

# 基于基因组测序分析3株不同来源副干酪乳酪杆菌的黏附特性及糖代谢途径

肖路遥, 石婷婷, 杨倩, 李伟\*  
(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 副干酪乳酪杆菌 (*Lactocaseibacillus paracasei*) ZY-1来源于西藏灵菇, *L. paracasei* S-NA5与*L. paracasei* S-NB分离自新疆老酸奶。本研究通过体外评价菌株的表面特性和黏附性能, 结合全基因组测序, 比较分析3株菌株黏附作用相关基因的差异性。菌株S-NB的胃肠道耐受能力和黏附Caco-2细胞性能均优于S-NA5和ZY-1。3株菌株均含有2个胞外多糖 (exopolysaccharide, EPS) 合成基因簇, 其中菌株ZY-1的EPS合成基因簇1与S-NA5和S-NB差别较大。同时预测到脂磷壁酸合成相关基因以及蛋白类黏附素的相关结构域, S-NB菌株的黏附蛋白基因编码产物的二级结构预测分析结果表明, 11种黏附蛋白的二级结构以 $\alpha$ -螺旋和无规卷曲为主。另外, 在3株菌株中发现完整的乳糖和半乳糖、低聚果糖和菊糖以及母乳低聚糖代谢途径, 呈高度保守。

**关键词:** 副干酪乳酪杆菌; 肠道黏附; 基因组测序; 黏附素; 糖代谢途径

## Analysis of Adhesion Characteristics and Carbohydrate Metabolism Pathways of Three *Lactocaseibacillus paracasei* Strains from Different Sources Based on Genome Sequencing

XIAO Luyao, SHI Tingting, YANG Qian, LI Wei\*  
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The surface characteristics and adhesion properties of *Lactocaseibacillus paracasei* ZY-1, derived from Tibetan kefir grains, and *L. paracasei* S-NA5 and S-NB, isolated from Xinjiang traditional fermented milk, were evaluated *in vitro*, and whole genome sequencing was performed to compare the difference among adhesion-related genes in the three strains. The gastrointestinal tolerance and adhesion properties of *L. paracasei* S-NB to Caco-2 cells were superior to those of S-NA5 and ZY-1. Moreover, two exopolysaccharide (EPS) synthesis gene clusters were found in each strain, and the EPS cluster 1 of strain ZY-1 differed significantly from that of S-NA5 and S-NB. Meanwhile, genes involved in lipoteichoic acid (LTA) synthesis and related domains of protein adhesins were predicted. The secondary structure prediction of the products encoded by the adhesion protein genes in S-NB showed that the secondary structure of 11 adhesion proteins was dominated by  $\alpha$ -helix and random coil. Additionally, the complete metabolic pathways of lactose, galactose, fructi-oligosaccharide, inulin and human milk oligosaccharides were found in the three strains, which were all highly conserved.

**Keywords:** *Lactocaseibacillus paracasei*; intestinal adhesion; genome sequencing; adhesin; carbohydrate metabolism pathway

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230506-049

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0128-11

引文格式:

肖路遥, 石婷婷, 杨倩, 等. 基于基因组测序分析3株不同来源副干酪乳酪杆菌的黏附特性及糖代谢途径[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 128-138. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230506-049. <http://www.spkx.net.cn>

XIAO Luyao, SHI Tingting, YANG Qian, et al. Analysis of adhesion characteristics and carbohydrate metabolism pathways of three *Lactocaseibacillus paracasei* strains from different sources based on genome sequencing[J]. Food Science, 2024, 45(2): 128-138. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230506-049. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-05-06

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20201320); 江苏省研究生科研创新计划项目 (KYCX23\_0777)

第一作者简介: 肖路遥 (1997—) (ORCID: 0000-0003-0718-487X), 女, 博士研究生, 研究方向为食品微生物和乳酸菌代谢产物。E-mail: 1798292124@qq.com

\*通信作者简介: 李伟 (1981—) (ORCID: 0000-0003-1075-5274), 男, 教授, 博士, 研究方向为微生物资源挖掘、乳酸菌胞外多糖的结构解析及益生功能。E-mail: liwei@njau.edu.cn

随着人们对营养健康食品的需求提高, 益生菌制品因其健康安全、能够调节肠道平衡、增强免疫力等功能特性广受关注。副干酪乳酪杆菌 (*Lacticaseibacillus paracasei*) 作为革兰氏阳性和兼性厌氧发酵乳酸杆菌, 广泛分布于发酵乳制品、蔬菜、谷物产品及人类和动物的胃肠道中<sup>[1]</sup>。*L. paracasei*已被证实具有多种健康功效, 包括抗肿瘤、免疫调节以及对肠道微生物群的改善和调节作用<sup>[2-3]</sup>。近年来, 高通量测序技术和生物信息学高速发展, 越来越多的研究借助基因组测序信息对菌株的功能特性进行预测分析, 对关键基因进行挖掘。

非人源的乳酸菌若要在人体发挥益生功效, 首先要能稳定定植于人体肠道。乳酸菌对胃肠道环境低pH值、高胆汁酸盐的耐受能力以及对上皮细胞的黏附是其定植的先决条件之一。乳酸菌对肠上皮细胞的黏附作用有利于菌株与宿主细胞间的信号交流, 同时抑制致病菌的生长代谢, 增强机体抵抗力<sup>[4]</sup>。对于乳酸菌黏附机制的研究是目前研究的热点, 现已发现, 乳酸菌表面的大分子物质成分, 如胞壁磷壁酸 (wall teichoic acids, WTA)、脂磷壁酸 (lipoteichoic acids, LTA)、S-层蛋白 (S-layer protein, SLP) 以及分泌到胞外处于细胞最外层的胞外多糖 (exopolysaccharides, EPS) 等成分在乳酸菌对肠上皮细胞的黏附过程中起到一定的作用, 因而这些成份也被称作黏附素<sup>[5]</sup>。这些黏附素可以与肠道细胞表面的受体进行特异性结合, 而引发一系列复杂的生理变化。随着分子生物学手段的不断发展, 基因编辑技术已被应用于乳酸菌的功能机制研究中。Claes等<sup>[6]</sup>通过*dltD*基因的敲除证明*L. rhamnosus* GG菌株的LTA在决定其体内治疗效果方面发挥重要作用; 植物乳杆菌HC-2的表面伸长因子EF-Tu可以与虾肠道纤连蛋白结合, 从而抑制细胞凋亡, 参与肠道免疫调节<sup>[7]</sup>。Lu Yanmeng等<sup>[8]</sup>发现在不同的胃肠道条件下, EPS结构的变化会影响益生菌与黏蛋白的相互作用而增强菌株对黏膜的黏附性。目前, 关于非人源乳酸菌在人体胃肠道的黏附定植机制尚不清楚, 对于黏附相关基因的研究也十分有限。因此, 借助于生物信息学对乳酸菌的黏附相关基因进行系统挖掘, 对其胃肠道定植机制的解析及体内递送的研究具有重要价值。

本研究前期从西藏灵菇分离得到1株*L. paracasei* ZY-1, 从新疆老酸奶中分离得到*L. paracasei* S-NA5和*L. paracasei* S-NB, 实验表明这3株菌生长活力旺盛, 安全性评价良好, 且发酵酸奶的凝乳状态良好、风味尚佳。本研究进一步对3株菌株的疏水性、自聚性、耐受胃肠消化特性以及黏附Caco-2细胞能力进行评价。并结合基因组测序分析影响菌株黏附特性的相关基因, 比较3株菌株基因组水平的差异, 对EPS合成基因簇、LTA合成基因和黏蛋白相关基因进行全面的预测分析。并对3株菌株的糖代谢途径进行挖掘, 以期对*L. paracasei*的肠上皮黏附和体内定植机制的研究奠定遗传学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

