



β-丙氨酸补充对厚壳贻贝代谢组的影响

王春月, 潘 晨, 廖 智, 范美华, 严小军*

(浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 海洋生物蛋白质工程研究室, 浙江 舟山 316022)

摘要: 为了确定 β-丙氨酸对贻贝代谢物的影响及其可能的代谢模式, 本实验利用液相色谱—飞行时间质谱法对厚壳贻贝在 β-丙氨酸补充后的代谢物组成及含量变化进行分析。结果显示, 注射 β-丙氨酸后厚壳贻贝组织代谢物发生明显变化。从中共筛选出 60 种差异代谢物。上述代谢物主要参与半乳糖代谢、果糖和甘露糖代谢、碳水化合物的消化与吸收以及氨基酸代谢等通路。研究表明, β-丙氨酸补充能有效提升厚壳贻贝能量代谢水平, 增加肌肽及部分氨基酸含量。进一步利用氨基酸分析仪验证厚壳贻贝全组织游离氨基酸和肌肽在 β-丙氨酸补充后的变化趋势, 其结果与代谢组研究结果基本一致。上述结果为 β-丙氨酸对贻贝代谢调节及其机制的研究奠定了基础, 同时为提升贻贝养殖效率和营养价值方面的研究提供了新的思路和手段。

关键词: 厚壳贻贝; 肌肽; β-丙氨酸; 代谢组学

中图分类号: Q 517; S 968.31

文献标志码: A

肌肽 (carnosine) 是广泛分布于生物体内且具有重要生理活性的二肽化合物, 由 β-丙氨酸和 L-组氨酸缩合而成, 主要分布于生物骨骼肌组织^[1]。肌肽具有重要而广泛的生理作用, 除了作为缓冲液维持细胞酸碱平衡之外, 还具有神经保护^[2-3]、抗氧化、抗糖化^[4-7]和抗痛风^[8]等药理作用。因此, 肌肽在糖尿病、心血管疾病和营养学等领域具有重要的研究价值^[9-11]。

作为肌肽合成的一种前体分子, β-丙氨酸是生物中唯一存在的 β 型氨基酸, 在生物体内通常由肝脏产生或通过食物摄取, 属于非必须氨基酸, 不参与蛋白质的合成^[12-13]。由于 β-丙氨酸在体内参与了肌肽合成, 因此, β-丙氨酸补充 (β-alanine supplementation) 可作为一种提升运动能力和抗疲劳的营养补剂, 具有重要的生理及药理学作用^[12-13]。例如, β-丙氨酸补充可使人体肌肉

中肌肽含量增加 40%~100%, 有助于增加肌肉对无氧酵解过程中 H⁺堆积的缓冲能力, 延缓运动疲劳, 提高人体的运动能力和运动表现^[14-15]。此外, β-丙氨酸补充可以提升家禽的肌肽含量, 改善生长性状, 提高组织抗氧化性以及肉的品质^[16-18]; 而在水生生物中, β-丙氨酸补充可显著提高鱼类的生长速率和摄食率^[19]。因此, β-丙氨酸补充在农业经济动物养殖中可作为提升养殖效率和营养价值的一种重要手段。

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 是我国东部沿海最重要的经济物种之一。贻贝富含多种营养物质, 包括蛋白质、多糖、氨基酸、活性脂肪酸以及维生素等^[20], 被人们誉为“海中鸡蛋”。目前, 贻贝已在我国东部海域形成大规模养殖, 2017 年养殖产量已近 100 万 t (2018 年《中国渔业统计年鉴》)。其中, 厚壳贻贝在我国浙江省资源

收稿日期: 2020-04-21 修回日期: 2020-06-01

资助项目: 国家自然科学基金 (31671009); 舟山市科技局项目 (2019F12004); 浙江省一流学科建设开放基金

第一作者: 王春月 (照片), 从事海洋生物学研究, E-mail: 1223832182@qq.com

通信作者: 严小军, E-mail: yanxj@zjou.edu.cn



丰富,尤其在舟山海域,厚壳贻贝是一种重要的海洋经济物种。但是随着贻贝工厂化养殖的推广,也逐渐显现出养殖贻贝生长速率慢、营养价值下降的问题。因此,如何推动贻贝养殖业的发展,提升养殖效率和养殖品种的经济价值成为目前贻贝经济发展的重要课题。目前对肌肽的研究主要在畜禽类^[21]、哺乳类^[22]及部分高经济价值的洄游性鱼类^[23],但在水产无脊椎动物中,肌肽相关研究尚未见报道。为了解 β -丙氨酸对贻贝代谢过程的影响,利用代谢组学的技术手段,通过后闭壳肌注射方式对厚壳贻贝进行 β -丙氨酸补充,并研究和分析了厚壳贻贝注射 β -丙氨酸后,其组织代谢物变化及其代谢模式以及全组织游离氨基酸和肌肽的含量变化。上述研究不仅为了解 β -丙氨酸补充对贻贝代谢组的影响及其分子调节机制提供了科学依据,也为贻贝的养殖技术发展提供了新的思路。

1 材料与amp;方法

1.1 厚壳贻贝的采集与组织样本的处理

成年野生厚壳贻贝采自浙江舟山东极岛海域。以洁净海水饲养于恒温(25℃)水族箱中; β -丙氨酸[生工生物工程(上海)股份有限公司]预先以去离子水配制成0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$;采取后闭壳肌注射方式,每只贻贝注射10 μL (实验组),以注射去离子水为对照组,每组设置6个平行。注射12 h后,取贻贝全组织,迅速置于液氮中冷冻。之后于-80℃冰箱保存备用。

取厚壳贻贝全组织样本,加入预冷沉淀剂(甲醇:乙腈:纯水=2:2:1)和钢珠后置入研磨机中研磨(60 Hz, 4 min, 4℃);研磨后对样本冰浴超声(80 Hz, 10 min, 4℃);-20℃静置120 min;离心(25 000 $\times g$, 4℃, 15 min);上清液冷冻干燥后加入10%甲醇溶液复溶;冰浴超声(80 Hz, 10 min, 4℃)后离心(25 000 $\times g$, 4℃, 15 min),取上清液上机分析。

1.2 超高效液相色谱—串联质谱(UPLC-MS/MS)分析

采用超高压液相色谱(Acquity UPLC, Waters, UK),结合HSS T3反相柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm , Waters, UK)对组织提取样品进行色谱分离,色谱柱柱温设置为50℃,流速为0.4 mL/min,

其中流动相A为水(含0.1%甲酸),流动相B为甲醇(含0.1%甲酸)。对代谢物采用以下梯度进行洗脱:100% A液洗脱2 min; B液比例9 min内从0上升到100%; 100% B液洗脱2 min; A液比例2 min内从0上升到100%。

对色谱柱洗脱组分利用高分辨串联质谱Xevo G2-XS QTOF (Waters, UK)分别进行正离子模式(Positive, POS)和负离子模式(Negative, NEG)采集数据。正离子模式下,毛细管电压和锥孔电压分别为3.0 kV和40.0 V。负离子模式下,毛细管电压及锥孔电压分别为2.0 kV和40.0 V,采用全信息串联模式进行centroid数据采集,一级扫描范围为50~1 200 u,扫描时间为0.2 s,对所有母离子按照20到40 eV的能量进行碎裂,采集所有的碎片信息,扫描时间为0.2 s。在数据采集过程中,对质谱信号每3 s进行实时质量校正。使用Progenesis QI version 2.2数据分析软件对质谱数据进行了峰对齐、峰提取、归一化、去卷积和化合物鉴定等分析,其中,正离子模式的离子化加合离子为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 、 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 等;负离子模式的加合离子为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{Cl}]^-$ 和 $[\text{M}+\text{FA}-\text{H}]^-$ 等。质量偏差均设置为10 mg/L。使用metaX^[24]软件进行数据预处理,之后对数据进行过滤。

1.3 氨基酸含量测定

利用氨基酸分析仪对厚壳贻贝开展 β -丙氨酸注射前、后全组织游离氨基酸分析。取厚壳贻贝全组织样本(3个平行组)在液氮中进行研磨至粉末状;加入去离子水后进一步匀浆处理;匀浆液进行超声破碎(10 min, 功率:200~300 W);之后离心(4℃, 9 000 $\times g$, 20 min),取上清液超滤(截留分子量3 ku);收集过滤液再经0.22 μm 水相滤膜过滤,冷冻干燥后的冻干粉末以盐酸(0.02 mol/L)稀释后进行氨基酸分析仪(LA8080, 日本日立公司)上机分析。采用铝离子交换树脂柱(4.6 mm \times 60.0 mm)进行样品分离;氨基酸标准为日本日立公司标准氨基酸混合液(B型和AN-II型);反应柱为热传导膜不锈钢柱4.6 mm \times (42.5 mm+42.5 mm);交换柱柱温50℃,反应柱柱温135℃;缓冲液流速0.4 mL/min;茚三酮流速0.35 mL/min。检测波长570 nm,检测时间150 min。

