UPLC-Triple-TOF/MS 获得的原始数据导入代谢组学处理软件 Progenesis QI (Waters Corporation, Milford, USA)对数据进行预处理。然后将预处理后的数据集导入 ropls 软件(Version1.6.2)中进行处理,并在 Majorbio I-Sanger 云平台(<https://www.i-sanger.com>)对数据进行 PCA 以及 OPLS-DA 分析。同时在 Majorbio I-Sanger 云平台(<https://www.i-sanger.com>)结合 OPLS-DA 模型的 VIP 值 ≥ 1 和 P 值 ≤ 0.05 确定样品之间的显著差异代谢物^[19]。

原始数据用代谢组学处理软件 Progenesis QI 进行搜索鉴定,将一级质谱(MS)和二级质谱(MS/MS)信息与代谢数据库进行匹配。其中主要数据库为 <https://metlin.scripps.edu/>; <http://www.hmdb.ca/> 等公共数据库以及 Majorbio I-Sanger 云平台(<https://www.i-sanger.com>)的自建数据库。

1.8 数据分析

用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA),每组重复 3 次。P 值 < 0.05 时,认为是具有显著性差异。数据表示为(平均值 ± 标准偏差)。

2 结果与分析

2.1 脂肪酸组成

为了进一步印证正丙醇能够提高浑浊红球菌 PD630 所产油脂中奇数碳脂肪酸的百分含量,分析了体积分数

1%正丙醇添加量下菌油的脂肪酸组成,结果见表 1。正丙醇的添加对油脂的脂肪酸含量影响较大。体积分数 1%正丙醇使奇数碳脂肪酸的含量从 32.91%提高至 79.66%,提升了 46.75%。主要的奇数碳脂肪酸为 $C_{15:0}$ (38.42%)、 $C_{17:0}$ (17.56%) 和 $C_{17:1}$ (23.68%)。Zhang 等^[11]研究表明向培养基中添加体积分数 0.5%~1.5%正丙醇,奇数碳脂肪酸的含量提高了 46.7%~55.1%,与试验结果一致。

2.2 代谢组数据的统计分析

PCA 分析结果(图 1)表明在 48 h 和 72 h 试验组和对照组样本在整体分布上有分离趋势,但两个主成分对 X 累积解释率分别为 0.650 和 0.608,表明 PCA 模型的稳

定性不够高。主要原因是 PCA 是一种无监督的模式,其分类判别能力还不够强。

为了获得更好的分离模型,采用 OPLS-DA 对数据进行进一步分析。结果表明,48 h 时,模型对 X 矩阵累积解释率为 0.780,对 Y 矩阵的累积解释率为 0.991,模型预测能力良好(0.978)。72 h 样本,3 个模型的参数分别为 0.727,0.995,0.986,表明模型质量较好,模型具有良好的可靠性和预测性。此外,由图 2 可知,试验组和对照组明显分开,模型良好。

2.3 差异代谢物

由于 OPLS-DA 模型优于 PCA 方法分析的结果,故使用 OPLS-DA 模型对差异代谢物进行分析,其热图见

表 1 正丙醇对浑浊红球菌 PD630 脂肪酸组成的影响

Table 1 Effect of 1-propanol on the fatty acid profiles produced by *Rhodococcus opacus* PD630 %

脂肪酸	对照组	试验组	脂肪酸	对照组	试验组
$C_{12:0}$	0.32±0.01	0.17±0.02	$C_{17:1}$	13.90±0.90	23.68±0.38
$C_{13:0}$	0.61±0.07	2.47±0.12	$C_{18:0}$	6.22±0.75	0.63±0.01
$C_{14:0}$	4.08±0.14	1.44±0.22	$C_{18:1}$	11.47±0.58	1.15±0.12
$C_{15:0}$	7.84±0.39	38.42±0.54	$C_{18:2}$	0.70±0.21	1.68±0.10
$C_{15:1}$	0.88±0.27	2.38±0.04	其他	0.34±0.09	0.86±0.09
$C_{16:0}$	31.76±0.75	7.45±0.64	饱和脂肪酸	60.52±0.68	68.15±0.10
$C_{16:1}$	11.87±0.78	2.11±0.20	不饱和脂肪酸	38.80±0.75	30.99±0.00
$C_{17:0}$	9.69±0.21	17.56±0.55	奇数碳脂肪酸	32.91±0.63	79.66±1.47