*L. paracasei* ZY-1分离自西藏灵菇, *L. paracasei* S-NA5和*L. paracasei* S-NB从新疆传统发酵乳中分离, 均保存于本实验室。

MRS培养基 北京陆桥技术股份有限公司; 胃蛋白酶、胰液素、胰蛋白酶、胆汁盐 美国Sigma公司; Caco-2 (结肠腺癌细胞) 中国科学院上海生命科学研究所以; DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 培养基、血清 美国Gibco公司; 0.25%胰酶细胞消化液 上海碧云天生物技术有限公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒 山东思科捷 (Sparkjade) 生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

5418高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司; SW-CJ-1F超净工作台 苏州净化有限公司; 二氧化碳培养箱 美国Thermo Fisher Scientific公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌株形态观察及系统进化树构建

将安瓿管中保藏的菌株划线至MRS固体培养基中进行活化, 37℃培养48 h, 挑取单菌落在光学显微镜下观察菌落形态。按照细菌基因组DNA提取试剂盒的操作说明提取菌株DNA, 以基因组DNA为模板, 利用细菌16S rDNA通用引物 (27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'和1492R: 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增。PCR产物由北京擎科生物科技有限公司测序, 所得序列经拼接后在NCBI网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行同源比对, 挑选14株来源于不同种属的乳酸菌, 进行系统进化树的构建。

#### 1.3.2 表面特性与黏附特性分析

##### 1.3.2.1 疏水性及自聚性分析

采用微生物黏附溶剂法测定菌株的表面疏水性。将活化好的菌株按4%接种量转接至MRS液体培养基中, 培养12 h后5000 r/min离心10 min收集细菌培养物, 用无菌磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 重悬菌体至OD<sub>600 nm</sub>为0.60±0.02, 记为A<sub>H0</sub>, 将细菌悬液 (3 mL) 分别与二甲苯和十六烷溶剂 (1 mL) 混合, 37℃孵育20 min。等待相分离后, 测定水相的OD<sub>600 nm</sub> (A<sub>H1</sub>), 按式 (1) 计算细胞表面疏水性:

$$\text{细胞表面疏水性}/\% = \left(1 - \frac{A_{H1}}{A_{H0}}\right) \times 100 \quad (1)$$

通过监测不同时间点 (2、4、6、8、12、24 h) 细菌悬浮液上层光密度的下降情况, 确定其自聚集程度。

### 1.3.2.2 模拟体外消化的应激能力

模拟胃肠液的配制参考Xiao Luyao等<sup>[9]</sup>的方法,称取NaCl 2.8 g、KCl 514.4 mg、NaHCO<sub>3</sub> 2.1 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 225.0 mg、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 20.3 mg、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 78.6 mg溶解于1 L蒸馏水中,调节pH 2.5,得到模拟胃缓冲液;称取NaCl 2.2 g、KCl 507.0 mg、NaHCO<sub>3</sub> 7.1 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 108.9 mg、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 67.1 mg溶解于1 L蒸馏水中,调节pH 7.5,得到模拟肠缓冲液。然后分别称取15 mg胃黏液素和6.25 mg胃蛋白酶溶解于10 mL的模拟胃缓冲液中,置于37 °C活化20 min,获得模拟胃消化液;将8.17 mg胆盐和5.62 mg胰液素分别溶于10 mL模拟肠缓冲液中,于37 °C活化20 min,获得模拟肠消化液。将处于对数生长期的菌液按10%接种量转接至模拟胃消化液中,混匀后置于37 °C摇床培养1.5 h (180 r/min),测定经胃液消化后的存活率。培养结束后混合均匀,再与模拟肠消化液按体积比1:9混合均匀,于37 °C摇床培养3 h (180 r/min)后测定经胃肠消化后的存活率。

### 1.3.2.3 黏附Caco-2细胞能力

将活化后的菌株按4%接种量转接至MRS液体培养基中,37 °C培养至对数生长期,5 000 r/min离心10 min,收集菌体沉淀后用无菌PBS清洗2次,重悬于DMEM至终浓度为1×10<sup>8</sup> CFU/mL。Caco-2细胞以2×10<sup>5</sup>个/mL接种于12孔细胞培养板中,在37 °C、5% CO<sub>2</sub>环境下培养至单层,使用无菌PBS清洗2次后加入菌悬液,同样环境条件下培养2 h。缓慢移除上清液,加入无菌PBS清洗以去除未黏附的菌体,加入体积分数0.05%的Triton X-100溶液裂解细胞,用平板菌落计数法测定乳酸杆菌的活菌数量。黏附率按式(2)计算:

$$\text{黏附率}/\% = \frac{\text{黏附菌落数量}}{\text{初始菌落数量}} \times 100 \quad (2)$$

### 1.3.3 全基因组测序分析及功能基因的注释

参照细菌基因组DNA提取试剂盒步骤对3株菌的基因组DNA进行提取和纯化,使用快速测序试剂盒构建测序库,再通过Nanopore PromethION48和Illumina NovaSeq平台完成全基因组测序。使用Unicycler v0.4.7软件进行混合基因组的组装,CheckM v1.0.18软件用于对组装序列进行校正和评估。蛋白编码序列(coding sequence, CDS)的注释通过Prokka 1.12软件(<http://www.vicbioinformatics.com/software/prokka.shtml>)完成。CDS的功能注释参考COG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)和KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)数据库。此外,EPS合成基因簇的预测基于BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)和RAST (<https://rast.nmpdr.org/>)网站的分析,蛋白家族和结构域的分析借助于Pfam (<https://pfam.xfam.org/>)数据库。通过Clustal Omega网站 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)对黏附蛋白相关基因进行多序列比对;采用ExPASy ([\[expasy.org/protparam/\]\(https://web.expasy.org/protparam/\)\)、SOPMA \(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>\)和SMART \(<https://smart.embl.de/>\)网站对黏附蛋白的一般性质和结构进行在线分析。](https://web.</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

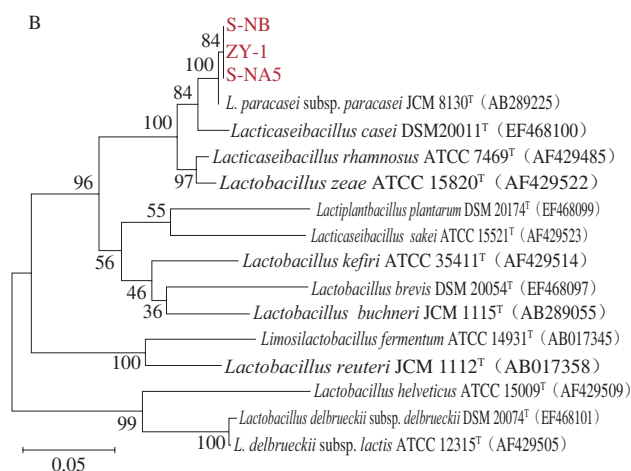
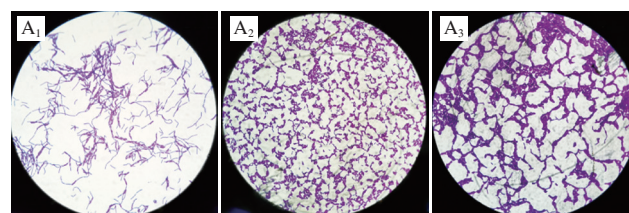
### 1.4 数据处理