1.4 数据分析

采用单变量分析差异倍数(Fold Change)和

P 值筛选差异表达的代谢物 ($n=6$)。筛选条件为差异倍数大于 1.20 或小于 0.83 以及 P value < 0.05, 二者取交集, 获得差异离子。代谢物鉴定以及代谢物通路分析基于 KEGG 数据库。

使用软件 Progenesis QI version 2.2 和 R 软件包 metaX 对质谱数据进行统计分析。单变量分析采用 Wilcoxon 和 t 检验来确定实验组和对照组之间的代谢物差异; 多变量统计分析采用柏拉图标准化 (pareto scaling) 对数据进行 \log_2 转换和比例调整后, 分别进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)^[25-26]。

2 结果

2.1 多元统计分析结果

首先对 β -丙氨酸补充组和对照组样品进行 PCA 和 PLS-DA 分析来评估实验组和对照组之间的统计学差异。PCA 得分结果显示, 在正离子模式和负离子模式下, 实验组和对照组数据点在空间分布上明显分离, 表明 2 组间的代谢模式存在差异 (图 1-a, b)。PLS-DA 分析进一步可看出实验组和对照组数据点分别聚为一簇, 2 组数据点在空间上呈现明显分离现象, 结果显示, β -丙氨酸补充组与对照组间产生了显著差异 (图 1-c, d)。所有样本全部处于 95% 置信区间。PLS-DA 正负离子模式的模型参数分别为 $R^2=0.9494$, $Q^2=0.5839$ 和 $R^2=0.9518$, $Q^2=0.5536$ 。结果表明, 模型无过度拟合现象且稳健性良好, 可用于后续的差异成分分析。

2.2 差异代谢物筛选

利用 UPLC-MS 分析 2 组样品在 POS 和 NEG 扫描模式下的代谢物组成。共获得 18 023 个代谢峰 (POS: 9 555; NEG: 8 468)。其中, MS1 水平下共获得 6 907 个代谢峰 (POS: 3 876; NEG: 3 031); MS2 水平下共获得 3 577 个代谢峰 (POS: 1 920; NEG: 1 657)。

基于 POS 模式共鉴定到 381 个差异代谢物, 其中上调代谢物有 235 种, 下调代谢物有 146 种; 基于 NEG 模式鉴定到 309 个差异代谢物, 其中上调代谢物有 211 种, 下调代谢物有 98 种 (图 2-a, b)。从上述差异代谢物中筛选有明显差异 (Fold Change > 1.3 或 < 0.73, $P < 0.05$) 且有明确代谢通路

注释的代谢物 60 种 (其中 POS 模式 28 种, NEG 模式 32 种, 表 1), 并在此基础上构建差异代谢物聚类分析热图 (图 3)。结果显示, 注射 β -丙氨酸组有 45 种代谢物上调 (POS 模式 20 种, NEG 模式 25 种); 15 种代谢物下调 (POS 模式 9 种, NEG 模式 6 种)。这些差异显著的代谢物包括碳水化合物代谢物 (麦芽糖、乳糖、蔗糖、葡萄糖和果糖等)、氨基酸及其衍生物 (丝氨酸、半胱氨酸、 β -丙氨酸、谷氨酰胺和 α -酮戊二酸等)、脂类代谢物 (光甾醇、2-2-花生四烯酸和甘油等) 和其他代谢物 (山地谷碱和阿司咪唑) (表 1)。其中实验组与对照组相比, 上调的有乳糖、葡萄糖、蔗糖和丝氨酸等; 下调的代谢物有半胱氨酸、 α -酮戊二酸和谷氨酰胺等。

2.3 差异代谢物的代谢途径分析

为了解注射 β -丙氨酸后厚壳贻贝差异代谢物的代谢通路的影响, 将差异代谢物导入 KEGG 数据库进行代谢通路富集分析, 共计富集到 134 (POS 模式) 和 113 条 (NEG 模式) 代谢通路。其中, 60 种代表性差异代谢物富集到 25 条代谢途径 (图 4-a, b)。其中, 差异代谢物较多的通路包括半乳糖代谢、氨基酸的生物合成、 β -丙氨酸代谢、精氨酸生物合成、谷胱甘肽代谢、果糖和甘露糖代谢、碳水化合物的消化与吸收途径等, 富集到的差异代谢物见表 2。

2.4 β -丙氨酸代谢通路分析

β -丙氨酸代谢通路结果显示, 上调的代谢物有 β -丙氨酸、肌肽、(R)-泛酸、精胺和 3-羟基-丙酸; 下调的代谢物为尿嘧啶。 β -丙氨酸在肌肽合酶 (CRNS1; EC: 6.3.2.11) 催化下与组氨酸结合形成肌肽 (图 5)。

2.5 氨基酸分析仪测定结果

注射 β -丙氨酸后厚壳贻贝全组织游离氨基酸的测定结果显示, 在注射 β -丙氨酸 12 h 后, 实验组与对照组相比有 19 种氨基酸含量发生变化 (表 3)。相比对照组, 厚壳贻贝在注射 β -丙氨酸后, 半胱氨酸含量明显下降, 肌肽和丝氨酸含量明显上升 (图 6), 与代谢组学分析结果 (表 2) 基本一致。

3 讨论

基于液质联用技术的代谢组学研究是目前

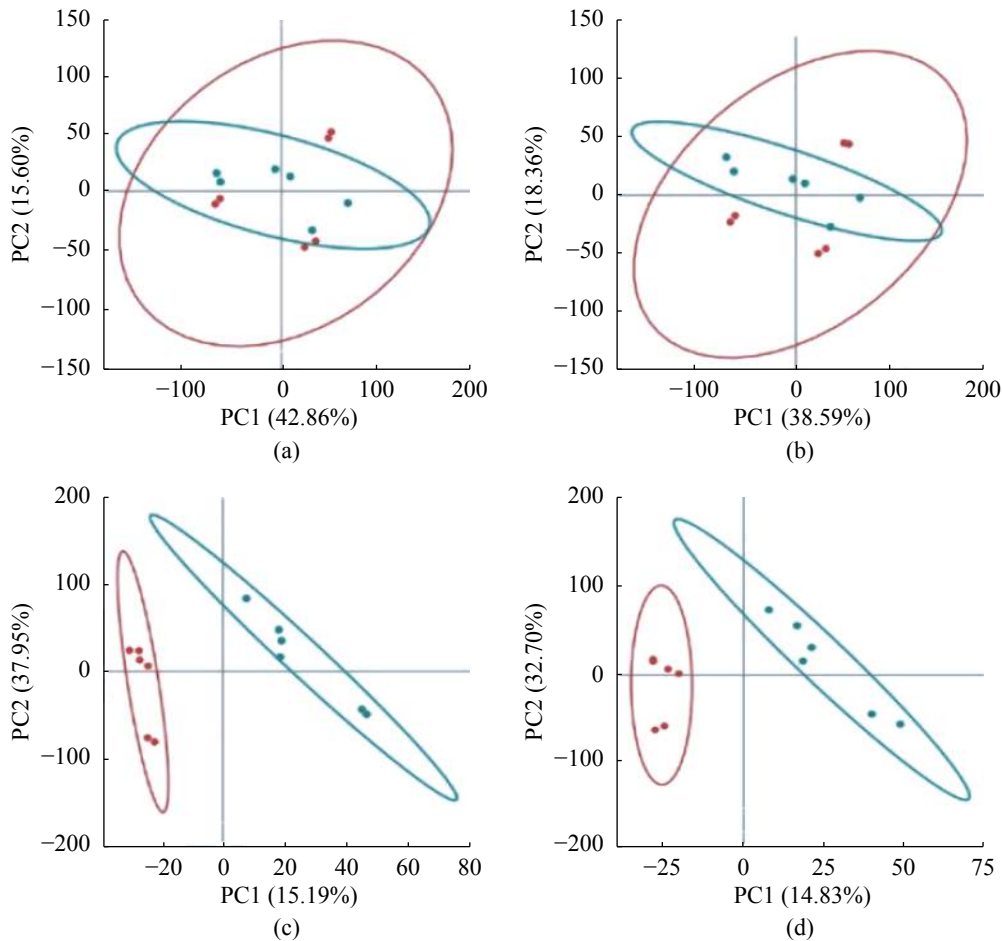


图 1 厚壳贻贝注射 β -丙氨酸后对照组和实验组的 PCA 和 PLS-DA 得分图

(a) 基于 POS 的 PCA 图, (b) 基于 NEG 的 PCA 图, (c) 基于 POS 的 PLS-DA 图, (d) 基于 NEG 的 PLS-DA 图; 蓝色圆点代表对照组, 红色圆点代表注射 β -丙氨酸的实验组; $R^2=0.949\ 4$, $Q^2=0.583\ 9$ (POS); $R^2=0.951\ 8$, $Q^2=0.553\ 6$ (NEG)