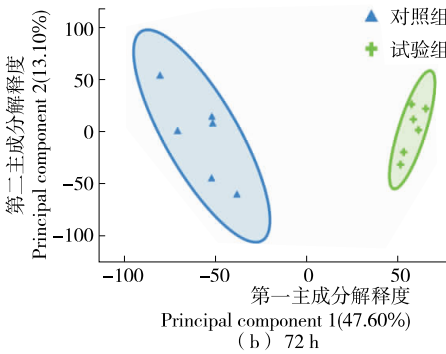
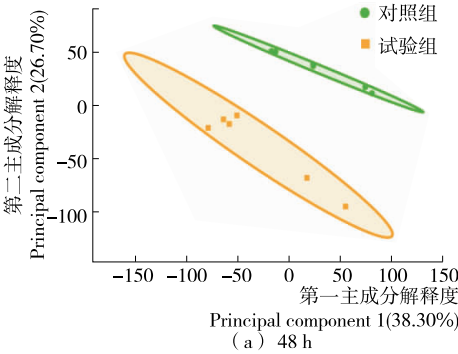


图 1 试验组和对照组各样品在 48 h 和 72 h 的主成分分析(PCA)

Figure 1 Principal component analysis (PCA) for the samples between test and control at 48 and 72 h

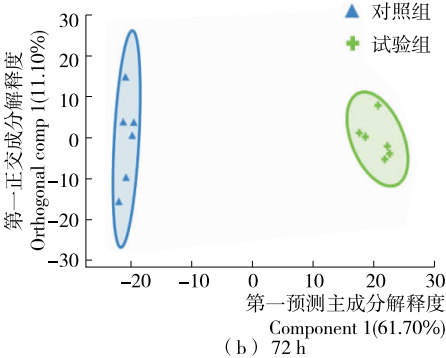
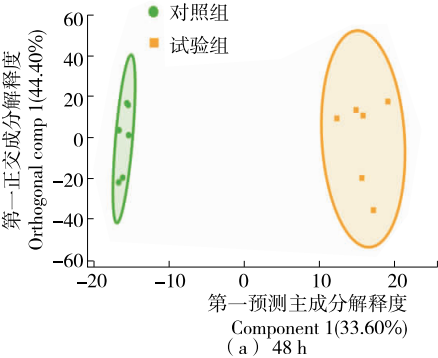


图 2 试验组和对照组各样品在 48 h 和 72 h 的正交最小偏二乘判别分析(OPLS-DA)

Figure 2 Orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) for the samples between test and control at 48 and 72 h

图 3。48 h 的样本中,试验组与对照组的差异代谢物共有 54 种;72 h 的样本中,试验组与对照组的差异代谢物有 61 种。在众多的差异代谢物中,短肽和磷脂的变化最为突出。此外,丙酰 CoA 也发生了显著变化。因此,重点分析这 3 类化合物。

在添加正丙醇后,菌体代谢物中短肽的丰度显著下降,丰度下降的短肽主要有:Gamma-Glu-Leu、Glu-Val、Glu-Met、Glu-Tyr、Glu-Trp。这些短肽均含有谷氨酸残基,谷氨酸残基是重要的鲜味物质。同时谷氨酸是已知的渗透保护剂,醇存在时,能够起到保护作用^[20-21]。实