采用MEGA 6.0软件进行系统进化树的构建,使用GraphPad Prism软件进行图片绘制和数据分析。DNA图谱和基因簇图分别使用Proksee (<https://proksee.ca>)和Chiplot (<https://www.chiplot.online>)软件绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌落形态观察及系统发育进化树分析

经显微镜观察,3株菌株均为杆状细菌(图1A),其中菌株ZY-1呈长杆状,相比之下,菌株S-NA5和S-NB在显微镜下为短杆状。其中,可观察到菌株S-NB多数呈现聚集状态。将3株菌的16S rDNA测序结果在NCBI数据库进行BLAST检索,与已知序列进行同源比对,并与14株来源于不同种属的乳酸菌序列构建系统发育进化树(图1B)。3株菌株均与*L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130<sup>T</sup>处于同一分支,且序列同源性为100%,因此,3株菌被确定为*L. paracasei*。



下标1~3.菌株ZY-1、S-NA5和S-NB。

图1 3株副干酪乳杆菌的菌落形态(A)和系统进化树(B)

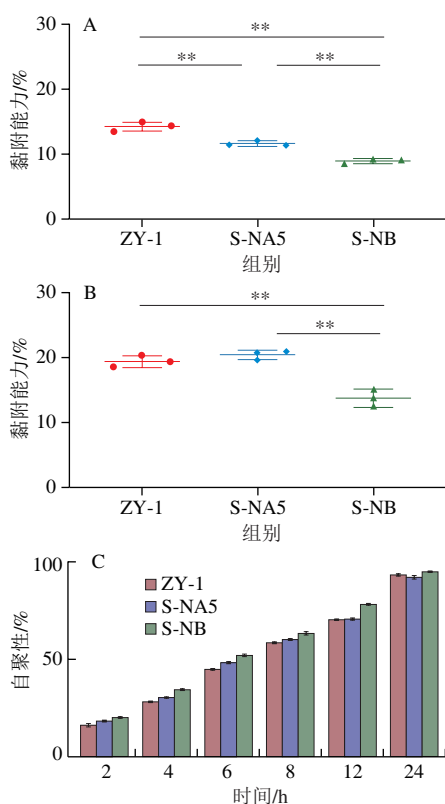
Fig. 1 Colonial morphology (A) and phylogenetic tree (B) of three *L. paracasei* strains

### 2.2 菌株表面特性与黏附特性评价

益生菌的疏水性和自聚集等细胞表面特性与其黏附上皮细胞的能力直接相关。如图2A、B



所示, *L. paracasei* ZY-1对二甲苯的黏附能力 ( $14.29 \pm 0.67$ %) 显著高于*L. paracasei* S-NA5 ( $11.67 \pm 0.41$ %,  $P < 0.01$ ) 和*L. paracasei* S-NB ( $8.97 \pm 0.40$ %,  $P < 0.01$ )。而S-NA5 ( $20.48 \pm 0.74$ %) 对十六烷的黏附能力高于ZY-1 ( $19.46 \pm 0.92$ %) 和S-NB ( $13.79 \pm 1.36$ %),  $P < 0.01$ )。如图2C所示, 3株菌的自聚集性随时间延长的变化趋势相对一致, ZY-1 ( $93.53 \pm 0.45$ %) 和S-NB ( $94.93 \pm 0.25$ %) 在孵育24 h后的自聚集能力相对高于S-NA5 ( $92.36 \pm 0.60$ %)。对低pH值环境、胆汁盐和胰液的抗逆性是决定益生菌在胃肠道生存能力的重要因素。



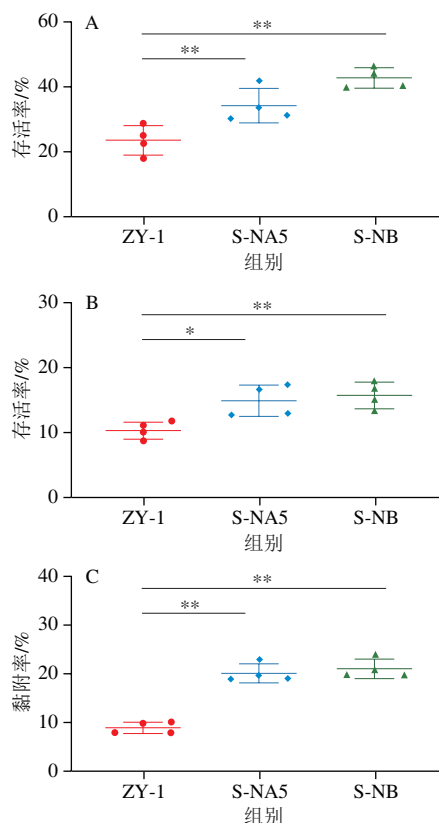
A. 对二甲苯的黏附能力; B. 对十六烷的黏附能力; C. 自聚性。  
\*. 差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*. 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。图3同。

图2 3株副干酪乳杆菌的表面特性分析

Fig. 2 Analysis of surface characteristics of three *L. paracasei* strains

如图3A所示, 在模拟胃消化液中培养90 min后, S-NB的存活率 ( $42.77 \pm 2.80$ %) 高于ZY-1 ( $23.65 \pm 3.93$ %)%,  $P < 0.01$ ) 和S-NA5 ( $34.23 \pm 4.52$ %)%, 而紧接着在肠消化液刺激3 h后, S-NB的存活率下降至 ( $15.82 \pm 1.77$ %)%, 依旧高于ZY-1 ( $10.42 \pm 1.15$ %)%,  $P < 0.01$ ) 和S-NA5 ( $14.99 \pm 2.10$ %)% (图3B)。3株菌对Caco-2细胞的黏附能力如图3C所示, 各菌株与Caco-2细胞共培养2 h后, S-NB的黏附能力最强 ( $21.10 \pm 1.98$ %)%, 其次为S-NA5 ( $20.18 \pm 1.92$ %)% 和ZY-1 ( $9.02 \pm 1.14$ %)%。益生

菌对肠上皮细胞的黏附有利于其稳定定植于人体肠道, 抑制致病菌的生长, 从而增强机体免疫力, 达到预防疾病的目的<sup>[4]</sup>。根据3株菌的表面特性与黏附能力的评价, 菌株ZY-1的疏水性较强, 但其对Caco-2细胞的黏附性最差; 菌株S-NA5的疏水性由于S-NB, 但其黏附Caco-2细胞的能力较差; 而S-NB具备最优的Caco-2细胞黏附能力, 结果表明菌株的表面疏水性与黏附性并不存在直接关联性。此外, 3株菌对模拟体外胃肠消化后的耐受情况与细胞黏附性呈现显著正相关性 (数据未显示,  $R = 1.0$ ,  $P < 0.05$ )。同一来源的菌株S-NA5与S-NB的胃肠液耐受能力与黏附性能均较为接近。