Fig. 1 After injecting β -alanine into *M. coruscus*, PCA and PLS-DA model score scatter plot of the control group and the experimental group

(a) PCA graph based on POS, (b) PCA graph based on NEG, (c) PLS-DA graph based on POS, (d) PLS-DA graph based on NEG; blue dots represent the control group, red dots represent the injection of experimental groups of β -alanine; $R^2=0.949\ 4$, $Q^2=0.583\ 9$ (POS); $R^2=0.951\ 8$, $Q^2=0.553\ 6$ (NEG)

物种内源性小分子代谢物组成及其动态变化分析的主要手段, 具有高精度和高通量的特点。 β -丙氨酸补充已在人体以及其他动物体内被证明可以有效提升运动能力、促进食欲、抗疲劳和抗氧化等效果, 因而在医学、药学、食品以及农业养殖方面具有重要的应用前景。目前 β -丙氨酸补充在水产养殖中的报道尚不多见。尽管在鲤 (*Cyprinus carpio*) 和鲈属 (*Pleuronectes*) 中, β -丙氨酸补充可显著增加鱼类的生长速率和摄食率^[19, 27], 但相关机制尚不明确。厚壳贻贝作为我国东部海域重要的养殖品种, 目前尚无 β -丙氨酸对贻贝生理生化方面影响的相关研究报道。为了解 β -丙氨酸对厚壳贻贝代谢的影响, 采用液质

联用手段, 对厚壳贻贝后闭壳肌注射 β -丙氨酸前后内源性小分子代谢物的组成变化进行了分析。研究表明, β -丙氨酸注射后, 厚壳贻贝组织的代谢物发生明显变化, 主要表现为糖代谢和氨基酸代谢物的变化。

目前已知内源性 β -丙氨酸可通过 6 种生物合成途径产生^[16, 28-32], 分别为嘧啶代谢途径、泛酸/CoA 途径、肠道微生物途径、天冬氨酸/谷氨酸代谢途径、精氨酸/脯氨酸途径以及丙酸/脂肪酸途径。这些内源性途径可在生物体内合成 β -丙氨酸, 此外, 上述通路也具有降解 β -丙氨酸和维持 β -丙氨酸水平的能力。 β -丙氨酸注射后, 发现厚壳贻贝的嘧啶代谢途径中尿苷酸、胸腺嘧啶、

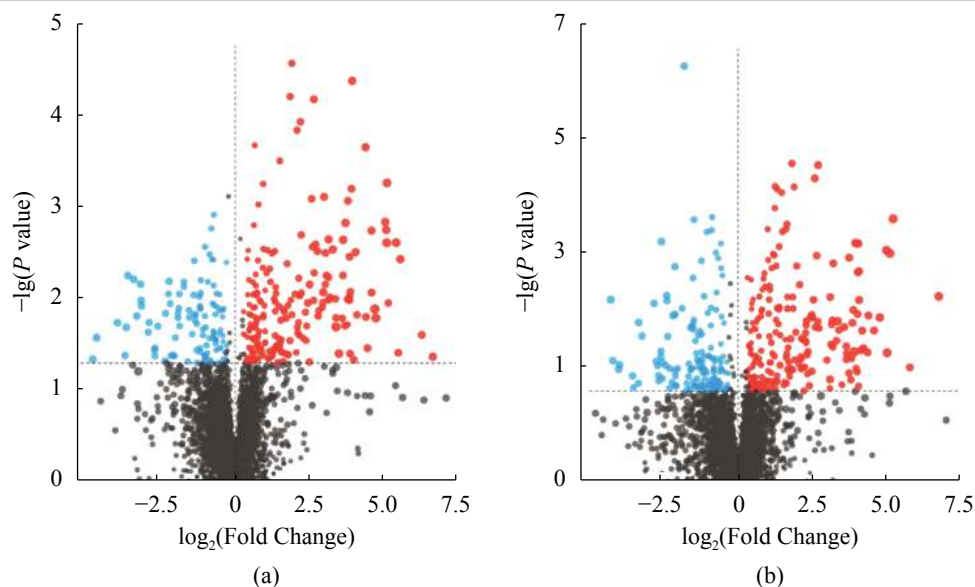


图 2 差异代谢物火山图

(a) 和 (b) 分别为 POS 模式和 NEG 模式, 在火山图中, 每个点代表一种代谢物, 点大小代表 PLS-DA 模型中代谢物的 VIP(差异权重贡献)值; 红色圆点. 代谢物显著上调, 蓝色圆点. 代谢物显著下调, 灰色圆点. 无显著差异代谢物

Fig. 2 Volcano plots of differential metabolites

(a) and (b) were derived from POS and NEG, respectively, in the volcano plot, each point represents a metabolite, and the point size represents the VIP value of this metabolite in the PLS-DA model; red dots indicate significantly up-regulated metabolites, blue dots indicate significantly down-regulated metabolites, gray dots indicate no significant difference between the two groups

表 1 注射 β -丙氨酸后厚壳贻贝组织中差异代谢物鉴定表Tab. 1 Identification of SDMs after β -alanine supplementation

代谢物 metabolites	模式 model	质荷比 m/z	差异倍数 Fold Change	P值 P value	差异权重 贡献值 VIP	KEGG数 数据库编号 KEGG.ID	分数 score	代谢途径 pathway
水苏糖 stachyose	POS	667.23	27.74	0.014	5.73	C01613	42.80	map00052
脂酰腺苷酸 lipoyl-AMP	POS	558.09	9.50	0.007	3.82	C16238	34.00	map00785
甘露三糖 mannantriose	POS	487.17	8.05	0.005	3.82	C05404	39.10	map00052
4-甲酰基苯磺酸盐 4-sulfobenzaldehyde	POS	204.03	5.76	0.001	3.90	C06679	39.60	map00623
腺嘌呤 adenine	POS	136.06	4.42	0.022	2.69	C00147	42.00	map00230
α -1,5-L-阿拉伯三糖 alpha-1,5-L-arabinotriose	POS	432.17	3.32	0.000	3.50	C20571	43.40	map02010
5,10-亚甲基四氢叶酸 5,10-methylenetetrahydrofolate	POS	458.18	3.10	0.019	2.85	C00143	41.10	map00260
薯蓣皂素 diosgenin	POS	437.30	2.90	0.000	2.96	C08898	39.20	map01060
肌肽 carnosine	POS	227.11	2.86	0.009	1.43	C00386	47.90	map00340
3 β -羟基-5-胆甾烯酸 3 β -hydroxy-5-cholestenoate	POS	439.32	2.48	0.003	2.56	C17333	39.50	map00120
2,3-dinor-8-iso-前列腺素 2,3-dinor-8-iso prostaglandin f1alpha	POS	346.26	1.70	0.031	1.86	C14795	35.70	map00590
顺式-2,3-二羟基-2,3-二氢-对-枯酸酯 cis-2,3-dihydroxy-2,3-dihydro-p-cumate	POS	221.08	1.60	0.002	2.03	C06579	34.10	map00622
13-脱氧卡霉素 13-deoxycarminomycin	POS	538.12	1.55	0.004	1.82	C12428	44.00	map01057
S-腺苷同型半胱氨酸 S-adenosylhomocysteine	POS	407.11	1.48	0.006	1.60	C00021	49.10	map00270
双苯醌 BPAquinone	POS	265.08	1.38	0.015	1.62	C13628	35.50	map00363
2-花生四烯酸甘油酯 2-arachidonoylglycerol	POS	401.27	1.36	0.031	1.39	C13856	39.60	map04080
核黄素 riboflavin	POS	394.17	1.35	0.049	1.14	C00255	36.00	map00740