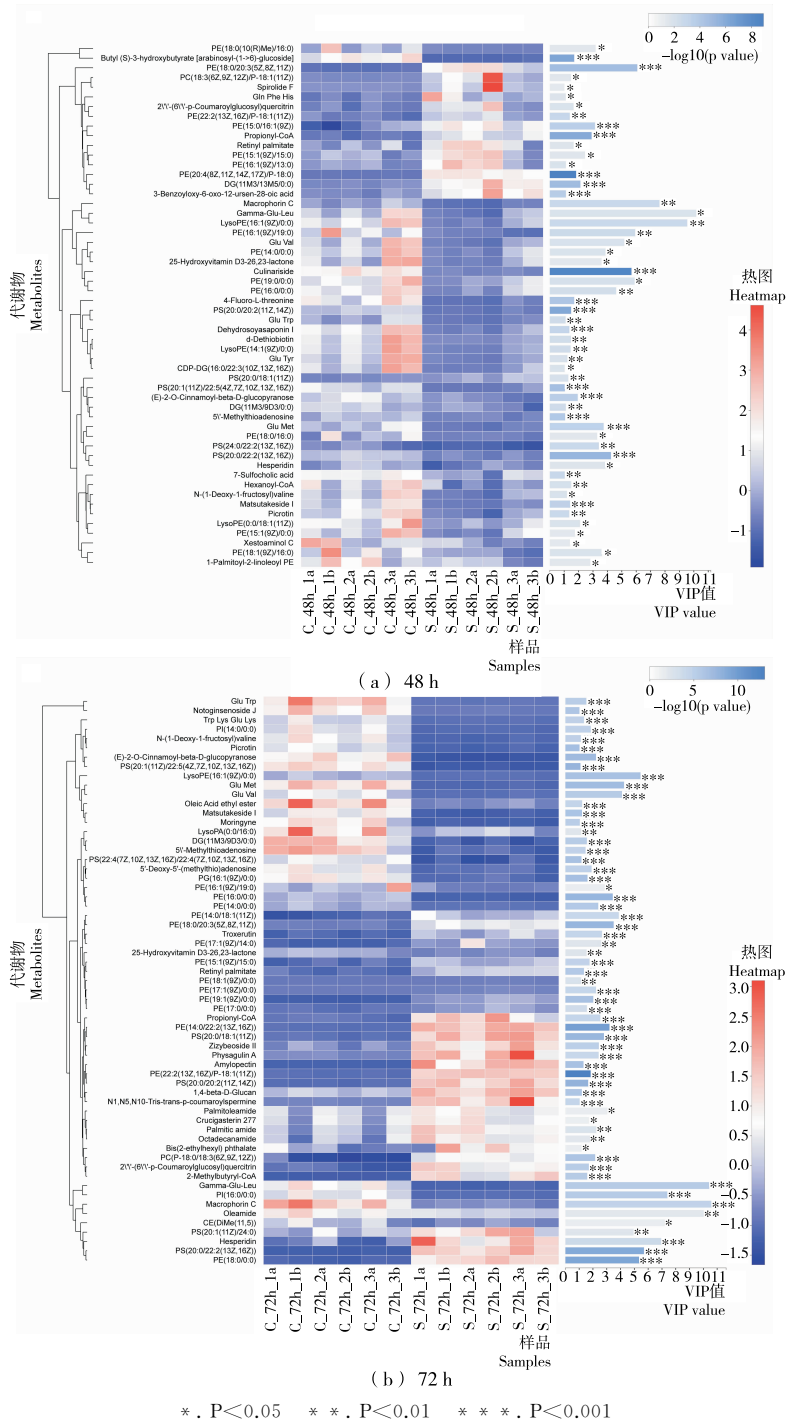


图 3 试验组与对照组差异代谢物的热图和 VIP 值分布图

Figure 3 Heat map and VIP value distribution of differential metabolites between experimental group and control group

实验室培养浑浊红球菌 PD630 时发现培养的后期有风味物质产生,推测与这些短肽有关。这些短肽可能是红球菌生长进入稳定期后产生的信号分子。另外,短肽是氨基酸合成和分解的中间代谢产物,短肽的进一步降解生成氨基酸,进而进入氨基酸代谢途径。而氨基酸代谢对于提高菌对醇的耐受性至关重要^[22]。此外,短肽降解的增加在一定程度上防止了蛋白质在溶剂激发下蛋白质聚集或错误折叠^[23-24]。试验过程中发现添加丙醇时二肽的含量显著下降,一方面可能是正丙醇抑制了某些酶,导致二肽信号分子的含量降低。另一方面,可能是菌启动了自身的应激机制,加速了蛋白质的代谢,进而提高自身对正丙醇的耐受性。

菌体代谢物中磷脂分子的不饱和度增加显著。由于磷脂是膜的主要结构组分,对细胞的活力至关重要^[25],所以对磷脂的变化进行了研究。通过对磷脂上脂肪酸的不饱和度进行分析,图 4 表明在正丙醇存在条件下磷脂分子的不饱和度增加,间接说明细胞膜的不饱和度增加。在长期暴露于醇中会改变膜中存在的饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例,这种效应主要取决于所用溶剂的碳链长度^[26]。例如文献^[27]中报道,短链($C_2 \sim C_4$)烷醇存在时,菌会增加细胞膜的不饱和脂肪酸浓度。然而,长链($C_5 \sim C_9$)烷醇会增加其饱和脂肪酸的含量^[27]。菌是通过增加不饱和脂肪酸的浓度来保护膜功能,以最小化溶剂对双层结构的影响,或通过增加饱和脂肪酸以恢复膜中的顺序^[27-28]。由于有机溶剂会使得膜的流动性发生改变,并且引起磷脂双层的稳定性降低,因此细胞的应激反应通过改变磷脂的生物合成速率和组成来补偿这种情况。此外,不同的菌暴露在不同有机溶剂中所产生的应激机制是不同的。Henderson 等^[25]通过脂质组学研究发现酵母通过改变脂质组成来减轻乙醇的胁迫作用。而 Nielsen 等^[29]发现溶血性葡萄球菌和芽孢杆菌 ORAs2 是通过增加膜流动性来适应溶剂挑战。