A. 模拟胃消化的存活率; B. 模拟肠消化的存活率; C. 对Caco-2细胞的黏附率。

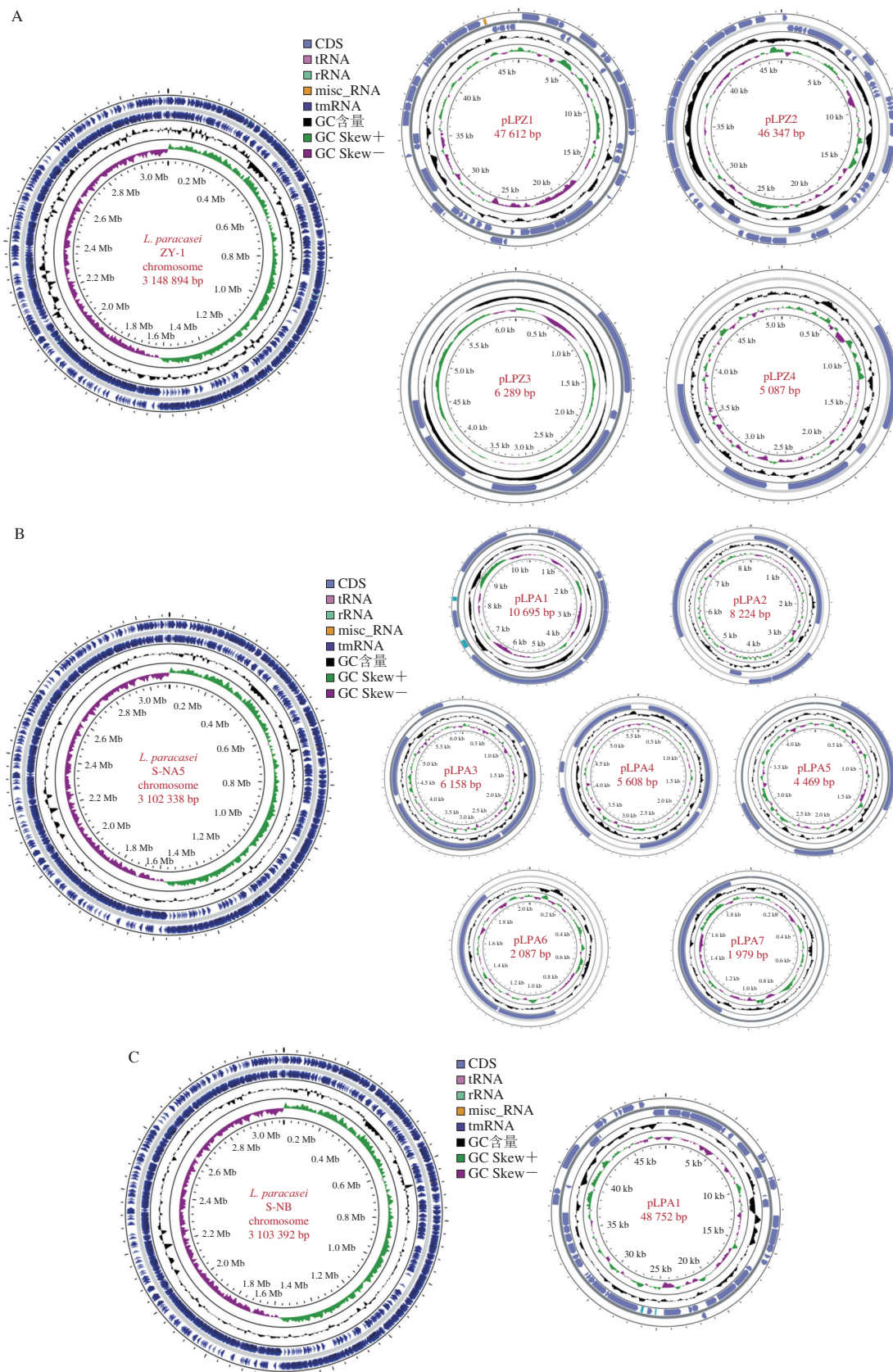
图3 3株副干酪乳杆菌的模拟胃肠液耐受性及黏附特性分析

Fig. 3 Analysis of simulated gastrointestinal fluid tolerance and adhesion capacity of three *L. paracasei* strains

### 2.3 黏附相关基因的预测分析

#### 2.3.1 基因组圈图及功能注释

3株菌的测序结果经评估、组装、注释后提交至GenBank数据库, 序列号分别为: ZY-1, CP065154.1-CP065158.1; S-NA5, CP068408.1-CP068415.1; S-NB, CP068486.1-CP068487.1。利用预测得到的基因组信息, 如基因组测序深度、GC分布以及结构注释等进行整合, 绘制出基因组圈图和质粒图谱 (图4)。菌株ZY-1组装后含1条染色体, 含4个质粒, 基因组大小为3 148 894 bp,



A~C.菌株ZY-1、S-NA5和S-NB。

图4 3株副干酪乳杆菌的基因组圈图

Fig. 4 Circle maps of the genomes and endogenous plasmids of three *L. paracasei* strains

GC含量为46.38%，包含3 010个CDS；而S-NA5的组装结果显示组装后S-NA5含有1条染色体和7个内源性质粒，其基因组大小为3 102 338 bp，GC含量为46.38%，包含2 956个CDS；S-NB基因组信息与S-NA5很相似，但仅包括1个质粒，其基因组大小为3 103 392 bp，GC含量为46.38%，包括2 958个CDS。基因组分析结果表明3株乳酪杆菌在基因组大小、质粒数量上均存在差异。且3株菌的基因组大小均大于模式菌株干酪乳酪杆菌 (*L. casei*) ATCC 393<sup>T</sup> (基因组大小为2 952 961 bp) 和*L. paracasei* JCM 8130<sup>T</sup> (基因组大小为3 017 804 bp)。基于3株菌株的全基因组信息可对菌株代谢物质的合成途径及通路、不同碳源的代谢差异、潜在的益生功能等进行系统的预测与分析。

### 2.3.2 EPS合成基因簇的分析

乳酸菌的EPS是其在生长代谢过程中分泌的水溶性大分子聚合物，一部分附着在细胞壁上形成荚膜多糖，另外一部分被释放到细胞壁外至培养基中形成黏液多糖。乳酸菌的EPS已被证实具备多种生物活性，包括抗氧化性、免疫调节、降低胆固醇、抗糖尿病等<sup>[10]</sup>。EPS的功能特性与其分子结构、单糖组成、糖苷键构型、电荷极性等相关<sup>[11]</sup>。因此，EPS的生物合成途径对多糖的空间结构以及生理活性至关重要。EPS的产生与参与调节生物合成途径的基因簇中关键酶的表达水平密切相关。通常合成EPS的基因簇位于染色体DNA或质粒上，且乳酸菌的EPS合成基因簇数目为1~4个不等<sup>[12]</sup>。多糖的生物合成一般包含5个步骤：单糖和双糖的硫酸化或转运、糖核苷酸的产生、重复单元的合成、重复单元的转移、糖链的聚合和转运<sup>[13]</sup>。其中涉及的基因簇大多具有菌株特异性，在3株副干酪乳杆菌中均预测到2个EPS合成基因簇(图5)，ZY-1的EPS合成基因簇1(*eps1*)中包含了25个基因片段，而S-NA5和S-NB均只包括了19个基因；3株菌株的EPS合成基因簇2(*eps2*)都涵盖了18个基因片段。这3株菌的EPS合成依赖Wzx/Wzy通路，包含了糖基转移酶、糖核苷酸合成相关基因、Wzx和翻转酶、聚合酶等。*eps1*中的LtyR蛋白与假定的转录调控因子高度同源，位于基因簇上游；Wzb和Wze蛋白分别与酪氨酸蛋白磷酸酶和酪氨酸蛋白激酶具有氨基酸同源性，都与多糖链长相关；*eps1*的中间部分大多由糖基转移酶基因组成，如*WelE*和*Glf*；Wzx是低聚糖重复单元易位酶，负责将重复单元翻转至质周或外膜；Wzd基因位于*eps1*的下游，被注释为多糖合成蛋白，与多糖的聚合和转运相关。3株菌*eps2*的核酸序列同源性为100%，推测其在EPS的合成中承担辅助功能，EpsG和Wzz作为多糖聚合酶参与多糖的聚合和转运。乳酸菌表面的大分子物质可以与胃肠道黏膜的宿主模式识别受体相互作用，发挥益生功