· 续表 1 ·

代谢物 metabolites	模式 model	质荷比 m/z	差异倍数 Fold Change	P值 P value	差异权重 贡献值 VIP	KEGG数 数据库编号 KEGG.ID	分数 score	代谢途径 pathway
泛醌8 ubiquinone-8	POS	744.59	1.34	0.043	1.47	C17569	39.90	map00130
普伐他汀 pravastatin	POS	407.24	1.34	0.048	1.32	C01844	35.90	map04976
4-羟丁醇 4-oxoretinol	POS	283.20	0.73	0.005	1.35	C16683	41.20	map00830
3-羟基-2-甲基吡啶-5-羧酸盐 3-hydroxy-2-methylpyridine-5-carboxylate	POS	136.04	0.59	0.033	1.73	C01270	29.00	map00750
6-羟基-6-己内酯 6-hydroxyhexan-6-olide	POS	169.03	0.58	0.031	1.68	C03241	41.20	map00930
N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸 N6,N6,N6-trimethyl-L-lysine	POS	171.15	0.55	0.017	1.82	C03793	40.30	map00310
N-葫芦巴碱 N-methylnicotinate	POS	155.08	0.52	0.016	2.22	C01004	39.00	map00760
N-乙酰基鸟氨酸 N-acetylorntine	POS	157.10	0.40	0.043	2.12	C00437	57.10	map00220
胞嘧啶 cytosine	POS	94.04	0.25	0.030	2.70	C00380	53.80	map00240
γ-氨基-4-氰基丁酸 gamma-amino-gamma-cyanobutanoate	POS	129.07	0.20	0.002	3.63	C05715	39.90	map00460
13-二氢柔红霉素盐酸盐 13-dihydrodaunorubicin	POS	552.18	0.17	0.030	3.05	C12430	37.50	map01057
洛伐他汀酸 lovastatin acid	NEG	457.24	67.81	0.02	4.02	C21130	37.50	map00999
乌达霉素F urdamycinone F	NEG	549.17	41.78	0.00	4.75	C12410	41.20	map01057
水苏糖 stachyose	NEG	711.22	30.39	0.00	4.84	C01613	47.60	map00052
甘露三糖 mannitriose	NEG	539.14	21.77	0.00	4.55	C05404	43.20	map00052
异维生素2"-鼠李糖苷 isoswertisin 2"-rhamnoside	NEG	637.18	19.19	0.02	3.96	C12629	38.60	map00944
5-甲基-5,6,7,8-四氢甲蝶呤 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydromethanopterin	NEG	835.28	13.26	0.00	4.19	C04488	38.50	map00680
黄嘌呤 hypoxanthine	NEG	135.03	11.47	0.00	4.94	C00262	41.60	map00230
蔗糖 sucrose	NEG	377.08	9.09	0.00	4.75	C00089	39.80	map00052
水苏糖 stachyose	NEG	701.19	7.85	0.01	3.62	C01613	40.60	map00052
癸酸 decanoic acid	NEG	217.14	6.16	0.00	4.06	C01571	39.70	map00061
苦霉素 pikromycin	NEG	570.33	4.97	0.03	2.87	C11999	43.50	map00522
β-D-庚二糖基β-D-葡萄糖基酯 β-D-gentibiosyl β-D-glucosyl crocetin	NEG	849.29	4.30	0.01	2.87	C17513	26.50	map00999
脱氧胸腺单核苷酸 dTMP	NEG	321.05	4.22	0.01	3.08	C00364	38.50	map00240
异维生素2"-鼠李糖苷 isoswertisin 2"-rhamnoside	NEG	637.18	4.08	0.02	2.86	C12629	36.90	map00944
α-1,5-L-阿拉伯糖苷 alpha-1,5-L-arabinotetraose	NEG	591.18	2.83	0.04	2.84	C20572	41.80	map02010
肉桂酸酯-顺式-1,2-二乙二醇 cis-3-(3-carboxyethenyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol	NEG	217.03	2.44	0.00	2.61	C12622	39.40	map00360
L-岩藻糖 L-fuconate	NEG	215.03	2.19	0.00	2.53	C01720	39.50	map00051
普雷霉素A2' premithramycin A2'	NEG	673.22	1.87	0.00	2.14	C12385	38.40	map01057
9S-十八碳三烯酸 9(S)-HOT	NEG	293.21	1.83	0.04	1.74	C16326	56.40	map00592
二甲基环癸-3,7-二烯-1-基丙-2-烯-1-醇 germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-ol	NEG	265.18	1.67	0.03	1.91	C19676	50.90	map00909
脱氧头孢菌素C deacetoxycephalosporin C	NEG	402.09	1.64	0.01	1.77	C06565	34.90	map00311
(1R,2S,4S)-新异二氢香芹酚 (1R,2S,4S)-neoiso-dihydrocarveol	NEG	199.13	1.63	0.01	1.56	C11410	55.70	map00903
氧基-吡啶-1-基-2-羧酸酯 lampranthin II	NEG	771.19	1.55	0.02	1.67	C08552	34.70	map00965
9,12,13-松香酸 9,12,13-triHOME	NEG	329.23	1.47	0.03	1.49	C14833	47.20	map00591
β-D-庚二糖基β-D-葡萄糖基酯 trans-2-enoyl-OPC6-CoA	NEG	1012.26	1.42	0.04	1.25	C16332	32.80	map00592
他克莫司 tacrolimus	NEG	802.48	0.82	0.03	1.01	C01375	36.20	map01052
2"-N-乙酰基-6"-脱氨基-6"-羟基新霉素C 2"-N-acetyl-6"-deamino-6"-hydroxyneomycin C	NEG	702.31	0.57	0.05	1.66	C17587	34.90	map00524

· 续表 1 ·

代谢物 metabolites	模式 model	质荷比 m/z	差异倍数 Fold Change	P值 P value	差异权重 贡献值 VIP	KEGG数 数据库编号 KEGG.ID	分数 score	代谢途径 pathway
锥虫酮 trypanothione	NEG	768.30	0.51	0.02	2.03	C02090	37.60	map00480
磷脂酰乙醇胺 glycerol-3-phosphoethanolamine	NEG	794.57	0.42	0.02	2.40	C21481	35.40	map04216
西酞普兰醛 citalopram aldehyde	NEG	330.07	0.40	0.00	2.48	C16612	39.30	map00982
α -甘露糖基甘油酸 α -mannosylglycerate	NEG	267.07	0.14	0.02	3.27	C11544	39.60	map00051
反式-2-烯丙基-OPC6-辅酶 trans-2-Enoyl-OPC6-CoA	NEG	1 012.26	1.42	0.04	1.25	C16332	53.11	map00592