菌体代谢物中丙酰 CoA 的丰度上升显著。丙酰 CoA 是产生奇数碳脂肪酸的关键中间体,因为合成奇数碳脂肪酸的主要起始底物是丙酰 CoA。由图 5 可知,正丙醇的加入使得丙酰 CoA 的丰度增加。以二碳单位的形式来对脂肪酸链进行延长是脂肪酸合成的方式。当以丙酰 CoA 为起始底物每经一个循环延伸两个碳原子单元,所以最终生成的脂肪酸为奇数碳脂肪酸。例如在丙酰 CoA 的基础上经过 6 或 7 个循环时,最终分别产生 $C_{15:0}$ 和 $C_{17:0}$ ^[30-31]。所以由丙酰 CoA 的丰度增加可以推断奇数碳脂肪酸的合成将增加,与表 1 中脂肪酸的结果相吻合。表明正丙醇是通过影响丙酰 CoA 的丰度进而影响奇数碳脂肪酸的产生。

3 结论

采用 UPLC-Triple-TOF/MS 测定代谢物的变化,探究了红球菌 PD630 在正丙醇存在时的应激机制。并且运

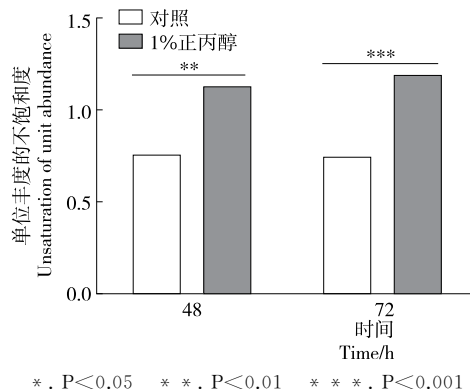


图 4 正丙醇对浑浊红球菌 PD630 磷脂上的脂肪酸不饱和度的影响

Figure 4 Effect of 1-propanol on the unsaturation degree of fatty acids on phospholipid in *Rhodococcus opacus* PD630

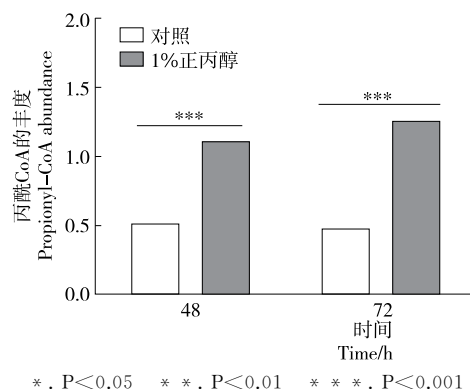


图 5 正丙醇对浑浊红球菌 PD630 中丙酰 CoA 的丰度的影响

Figure 5 Effect of 1-propanol on the abundance of propionyl-CoA in *Rhodococcus opacus* PD630

用气相色谱对添加正丙醇的菌油的脂肪酸组成及含量进行了分析。结果表明:应激机制主要表现在短肽减少、细胞膜磷脂的不饱和度增加且丙酰 CoA 出现显著性的增加;奇数碳脂肪酸的含量从 32.91% 提高到 79.66%。但试验仍然还存在着一些问题有待解决,如在基因水平上解释该应激机制。

参考文献

- [1] KUROSAWA K, BOCCAZZI P, ALMEIDA N M D, et al. High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 147(3): 212-218.
- [2] 柏大林. 浑浊红球菌脂质合成底物的代谢调控机理[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 12.
- [3] 黄露玄. 硫酸酯酶对浑浊红球菌 PD630 脂肪酸合成的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2016: 9.