效。但到目前为止，EPS的模式识别受体仍鲜有报道，可能是由于多糖聚合物的复杂结构导致菌株对微生物相关分子模式产生了屏蔽效应<sup>[14]</sup>。对3株菌EPS合成基因簇的分析表明，不同来源的*L. paracasei*的EPS合成模式具有差异性，源于西藏开菲尔粒的ZY-1菌株的EPS合成途径可能更为复杂，而菌株ZY-1的黏附Caco-2能力极显著低于S-NA5和S-NB ( $P < 0.01$ )，因此推测EPS的生物合成会对菌株的体外黏附性能产生影响。而同一来源的S-NA5与S-NB菌株的EPS合成基因簇具有较高同源性，这与其较为接近的黏附能力及胃肠消化耐受性的具有一致性。

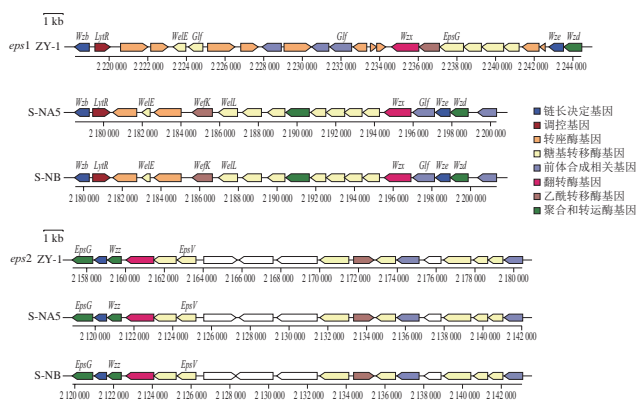


图5 3株*L. paracasei*的EPS合成基因簇  
Fig. 5 EPS biosynthesis gene clusters of three *L. paracasei* strains

### 2.3.3 磷壁酸合成相关基因的预测分析

磷壁酸包含以磷酸二酯键共价固定在肽聚糖的MurNac残基上的WTA和以糖脂锚定在细胞质膜上的LTA。LTA是TLR2和TLR6异质二聚体中的配体，CD14和CD36作为辅受体<sup>[15]</sup>。现有研究已表明LTA可通过TLR2依赖机制调节肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 的水平<sup>[16-17]</sup>。同样，与野生型菌株相比，鼠李糖乳酪杆菌GG的D-丙基化缺失突变株提高了其在小鼠肠炎模型中的保护作用<sup>[6]</sup>。而嗜酸乳杆菌的*ltaS*突变株也被证实能下调TNF- $\alpha$ 和白细胞介素(interleukin, IL)-12的产生，并促进抗炎因子IL-10的释放，且突变株在治疗慢性结肠炎疾病方面的积极效果优于野生型菌株<sup>[18]</sup>。目前，LTA聚合物和针对其研发的特异性抗体已被用作候选的疫苗，具有一定的临床应用价值。参与LTA主链合成的关键基因*ltaI*、*lta2*以及调控LTA支链合成的*dltABCD*基因簇在3株*L. paracasei*的染色体DNA上均被检测到，且各基因间的同源性达100% (表1)。总体而言，LTA的合成相关基因在3株菌种表现出高度一致性，且皆位于染色体DNA上，为进一步确认磷壁酸的合成对乳酸菌黏附性能及益生功效的影响，还需构建相关基因缺失突变株，以探究其内在的必然联系。



表1 3株*L. paracasei*的LTA合成相关基因

菌株	基因	编码蛋白	长度/bp	位置 (染色体DNA)
ZY-1	<i>lta1</i>	脂磷壁酸合成家族蛋白	2094	937 885~939 978
ZY-1	<i>lta2</i>	脂磷壁酸合成家族蛋白	2256	1 220 392~1 222 647
ZY-1	<i>dltA</i>	D-丙氨酸-聚(磷酸糖醇)连接酶亚基A	1521	886 253~887 773
ZY-1	<i>dltB</i>	D-丙氨酸-脂磷壁酸生物合成蛋白B	1218	887 773~888 990
ZY-1	<i>dltC</i>	D-丙氨酸-聚(磷酸糖醇)连接酶亚基C	246	889 059~889 304
ZY-1	<i>dltD</i>	D-丙氨酸-脂磷壁酸生物合成蛋白D	1272	889 301~890 572
S-NA5	<i>lta1</i>	脂磷壁酸合成家族蛋白	2094	941 135~943 228
S-NA5	<i>lta2</i>	脂磷壁酸合成家族蛋白	2256	1 217 832~1 220 087
S-NA5	<i>dltA</i>	D-丙氨酸-聚(磷酸糖醇)连接酶亚基A	1521	890 973~892 493
S-NA5	<i>dltB</i>	D-丙氨酸-脂磷壁酸生物合成蛋白B	1218	892 493~893 710
S-NA5	<i>dltC</i>	D-丙氨酸-聚(磷酸糖醇)连接酶亚基C	246	893 779~894 024
S-NA5	<i>dltD</i>	D-丙氨酸-脂磷壁酸生物合成蛋白D	1272	894 021~895 292
S-NB	<i>lta1</i>	脂磷壁酸合成家族蛋白	2094	941 134~943 227
S-NB	<i>lta2</i>	脂磷壁酸合成家族蛋白	2256	1 217 831~1 220 086
S-NB	<i>dltA</i>	D-丙氨酸-聚(磷酸糖醇)连接酶亚基A	1521	890 972~892 492
S-NB	<i>dltB</i>	D-丙氨酸-脂磷壁酸生物合成蛋白B	1218	892 492~893 709
S-NB	<i>dltC</i>	D-丙氨酸-聚(磷酸糖醇)连接酶亚基C	246	893 778~894 023
S-NB	<i>dltD</i>	D-丙氨酸-脂磷壁酸生物合成蛋白D	1272	894 020~895 291