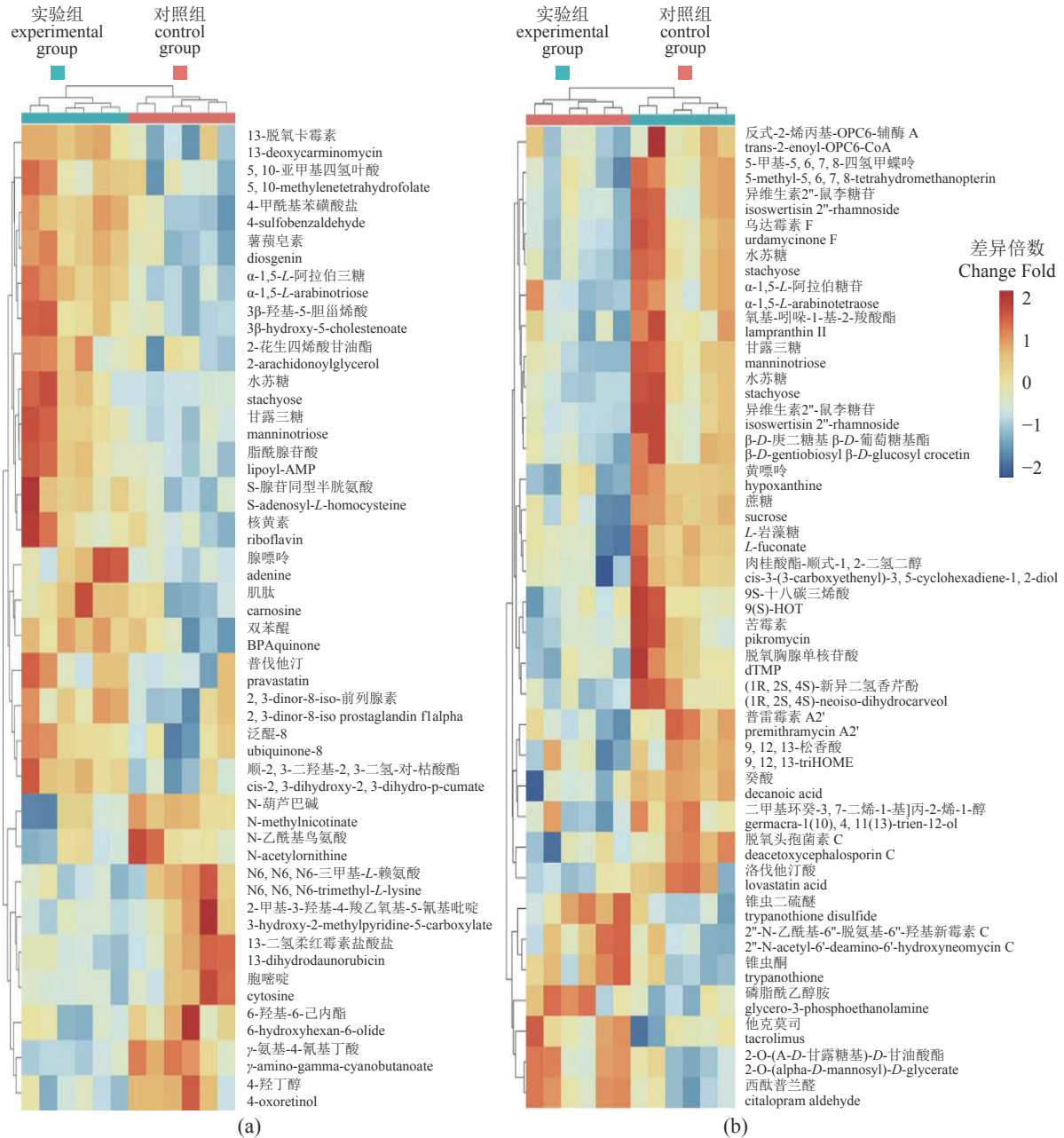


图 3 基于 POS(a) 和 NEG(b) 的显著差异代谢物的层次聚类分析热图

根据颜色尺度描述相对代谢物水平; 红色和蓝色分别表示上调和下调

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis thermal map based on SDMs from POS (a) and NEG (b)

The relative metabolite level is depicted according to the color scale; red and blue indicate up-regulation and down-regulation, respectively

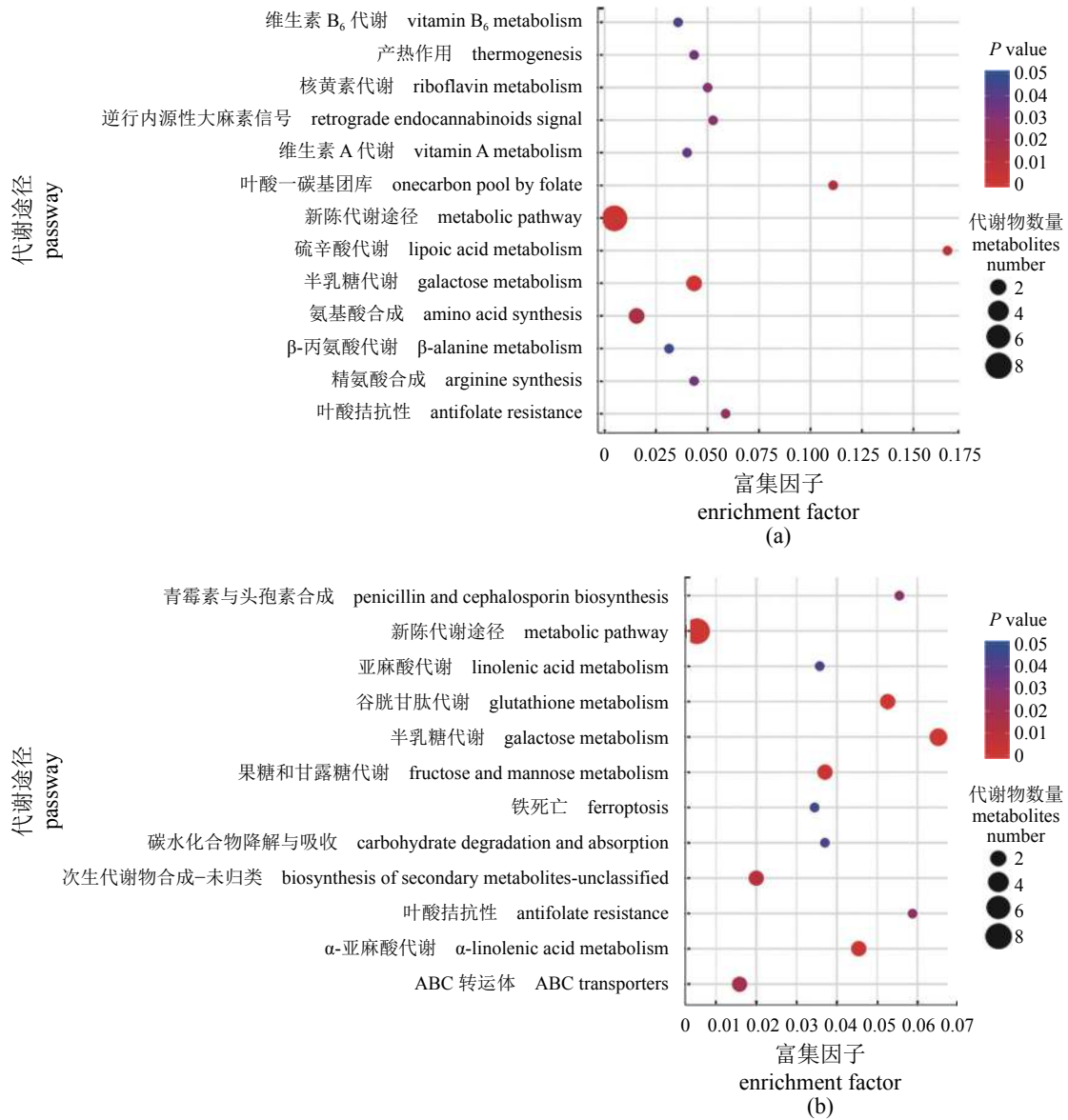


图 4 差异代谢物的通路富集统计散点图

(a) POS 模式, (b) NEG 模式; x 轴和 y 轴分别代表富集因子和富集的代谢通路; rich factor 代表差异表达的代谢物与所有注释到该代谢通路的代谢物的比值, rich factor 越大, 表示富集的程度越大; P value 为 0~0.05, 越接近于 0, 表示富集越显著

Fig. 4 Statistical scatter plot of pathway enrichment of differential metabolites

(a) POS mode, (b) NEG mode; the x-axis and y-axis represent enriched metabolic pathways and enrichment factors, respectively; rich factor refers to the ratio of differentially expressed metabolites to all metabolites annotated to this metabolic pathway; the larger the rich factor, the greater the degree of enrichment. P value, ranging from 0-0.05, the closer to 0, the more significant the enrichment

胸苷等 8 个代谢物, 以及泛酸/CoA 代谢途径中 L-半胱氨酸、2-脱氢泛酸酯和 (R)-4-脱氢泛酸酯 3 种代谢物明显下调 (P<0.01)(表 2), 表明注射 β-丙氨酸后抑制了厚壳贻贝尿嘧啶分解合成 β-丙氨酸, 也抑制了 β-丙氨酸合成的泛酸/CoA 途径。推测厚壳贻贝内源性 β-丙氨酸的合成可能主要与上述 2 种途径有关。

注射 β-丙氨酸后, 厚壳贻贝在能量代谢相关的通路, 如半乳糖代谢、果糖和甘露糖代谢以及碳水化合物的消化与吸收等通路中的多种糖类代谢物, 如乳糖、半乳糖、葡萄糖等浓度发生了明显上调 (P<0.01), 这表明贻贝在 β-丙氨酸补充后, 其对多糖的降解能力提升, 有助于提升厚壳贻贝能量代谢速率。此前有研究发现,