- [4] 李金花. 浑浊红球菌脂质积累机制的初步探讨[D]. 长沙: 中南大学, 2012: 31.
- [5] 张冬冬, 赵利娜, 咎新艺, 等. 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶在产油细菌浑浊红球菌 PD630 脂质积累中的作用[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(3): 61-68.
- [6] ALVAREZ H M, MAYER F, FABRITIUS D, et al. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630[J]. Archives of Microbiology, 1996, 165(6): 377-386.
- [7] FEI Qiang, WEWETZER S J, KUROSAWA K, et al. High-cell-density cultivation of an engineered *Rhodococcus opacus* strain for lipid production via co-fermentation of glucose and xylose[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(4): 500-506.
- [8] PLAGGENBORG R, OVERHAGE J, LOOS A, et al. Potential of *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2006, 72(4): 745-755.
- [9] BHATIA S K, GURAV R, CHOI T R, et al. A clean and green approach for odd chain fatty acids production in *Rhodococcus* sp. YHY01 by medium engineering[J]. Bioresource Technology, 2019, 286: 121383.
- [10] XU Chang-zhi, WU Peng-fei, GAO Jia-jia, et al. Heptadecanoic acid inhibits cell proliferation in PC-9 non-small-cell lung cancer cells with acquired gefitinib resistance[J]. Oncology reports, 2019, 41(6): 3 499-3 507.
- [11] ZHANG Ling-shang, XU Pei, CHU Mei-yun, et al. Using 1-propanol to significantly enhance the production of valuable odd-chain fatty acids by *Rhodococcus opacus* PD630[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(11): 164.
- [12] HUFFER S, CLARK M E, NING J C, et al. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2011, 77(18): 6 400-6 408.
- [13] DUNLOP M J. Engineering microbes for tolerance to next-generation biofuels[J]. Biotechnology for Biofuels, 2011, 4(1): 32.
- [14] GOSWAMI L, NAMBOODORI M M T, KUMAR R V, et al. Biodiesel production potential of oleaginous *Rhodococcus opacus* grown on biomass gasification wastewater[J]. Renewable Energy, 2017, 105: 400-406.
- [15] LEE E H, CHO K S. Effect of substrate interaction on the degradation of methyl tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene by *Rhodococcus* sp[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 167(1/2/3): 669-674.
- [16] 里伟, 杜伟, 李永红, 等. 生物酶法转化酵母油脂合成生物柴油[J]. 过程工程学报, 2007, 7(1): 137-140.
- [17] SHINN S, LIYANAGE R, LAY J, et al. Improved fatty acid analysis of conjugated linoleic acid rich egg yolk triacylglycerols and phospholipid species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(28): 6 608-6 615.
- [18] SAHARI M, FARAHANI F, SOLEIMANIAN Y, et al. *n*-3 Fatty acid distribution of commercial fish species components[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2013, 90(8): 1 167-1 178.
- [19] LIU Chang, WU Hao, LIU Shu-jie, et al. Dynamic alterations in yak rumen bacteria community and metabolome characteristics in response to feed type[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1 116.
- [20] RUTHERFORD B J, DAHL R H, PRICE R E, et al. Functional genomic study of exogenous *n*-butanol stress in *Escherichia coli* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(6): 1 935-1 945.
- [21] DIEZ-GONZALEZ F, KARABRAHIMOGLU Y. Comparison of the glutamate-, arginine-and lysine-dependent acid resistance systems in *Escherichia coli* O157:H7[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 96(6): 1 237-1 244.
- [22] WANG Jiang-xin, CHEN Lei, TIAN Xiao-xu, et al. Global metabolomic and network analysis of *Escherichia coli* responses to exogenous biofuels[J]. Journal of Proteome Research, 2013, 12(11): 5 302-5 312.
- [23] MA Meng-gen, LIU Z Lewis. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2010, 87(3): 829-845.
- [24] SAMUEL D, KUMAR T K, GANESH G, et al. Proline inhibits aggregation during protein refolding [J]. Protein Science, 2010, 9(2): 344-352.
- [25] HENDERSON C M, BLOCK D E. Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(10): 2 966-2 972.
- [26] INGRAM L O. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1977, 33(5): 1 233-1 236.
- [27] WEBER F J, BONT J A M D. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes, 1996, 1 286(3): 225-245.
- [28] SEGURA A, MOLINA L, FILLET S, et al. Solvent tolerance in Gram-negative bacteria[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(3): 415-421.
- [29] NIELSEN L E, KADAVY D R, RAJAGOPAL S, et al. Survey of extreme solvent tolerance in gram-positive cocci: Membrane fatty acid changes in *Staphylococcus haemolyticus* grown in toluene [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5 171-5 176.
- [30] INGRAM L O, CHEVALIER L S, GABBA E J, et al. Propionate-induced synthesis of odd-chain-length fatty acids by *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1977, 131(3): 1 023-1 025.
- [31] POH KUAN C, BURJA A M, HELIA R, et al. Proteome analysis of *Sulfolobus solfataricus* P2 propanol metabolism[J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(4): 1 430-1 439.