### 2.3.4 蛋白类黏附素的预测分析

乳酸菌的黏附素分为蛋白类黏附素和非蛋白类黏附素。表层蛋白 (SLP) 是研究最为广泛的蛋白类黏附素, SLP存在于革兰氏阳性和阴性菌中, 通过共价键连接于细菌的细胞壁, 是乳酸菌黏附到肠上皮细胞、黏液和细胞外基质上的重要介质<sup>[19-21]</sup>。嗜酸乳杆菌NCFM的表层蛋白A (slpA) 不仅黏附于Caco-2细胞, 而且可对特定的细胞外基质和黏蛋白的产生黏附效应。从本实验的3株*L. paracasei*中各预测到2个细菌表层蛋白相关基因, 包含SLP功能结构域(表2)。黏液、细胞外成分如胶原蛋白和纤连蛋白是常用于评价细菌与宿主间相互作用的体外模型。在菌株ZY-1中发现4个包含MucBP (mucin-binding protein) 结构域的基因, 而在菌株S-NA5和S-NB中存在5个含MucBP结构域的基因片段。此外, 在3株菌中都预测到胶原蛋白结合蛋白 (collagen binding protein domain, Cbp) 结构域和纤连蛋白结合蛋白A的N端 (fibronectin-binding protein A N-terminus, FbpA)。胶原蛋白和纤连蛋白是病原体 and 共生细菌的黏附靶标物质<sup>[22]</sup>。关于Cbp和Fbp的研究大多集中在病原体中, 在乳酸菌种属的研究较少<sup>[23-24]</sup>。其中, 源于植物乳植杆菌91的表层Cbp具有抑制大肠杆菌O157:H7结合的活性<sup>[25]</sup>; 而发酵乳酸杆菌3872的细胞及其假定的Cbp可抑制空肠弯曲杆菌与I型胶原蛋白结合<sup>[26]</sup>。另外, 嗜酸乳杆菌NCFM的FbpA缺失突变株被证实对Caco-2细胞的黏附特性降低, FbpB也被鉴定为S层相关蛋白参与对黏蛋白的黏附中<sup>[27]</sup>。根据各黏附蛋白相关基因的比对结果(文中未展示), 不同来源菌株的MucBP结构域所在蛋白序

列存在差异, ZY-1菌株的蛋白序列与另2株菌相似度较低。而含有SLAP、Cbp和FbpA结构域的基因编码蛋白序列的同源性达100%。这可能为上文中ZY-1菌株的低Caco-2黏附能力作出解释。乳酸菌在宿主肠道中的定植受多因素的影响, 不仅包括菌株自身的黏附能力、增殖情况、代谢物质, 还受复杂环境因素的干扰, 比如胃酸和胆盐的耐受能力、肠道菌群的竞争抑制以及宿主基因及体征因素等<sup>[28]</sup>。目前, 尽管各种体外评估模型、示踪技术已被应用于乳酸菌在复杂肠道环境中的定植数量及位置, 但乳酸菌在肠道的黏附定植机制尚未探明。对于3株*L. paracasei*表面黏附素基因的定位有利于推定其假定的黏附因子, 并通过进一步的实验验证其是否能与黏液层蛋白和细胞外基质等黏附受体发生特异性或非特异性结合。

表2 3株*L. paracasei*的蛋白类黏附素

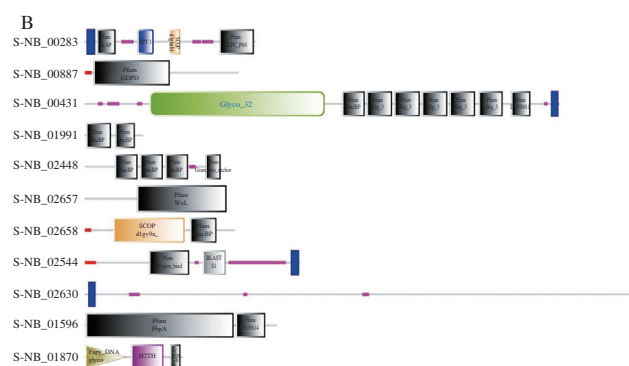
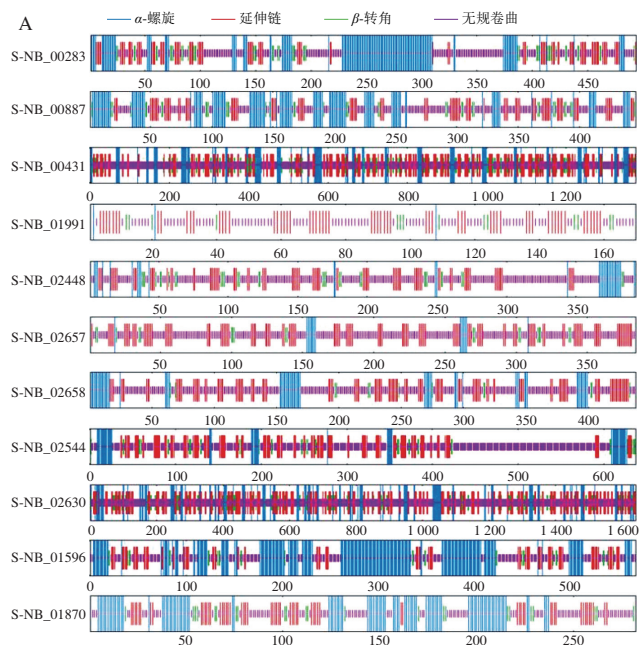
菌株	基因	登录号	Pfam_结构域名称	Pfam_结构域描述
ZY-1	assembly_00291	PF03217.11	SLAP	细菌表层蛋白
ZY-1	assembly_00894	PF03217.11	SLAP	细菌表层蛋白
S-NA5	assembly_00282	PF03217.11	SLAP	细菌表层蛋白
S-NA5	assembly_00886	PF03217.11	SLAP	细菌表层蛋白
S-NB	assembly_00283	PF03217.11	SLAP	细菌表层蛋白
S-NB	assembly_00887	PF03217.11	SLAP	细菌表层蛋白
ZY-1	assembly_00447	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
ZY-1	assembly_02049	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
ZY-1	assembly_02533	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
ZY-1	assembly_02731	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
S-NA5	assembly_00430	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
S-NA5	assembly_01989	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
S-NA5	assembly_02446	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
S-NA5	assembly_02655	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
S-NA5	assembly_02656	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
S-NB	assembly_00431	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
S-NB	assembly_01991	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
S-NB	assembly_02448	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
S-NB	assembly_02657	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
S-NB	assembly_02658	PF06458.9	MucBP	MucBP结构域
ZY-1	assembly_02624	PF05737.9	Collagen_bind	胶原蛋白结合域
S-NA5	assembly_02542	PF05737.9	Collagen_bind	胶原蛋白结合域
S-NA5	assembly_02628	PF05737.9	Cbp	胶原蛋白结合域
S-NB	assembly_02544	PF05737.9	Cbp	胶原蛋白结合域
S-NB	assembly_02630	PF05737.9	Cbp	胶原蛋白结合域
ZY-1	assembly_01656	PF05833.8	FbpA	纤连蛋白结合蛋白A
ZY-1	assembly_01927	PF05833.8	FbpA	纤连蛋白结合蛋白A
S-NA5	assembly_01595	PF05833.8	FbpA	纤连蛋白结合蛋白A
S-NA5	assembly_01868	PF05833.8	FbpA	纤连蛋白结合蛋白A
S-NB	assembly_01596	PF05833.8	FbpA	纤连蛋白结合蛋白A
S-NB	assembly_01870	PF05833.8	FbpA	纤连蛋白结合蛋白A