表 2 关键差异代谢通路及其差异代谢物变化趋势

代谢通路 pathway	显著差异代谢物 significant differential metabolites
半乳糖代谢 galactose metabolism	<i>D</i> -半乳糖 (<i>D</i> -galactose) \uparrow 、乳糖 (lactose) \uparrow 、 α - <i>D</i> -葡萄糖 (α - <i>D</i> -glucose) \uparrow 、 <i>D</i> -甘露糖 (<i>D</i> -mannose) \uparrow 、半乳糖醇 (galactinol) \uparrow 、水苏糖 (stachyose) \uparrow 、蔗糖 (sucrose) \uparrow 、甘露三糖 (mannitriose) \uparrow 、 <i>D</i> -果糖 (<i>D</i> -fructose) \uparrow
氨基酸的生物合成 biosynthesis of amino acids	6-磷酸果糖 (fructose-6P) \uparrow 、丝氨酸 (serine) \uparrow 、半胱氨酸(cysteine) \downarrow 、2-酮戊二酸 (2-oxoglutarate) \downarrow 、丙氨酸 (alanine) \uparrow 、 <i>N</i> -乙酰基鸟氨酸 (<i>N</i> -acetyl-citrulline) \downarrow
β -丙氨酸代谢 β -alanine metabolism	β -丙氨酸 (β -alanine) \uparrow 、尿嘧啶 (uracil) \downarrow 、肌肽 (carnosine) \uparrow 、(<i>R</i>)-泛酸 (<i>R</i>)-pantothenate) \uparrow 、精胺 (spermine) \uparrow 、3-羟基-丙酸 (3-hydroxy-propanoate) \uparrow
精氨酸生物合成 arginine biosynthesis	谷氨酰胺 (glutamine) \downarrow 、 <i>N</i> -乙酰基鸟氨酸 (<i>N</i> -acetyl-ornithine) \downarrow
谷胱甘肽代谢 glutathione metabolism	<i>L</i> -半胱氨酸 (<i>L</i> -cysteine) \downarrow 、亚精胺 (trypanothione) \downarrow
果糖和甘露糖代谢 fructose and mannose metabolism	<i>L</i> -山梨糖 (<i>L</i> -sorbose) \uparrow 、 α - <i>D</i> -葡萄糖 (α - <i>D</i> -glucose) \uparrow 、 <i>D</i> -甘露糖 (<i>D</i> -mannose) \uparrow 、 <i>D</i> -阿洛糖 (<i>D</i> -allose) \uparrow 、 <i>L</i> -富马酸盐 (<i>L</i> -fuconate) \uparrow
碳水化合物的消化与吸收 carbohydrate digestion and absorption	乳糖 (lactose) \uparrow 、蔗糖 (sucrose) \uparrow 、葡萄糖 (glucose) \uparrow 、半乳糖(galactose) \uparrow 、麦芽糖 (maltose) \uparrow 、麦芽三糖 (maltotriose) \uparrow 、果糖(fructose) \uparrow 、6-磷酸葡萄糖 (fructose-6P) \uparrow
嘧啶代谢 pyrimidine metabolism	β -丙氨酸 (β -alanine) \uparrow 、脱氧胸苷酸 (dTMP) \uparrow 、胸苷 (thymidine) \uparrow 、胸腺嘧啶 (thymine) \uparrow 、尿嘧啶 (uracil) \downarrow 、尿苷 (uridine) \downarrow 、3-羟基丙酸酯 (3-hydroxy-propionate) \downarrow 、假尿苷 (pseudouridine) \downarrow
泛酸和CoA代谢 pantothenate and CoA biosynthesis	β -丙氨酸 (β -alanine) \uparrow 、2-脱氢泛酸酯 (2-dehydropantoate) \downarrow 、 <i>L</i> -半胱氨酸 (<i>L</i> -cysteine) \downarrow 、(<i>R</i>)-4-脱氢泛酸酯(<i>R</i>)-4-dehydropantoate) \downarrow

注: \uparrow 和 \downarrow 分别表示差异代谢物的上调和下调
Notes: \uparrow and \downarrow indicate up-regulation and down-regulation, respectively

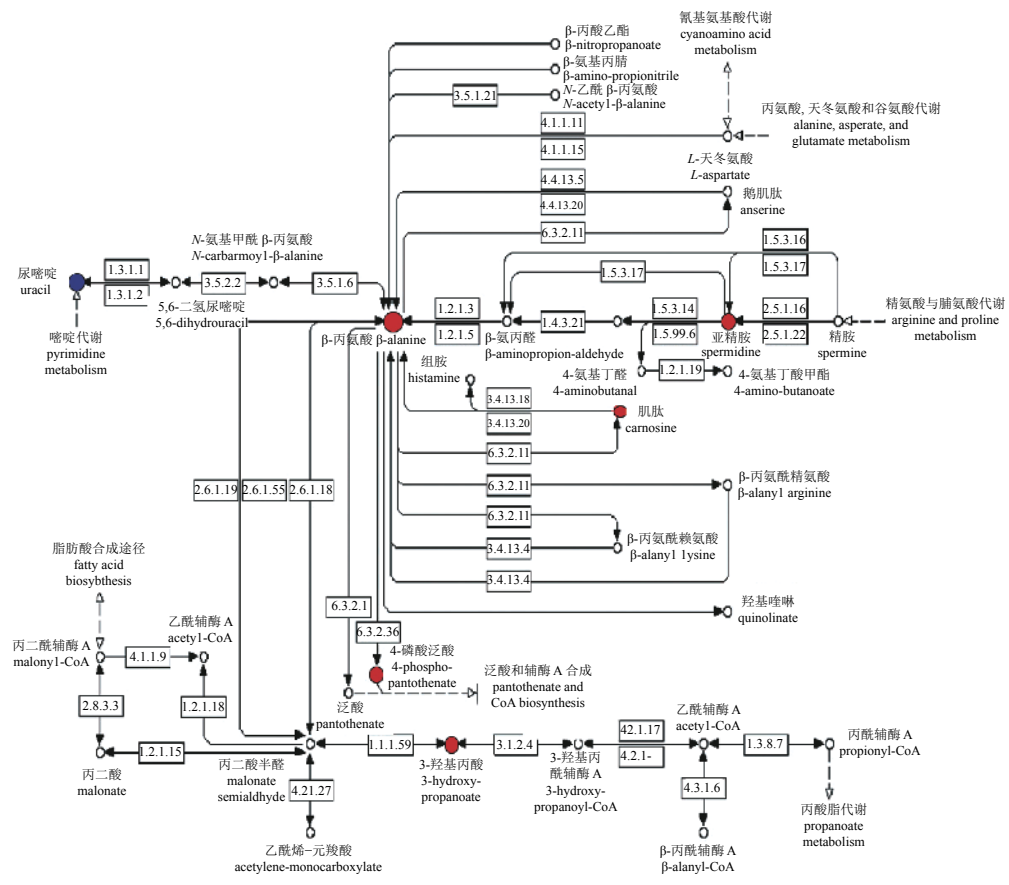


图 5 注射 β -丙氨酸后 β -丙氨酸代谢通路及其差异代谢物

红色圆点代表上调代谢物; 蓝色圆点代表下调代谢物

Fig. 5 After β -alanine injection, β -alanine metabolism pathway and its differential metabolites

Red and blue dots indicate up-regulation and down-regulation, respectively

表3 厚壳贻贝全组织在注射β-丙氨酸后氨基酸分析仪测定结果

Tab. 3 Amino acid analyzer results in whole tissue of *M. coruscus* after β-alanine injection

氨基酸 amino acid	对照组/(ng/g) control group	实验组/(ng/g) experimental group
天冬氨酸 Asp	136.2±3.1	298.8±10.3**
苏氨酸 Thr	73.1±1.3	107.6±2.9**
谷氨酸 Glu	737.8±9.1	662.4±6.4
甘氨酸 Gly	2 325.3±10.5	2 154.7±10.0
丙氨酸 Ala	1 509.0±9.6	1 553.1±4.3
缬氨酸 Val	27.9±0.9	52.8±1.4**
半胱氨酸 Cys	21.5±1.4	15.2±0.8*
甲硫氨酸 Met	27.6±0.5	45.3±2.4**
异亮氨酸 Ile	63.1±1.7	80.9±4.3*
亮氨酸 Leu	34.0±0.8	58.4±1.7*
酪氨酸 Tyr	93.9±2.3	113.2±2.4
苯丙氨酸 Phe	32.2±0.9	58.4±3.4*
赖氨酸 Lys	135.6±2.1	179.0±5.4*
组氨酸 His	152.6±1.2	188.6±1.5*
鹅肌肽 Ans	254.2±1.9	233.4±1.7
精氨酸 Arg	767.1±4.1	802.4±8.7
脯氨酸 Pro	52.7±2.0	87.9±0.9*
丝氨酸 Ser	140.9±0.9	199.4±2.6*
肌肽 Car	0.9±0.3	1.3±0.4*

注: *代表P<0.05; **代表P<0.01
Notes: *. P<0.05; **. P<0.01

高碳水化合物饲喂会促使牡蛎能量代谢水平提高,表明β-丙氨酸补充能发挥类似高碳水化合物饲喂的效果。另有研究表明,外源性β-丙氨酸的肌肽转化效率大约为3%~6%,多余的β-丙氨酸可通过氧化作为碳源提供能量^[33-37]。因此,β-丙氨酸补充具有部分替代高碳水化合物饲喂的效果。

β-丙氨酸补充导致厚壳贻贝氨基酸代谢产生明显变化,具体包括丙氨酸含量上升和半胱氨酸含量下降。在双壳贝类中,丙氨酸被认为是糖酵解通路的终产物^[38]。丙氨酸含量的上升意味着糖酵解速率的上升,同时也意味着糖原合成的速率增加^[39],这表明β-丙氨酸补充对贻贝能量代谢的促进改变了丙氨酸的含量,同时也可能为贻贝的生长提供了更丰富的糖原储存。此外,β-丙氨酸补充导致半胱氨酸含量下降以及由此导致的谷胱甘肽代谢通路下调。由于β-丙氨酸是肌肽合成的重要前体分子^[14, 40-41],且肌肽已被证明具有抗氧化活性^[42-43]。此外,注射β-丙氨酸后,厚壳贻贝肌肽含量显著上升,是对照组的2.87倍,推测由于注射β-丙氨酸后,具有抗氧化活性的肌肽浓度上升抑制了谷胱甘肽代谢通路,

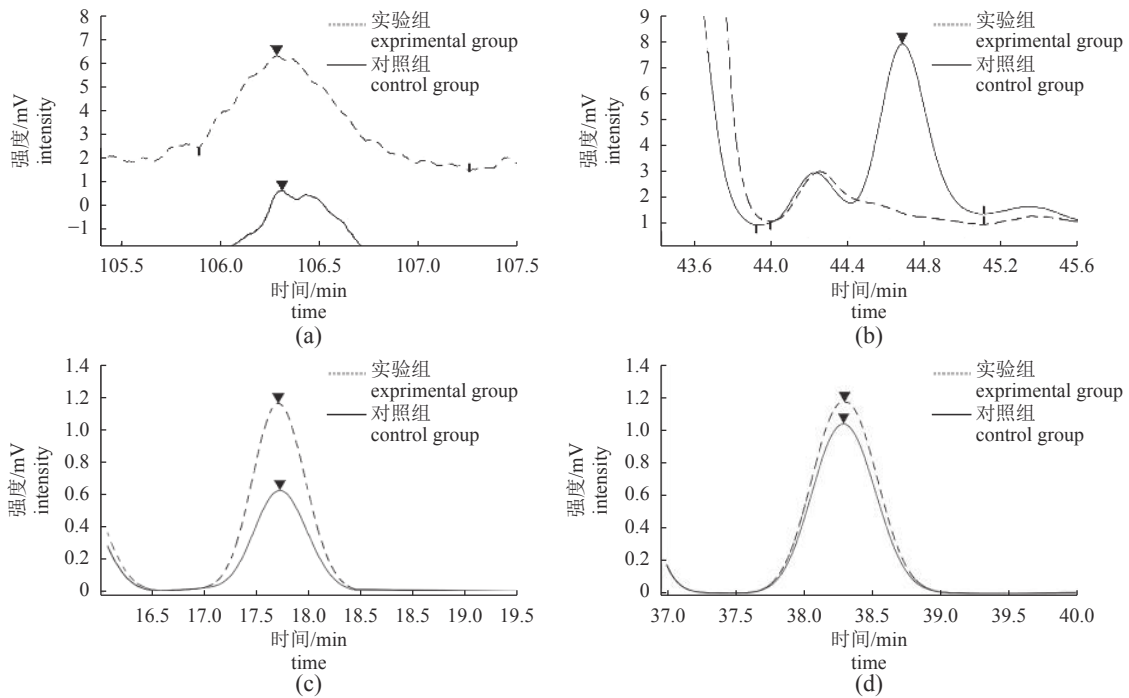


图6 肌肽(a)、半胱氨酸(b)、丝氨酸(c)和丙氨酸(d)在注射β-丙氨酸后氨基酸分析仪洗脱图谱

▼. 峰值

Fig. 6 Elution profile of Car (a), Cys (b), Ser (c) and Ala (d) after β-alanine injection

▼. peak value

以维持贻贝体内的氧化还原平衡。氨基酸分析仪对厚壳贻贝注射 β -丙氨酸后全组织游离氨基酸以及肌肽的含量测定结果进一步证实了 β -丙氨酸补充对丙氨酸、半胱氨酸和肌肽等含量的影响(图 6)。

目前, β -丙氨酸补充已在运动生理学和畜禽养殖等方面获得了应用。本研究结果证实, β -丙氨酸补充可通过半乳糖代谢、果糖和甘露糖代谢、碳水化合物消化与吸收等代谢通路增加厚壳贻贝中能量代谢水平, 并增加肌肽含量, 上述结论为 β -丙氨酸在海洋生物养殖中的应用提供了科学依据。

参考文献 (References):

- [1] Boldyrev A A, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine[J]. *Physiological Reviews*, 2013, 93(4): 1803-1845.
- [2] Boldyrev A A, Stvolinsky S L, Fedorova T N, *et al.* Carnosine as a natural antioxidant and geroprotector: from molecular mechanisms to clinical trials[J]. *Rejuvenation Research*, 2010, 13(2-3): 156-158.
- [3] Hoffman J R, Zuckerman A, Ram O, *et al.* Behavioral and inflammatory response in animals exposed to a low-pressure blast wave and supplemented with β -alanine[J]. *Amino Acids*, 2017, 49(5): 871-886.
- [4] Boldyrev A, Bulygina E, Leinsoo T, *et al.* Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 137(1): 81-88.
- [5] Hipkiss A R, Worthington V C, Himsworth D T J, *et al.* Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1998, 1380(1): 46-54.
- [6] Kohen R, Yamamoto Y, Cundy K C, *et al.* Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(9): 3175-3179.
- [7] Trombley P Q, Horning M S, Blakemore L J. Interactions between carnosine and zinc and copper: implications for neuromodulation and neuroprotection[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2000, 65(7): 807-816.
- [8] Quinn P J, Boldyrev A, Formazuyk V E. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications[J]. *Molecular aspects of Medicine*, 1992, 13(5): 379-444.
- [9] Yagasaki M, Hashimoto S I. Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(1): 13-22.
- [10] Janssen B, Hohenadel D, Brinkkoetter P, *et al.* Carnosine as a protective factor in diabetic nephropathy: association with a leucine repeat of the carnosinase gene CNDP1[J]. *Diabetes*, 2005, 54(8): 2320-2327.
- [11] Baye E, Ukropec J, de Courten M P J, *et al.* Carnosine supplementation reduces plasma soluble transferrin receptor in healthy overweight or obese individuals: a pilot randomised trial[J]. *Amino Acids*, 2019, 51(1): 73-81.
- [12] Dunnett M, Harris R C. Influence of oral β -alanine and L-histidine supplementation on the carnosine content of the *gluteus medius*[J]. *Equine Veterinary Journal*, 1999, 31(S30): 499-504.
- [13] Harris R C, Tallon M J, Dunnett M, *et al.* The absorption of orally supplied β -alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis[J]. *Amino Acids*, 2006, 30(3): 279-289.
- [14] Blancquaert L, Everaert I, Derave W. Beta-alanine supplementation, muscle carnosine and exercise performance[J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2015, 18(1): 63-70.
- [15] Saunders B, Elliott-Sale K, Artioli G G, *et al.* β -alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: a systematic review and meta-analysis[J]. *British Journal of Sports Medicine*, 2017, 51(8): 658-669.
- [16] Tomonaga S, Kaji Y, Tachibana T, *et al.* Oral administration of β -alanine modifies carnosine concentrations in the muscles and brains of chickens[J]. *Animal Science Journal*, 2005, 76(3): 249-254.
- [17] Kralik G, Sak-Bosnar M, Kralik Z, *et al.* Effects of β -alanine dietary supplementation on concentration of carnosine and quality of broiler muscle tissue[J]. *The Journal of Poultry Science*, 2014, 51(2): 151-156.
- [18] Łukasiewicz M, Puppel K, Kuczyńska B, *et al.* β -alanine as a factor influencing the content of bioactive dipeptides in muscles of Hubbard Flex chickens[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(12): 2562-2565.
- [19] Geda F, Declercq A, Decostere A, *et al.* β -Alanine does not act through branched-chain amino acid catabolism in carp, a species with low muscular carnosine storage[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(1): 281-