由于3株菌株的蛋白类黏附素基因保守性较高, 选取S-NB的黏附蛋白基因编码产物进行理化性质的

分析, 由ExPASy工具在线完成。11种黏附蛋白基因性质见表3, 其氨基酸长度在170~1700个氨基酸之间, S-NB\_01991是其中分子量最小的蛋白(18965.52 Da)。11种黏附蛋白中, S-NB\_00283和S-NB\_02544的不稳定指数大于40, 为不稳定蛋白, 易降解, 其他9种均为较稳定蛋白; 11种蛋白均为亲水性蛋白, 且除S-NB\_01596和S-NB\_01870外, 其余蛋白的等电点均小于7, 脂肪指数略有差别。进一步通过SOPMA分析了黏附蛋白的二级结构和功能结构域, 11种黏附蛋白均含有 $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角和无规卷曲的二级结构, 以 $\alpha$ -螺旋和无规卷曲为主(图6A)。SMART分析结果表明, S-NB\_00283和S-NB\_02630的C端含有跨膜区, S-NB\_00283含有SLAP结构域, S-NB\_00431和S-NB\_02448分别含有5个和3个重复蛋白序列(图6B)。

表3 *L. paracasei* S-NB黏附蛋白基因编码产物的一般性质  
Table 3 General properties of the products encoded by the adhesion protein genes from *L. paracasei* S-NB

基因	结构域名称	氨基酸长度	理论等电点	分子量/Da	不稳定指数	亲水性	脂肪族氨基酸指数
S-NB_00283	SLAP	494	4.93	49608.51	40.52	-0.120	68.24
S-NB_00887	SLAP	446	5.93	49788.71	29.23 (稳定)	-0.108	99.93
S-NB_00431	MucBP	1376	4.65	146910.75	16.61 (稳定)	-0.412	70.69
S-NB_01991	MucBP	170	6.54	18965.52	25.81 (稳定)	-0.282	86.53
S-NB_02448	MucBP	393	5.03	41580.44	25.43 (稳定)	-0.238	76.41
S-NB_02657	MucBP	384	5.01	42345.75	16.41 (稳定)	-0.620	66.51
S-NB_02658	MucBP	438	6.18	48669.13	25.44 (稳定)	-0.521	63.01
S-NB_02544	Cbp	637	6.79	66999.50	40.07	-0.330	70.64
S-NB_02630	Cbp	1641	5.08	178012.70	23.01 (稳定)	-0.538	71.96
S-NB_01596	FbpA	567	9.21	64287.19	35.72 (稳定)	-0.585	84.32
S-NB_01870	FbpA	282	9.30	31844.46	36.17 (稳定S-NB)	-0.476	87.48



A. S-NB黏附蛋白基因编码产物的二级结构分析;  
B. S-NB黏附蛋白基因编码产物的功能结构域分析。  
图6 *L. paracasei* S-NB黏附蛋白基因编码产物的二级结构和功能结构域分析

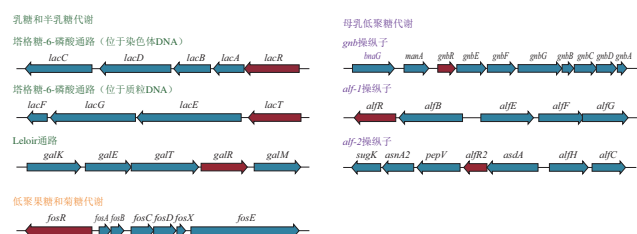
Fig. 6 Secondary structure and functional domain analysis of the products encoded by the adhesion protein genes from *L. paracasei* S-NB

### 2.4 糖代谢途径分析

*L. paracasei*已被报道可以发酵多种单糖和双糖, 如葡萄糖、果糖、半乳糖、塔格糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖等, 具有丰富的糖代谢途径<sup>[1]</sup>。根据基因组测序信息, 3株菌的糖代谢相关基因簇具备高度保守性, 其中常见的乳糖和半乳糖代谢、低聚果糖和菊糖代谢以及母乳低聚糖(human milk oligosaccharide, HMO)代谢途径相关基因簇如图7所示(由于3株菌的各基因簇均一致, 故仅用一幅图展示其合成基因簇)。作为牛乳中的主要碳水化合物, 乳糖是乳酸菌生长的重要碳源。3株菌株通过磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)依赖性乳糖特异性磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)代谢乳糖, 该系统的相关基因常位于染色体DNA或质粒上。其中, 3株菌的塔格糖-6-磷酸途径(*lacR*、*lacA*、*lacB*、*lacD*和*lacC*)均位于染色体DNA上(表4), 编码半乳糖-6-磷酸异构酶的*lacA*和*lacB*是诱导半乳糖-6-磷酸转化为塔格糖-6-磷酸的关键酶。*lacTEGF*分别位于质粒pLPZ1、pLPA3和pLPB1上。Leloir途径有助于细菌的乳糖和半乳糖分解代谢, 该途径由半乳糖激酶基因*galK*、UDP-半乳糖4-差向异构酶基因*galE*、半乳糖-1磷酸尿苷酰转移酶基因*galT*、半乳糖诱变酶基因*galM*和阻遏蛋白*galR*组成。多数乳酸菌仅通过Leloir途径或塔格糖-6-磷酸途径代谢半乳糖, 如嗜热链球菌和肠膜明串珠菌株只存在Leloir途径<sup>[29]</sup>。低聚果糖(fructo-oligosaccharide, FOS)的代谢主要包括*msm*(multiple sugar metabolism)、*fos*和*ptsBCA*操纵子3种途径。前人的研究表明*msm*操纵子参与嗜酸乳杆菌NCFM对FOS的代谢, 而蔗糖PTS转运系统(*ptsBCA*)参与植物乳植杆菌WCSF1的短链低聚果糖的代谢<sup>[30-31]</sup>。3株*L. paracasei*对FOS的代谢则不同于嗜酸乳杆菌NCFM和植物乳植杆菌WCSF1, *fosRABCDXE*操纵子起到重要作用(表5)。其中*fosE*是



$\beta$ -果糖苷酶前体基因,负责FOS的胞外水解,并通过C末端区域的LPQAG细胞壁锚定基序定位于细胞壁上。与双歧杆菌相比,关于乳酸杆菌的HMO的代谢研究相对有限。在3株 *L. paracasei* 中发现半乳糖-N-二糖 (galacto-N-biose, GNB) 代谢途径,菌株通过 *gnbREFGBCDA* 基因簇分解代谢GNB,乳-N-二糖 (lacto-N-biose, LNB) 和 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) (表6)。*L. paracasei* BL23 的 *gnbC* 和 *ptsI* 缺失突变株无法利用GNB和LNB,证实了BL23对GNB和LNB的转运和磷酸化是通过 *PTSGnb* 完成的。此外, *bnag* 位于 *gnbREFGBCDA* 基因簇的上游,负责乳糖-N-丙糖II的利用,而 *manA* 则被确认参与了3'-N-乙酰氨基葡萄糖-甘露糖的甘露糖部分的代谢。岩藻糖基化HMO在HMO中的比例高达35%~50%,研究表明其可促进肠道微生物的生长,维持婴儿的肠道平衡,免受腹泻等疾病的侵扰<sup>[32]</sup>。在3株 *L. paracasei* 中均发现 *alf-1* 操纵子参与 fucosyl- $\alpha$ -1,3-N-acetylglucosamine (3FN) 的代谢,编码 *alfEFG* 和  $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶 *alfB*, *alfR* 则位于上游负责转录调控 (表7)。另外, *alf-2* 基因簇参与6'FN-Asn的分解代谢,该基因簇包括糖基酶基因 *sugK*、糖基天冬氨酸酶基因 *asnA2*、肽酶基因 *pepV*、转录调节基因 *alfR2*、天门冬氨酸-4-脱羧酶基因 *asdA*、渗透酶基因 *alfH* 和岩藻糖苷酶基因 *alfC* (表8)。因此,3株菌具备完善的乳糖和半乳糖、FOS和菊糖以及HMO的代谢途径。