- 287.
- [20] Oehlenschläger J. Seafood: nutritional benefits and risk aspects[J]. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 2012, 82(3): 168-176.
- [21] Crush K G. Carnosine and related substances in animal tissues[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1970, 34(1): 3-30.
- [22] Aristoy M C, Toldrá F. Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants[J]. *Meat Science*, 2004, 67(2): 211-217.
- [23] Abe H, Dobson G P, Hoeger U, *et al.* Role of histidine-related compounds to intracellular buffering in fish skeletal muscle[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1985, 249(4): R449-R454.
- [24] Wen B, Mei Z L, Zeng C W, *et al.* metaX: a flexible and comprehensive software for processing metabolomics data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(1): 183.
- [25] Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination[J]. *Journal of Chemometrics*, 2003, 17(3): 166-173.
- [26] Westerhuis J A, Hoefsloot H C J, Smit S, *et al.* Assessment of PLS-DA cross validation[J]. *Metabolomics*, 2008, 4(1): 81-89.
- [27] Kim S K, Takeuchi T, Yokoyama M, *et al.* Effect of dietary supplementation with taurine, β -alanine and GABA on the growth of juvenile and fingerling Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fisheries Science*, 2003, 69(2): 242-248.
- [28] Duhazé C, Gagneul D, Leport L, *et al.* Uracil as one of the multiple sources of β -alanine in *Limonium latifolium*, a halotolerant β -alanine betaine accumulating *Plumbaginaceae*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2003, 41(11-12): 993-998.
- [29] Cronan J E J. β -alanine synthesis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1980, 141(3): 1291-1297.
- [30] Fouad W M, Altpeter F. Transplastomic expression of bacterial *L*-aspartate- α -decarboxylase enhances photosynthesis and biomass production in response to high temperature stress[J]. *Transgenic Research*, 2009, 18(5): 707-718.
- [31] Ottenhof H H, Ashurst J L, Whitney H M, *et al.* Organisation of the pantothenate (vitamin B₅) biosynthesis pathway in higher plants[J]. *The Plant Journal*, 2004, 37(1): 61-72.
- [32] Shi J Y, Blundell T L, Mizuguchi K. FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 310(1): 243-257.
- [33] Yang C Y, Hao R J, Du X D, *et al.* Response to different dietary carbohydrate and protein levels of pearl oysters (*Pinctada fucata martensii*) as revealed by GC-TOF/MS-based metabolomics[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 2614-2623.
- [34] Pihl A, Fritzson P. The catabolism of C14-labeled β -alanine in the intact rat[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1955, 215(1): 345-351.
- [35] Ito S, Ohyama T, Kontani Y, *et al.* Influence of dietary protein levels on beta-alanine aminotransferase expression and activity in rats[J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2001, 47(4): 275-282.
- [36] Rodionov R N, Jarzebska N, Weiss N, *et al.* AGXT2: a promiscuous aminotransferase[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2014, 35(11): 575-582.
- [37] Baxter C F, Roberts E. Elevation of γ -aminobutyric acid in brain: selective inhibition of γ -aminobutyric- α -ketoglutaric acid transaminase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236(12): 3287-3294.
- [38] Kurozumi Y, Abe T, Yao W B, *et al.* Experimental beta-alaninuria induced by (aminooxy) acetate[J]. *Acta Medica Okayama*, 1999, 53(1): 13-18.
- [39] Tikunov A P, Stoskopf M K, MacDonald J M. Fluxomics of the eastern oyster for environmental stress studies[J]. *Metabolites*, 2014, 4(1): 53-70.
- [40] Emery P W. Basic metabolism: protein[J]. *Surgery (Oxford)*, 2009, 27(5): 185-189.
- [41] Harris R C, Jones G, Hill C H, *et al.* The carnosine content of *V. lateralis* in vegetarians and omnivores[J]. *The FASEB Journal*, 2007, 21(6): 944-944.
- [42] Stegen S, Blancquaert L, Everaert I, *et al.* Meal and beta-alanine coingestion enhances muscle carnosine loading[J]. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2013, 45(8): 1478-1485.
- [43] Ma H J, Zhao J J, Meng H B, *et al.* Carnosine-modified fullerene as a highly enhanced ROS scavenger for mitigating acute oxidative stress[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(14): 16104-16113.

Effects of β -alanine supplementation on the metabolomics of *Mytilus coruscus*

WANG Chunyue, PAN Chen, LIAO Zhi, FAN Meihua, YAN Xiaojun*

(Laboratory of Marine Biology Protein Engineering, Marine Science and Technology College,
Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: Carnosine (β -alanyl-*L*-histidine) is a natural dipeptide that was first discovered in 1900 by Vladimir Gulevitch as an abundant non-protein, nitrogen-containing compound of meat. Carnosine is an archetype of a family of histidine-containing dipeptides (HCDs), and several members of this family have been identified subsequently, including anserine (β -alanyl-N π -methyl-*L*-histidine), balenine (also called ophidine, β -alanyl-N τ -methyl-*L*-histidine), and homocarnosine (γ -aminobutyryl-*L*-histidine). Recent findings have highlighted the important roles of HCDs in muscular function and homeostasis, including their pH buffering ability, antioxidant capacity, increased Ca²⁺ sensitivity and protein glycation inhibition. The high concentration of HCDs has been observed in skeletal muscle, cardiac muscle, the brain and olfactory bulb, the stomach, and the kidneys of vertebrates. However, the biological role of carnosine and its analogues is not yet entirely known.

β -alanine is a key substrate for the synthesis of carnosine, and β -alanine supplementation has been used for elevation of the carnosine content and thus has very important value in the field of medicine, pharmacy and food. Mussel is an important aquaculture shellfish in China. In order to determine the changes of small molecule metabolites and the possible metabolic mode of β -alanine supplementation in the biological body, high performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry was used to analyze the metabolite changes of *Mytilus coruscus* after β -alanine supplementation.

Using UPLC-MS/MS technology, a total of 18 023 metabolite peaks were obtained, including 9 555 from POS model and 8 468 from NEG model, and 381 and 309 differential metabolites were therefore generated from POS model and NEG model, respectively. From these data, a set of 60 representative metabolites were screened out with Fold Change >1.3 or <0.73, and $P < 0.05$, after the injection of β -alanine. These significantly different metabolites were identified as carbohydrate metabolites (maltose, lactose, sucrose, glucose and fructose, etc.); amino acids and their derivatives (serine, cysteine, β -alanine, glutamine, alpha-ketoglutaric acid, etc.); lipid metabolites (photosterol, 2-2-arachidonic glycerol, etc.) and other metabolites (montane trachidine, asimidazole). Differential metabolites were then submitted to KEGG database for metabolic pathway enrichment analysis, and a total of 134 (POS mode) and 113 (NEG mode) metabolic pathways were enriched, among which, 60 representative metabolites were enriched to 25 metabolic pathways, including galactose metabolism, amino acid biosynthesis, β -alanine biosynthesis, arginine biosynthesis, glutathione metabolism, fructose and mannose metabolism, carbohydrate digestion and absorption pathways. After β -alanine injection, the free amino acids in the whole tissue of *M. coruscus* showed that the content of 19 amino acids in the experimental group changed compared with the control group. Compared with the control group, the contents of cysteine, carnosine, and serine were significantly decreased after β -alanine injection, which was consistent with the results of the metabolomics analysis.

These results revealed that β -alanine supplementation can effectively increase the energy metabolism of *M. coruscus* and carnosine content. This study provided a foundation for understanding the regulation of β -alanine in mussel metabolism and its mechanism, and also provided new ideas and means for improving the efficiency and nutritional value of mussel culture through β -alanine supplementation.

Key words: *Mytilus coruscus*; carnosine; β -alanine; metabolomics

Corresponding author: YAN Xiaojun. E-mail: yanxj@zjou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31671009); Zhoushan Science and Technology Bureau Project (2019F12004); Zhejiang Province First-Class Discipline Construction Open Fund