*lacR*. 调控基因; *lacA*. 半乳糖-6-磷酸异构酶亚基LacA; *lacB*. 半乳糖-6-磷酸异构酶亚基LacB; *lacD*. 塔格糖-二磷酸果糖酶; *lacC*. 塔格糖-6-磷酸激酶; *lacT*. 转录反终止因子; *lacE*. PTS转运亚基EIIIC; *lacG*. 6-磷酸- $\beta$ -半乳糖苷酶; *lacF*. PTS乳糖/纤维素二糖转运蛋白亚基。 *galK*. 半乳糖激酶; *galE*. UDP-葡萄糖4-差向异构酶; *galT*. 半乳糖-1P尿苷酰转移酶; *galR*. 调控基因; *galM*. 半乳糖差向异构酶; *fosR*. 转录调控因子; *fosA*. 果糖/甘露糖PTS IIA; *fosB*. 果糖/甘露糖PTS IIB组分; *fosC*. 果糖/甘露糖PTS IIC组分; *fosD*. 果糖/甘露糖PTS IID组分; *fosX*. 假定蛋白; *fosE*.  $\beta$ -果糖苷酶前体; *bnag*. 负责乳糖-N-三糖II的利用; *bnag*. 乳糖-N-乙糖苷酶; *manA*. 甘露糖-6-磷酸异构酶; *gnbR*. GntR家族转录调控因子; *gnbE*. 半乳糖胺-6-磷酸异构脱氨酶; *gnbF*. N-乙酰半乳糖胺-6-磷酸脱乙酰酶; *gnbG*. 磷酸- $\beta$ -半乳糖苷酶; *gnbB*. PTS糖转运亚基IIB; *gnbC*. PTS糖转运亚基IIC; *gnbD*. PTS糖转运亚基IID; *gnbA*. PTS糖转运亚基IIA; *alfE*. PTS 3FN转运亚基IIAB; *alfF*. PTS 3FN转运亚基IIC; *alfG*. PTS 3FN转运亚基IID。

图7 3株 *L. paracasei* 的碳水化合物摄取和代谢分析

Fig. 7 Analysis of carbohydrate uptake and metabolism in three *L. paracasei* strains

表4 3株 *L. paracasei* 的乳糖及半乳糖的摄取和代谢

Table 4 Lactose and galactose uptake and metabolism in three *L. paracasei* strains

菌株/质粒	塔格糖-6磷酸途径 (lacR-lacC) 定位	塔格糖-6磷酸途径 (lacT-lacF) 定位	Leloir途径 (galK-galM) 定位
ZY-1	777 937~781 802	/	765 918~771 841
S-NA5	781 797~785 662	/	769 778~775 701
S-NB	781 796~785 661	/	769 777~775 700
质粒pLPZ1	/	7 769~12 336	/
质粒pLPA3	/	671~5 238	/
质粒pLPB1	/	16 577~21 144	/

表5 3株 *L. paracasei* 的低聚果糖及菊糖代谢

Table 5 FOS and inulin metabolism gene clusters in three *L. paracasei* strains

菌株	<i>fosR-fosE</i> 定位	FosE氨基酸长度	FosE中Glyco_32结构域定位	FosE的跨膜区定位
ZY-1	446 941~457 389	1 376	188~694	1 269~1 288
S-NA5	438 205~448 653	1 376	188~694	1 350~1 369
S-NB	438 205~448 653	1 376	188~694	1 350~1 369

表6 3株 *L. paracasei* 的 *gnb* 操纵子

Table 6 *gnb* operons in three *L. paracasei* strains

菌株	<i>bnag</i>	<i>manA</i>	<i>gnbR</i>	<i>gnbE</i>	<i>gnbF</i>	<i>gnbG</i>	<i>gnbB</i>	<i>gnbC</i>	<i>gnbD</i>	<i>gnbA</i>	基因簇定位
ZY-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	306 481~317 673
S-NA5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	301 518~312 710
S-NB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	301 518~312 710

表7 3株 *L. paracasei* 的 *alf-1* 操纵子

Table 7 *alf-1* operons in three *L. paracasei* strains

菌株	<i>alfR</i>	<i>alfB</i>	<i>alfE</i>	<i>alfF</i>	<i>alfG</i>	基因簇定位
ZY-1	1	1	1	1	1	2 854 606~2 859 506
S-NA5	1	1	1	1	1	2 810 374~2 815 274
S-NB	1	1	1	1	1	2 811 428~2 816 328

表8 3株 *L. paracasei* 的 *alf-2* 操纵子

Table 8 *alf-2* operons in three *L. paracasei* strains

菌株	<i>sugK</i>	<i>asnA2</i>	<i>pepV</i>	<i>alfR2</i>	<i>asdA</i>	<i>alfH</i>	<i>alfC</i>	基因簇定位
ZY-1	1	1	1	1			1	2 976 499~2 984 990
S-NA5	1	1	1	1			1	2 931 998~2 940 489
S-NB	1	1	1	1			1	2 933 052~2 941 543

### 3 结论

本研究从西藏灵菇中分离得到1株 *L. paracasei* ZY-1, 从新疆老酸奶中分离出 *L. paracasei* S-NA5 和 *L. paracasei* S-NB 菌株, 对3株 *L. paracasei* 的表面特性、耐受胃肠液消化特性以及黏附Caco-2细胞的能力差异进行评价, 其中S-NB菌株表现出较好的黏附Caco-2细胞能力。基于全基因组测序技术比较分析了3株菌的基因组信息, 同时通过生物信息学分析对3株菌的EPS合成基因簇、LTA合成相关基因以及蛋白类黏附素进行预测, 在基因种类和数目方面各具差异, 菌株ZY-1的 *epsI* 含有25个基因片段, 多于S-NA5和S-NB的 *epsI* 中的基因数量, 可能与其EPS合成的复杂性具有直接联系, 而推测发挥辅

助合成作用的 $eps2$ 在3株菌中的同源性高达100%。3株菌的LTA合成基因簇同样显示出高度保守性。此外,蛋白类黏附素作为乳酸菌黏附到肠上皮细胞、黏液和细胞外基质上的重要介质,其合成途径至关重要,3株菌的黏附蛋白相关基因的比对结果表明,同一来源的S-NA5和S-NB菌株的黏附蛋白相关基因高度保守。碳水化合物代谢途径分析表明3株菌均具备完善的乳糖和半乳糖、FOS和菊糖以及HMO代谢途径,且基因簇比对结果一致。目前,关于非人源的乳酸菌在人体胃肠道的黏附定植机制尚不清楚,对于黏附相关基因的研究也十分有限。针对3株*L. paracasei*的黏附相关基因的系统挖掘有望为其胃肠道黏附、定植机制的解析及体内递送的研究提供支持。下一步的研究将侧重于构建黏附相关基因缺失突变株,评估不同黏附基因的缺失对菌株在体外黏附模型及体内肠道定植的影响,将基因型与菌株表型及功能建立直接联系。

#### 参考文献:

- [1] CUI Y H, QU X J. Genetic mechanisms of prebiotic carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria: emphasis on *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus paracasei* as flexible, diverse and outstanding prebiotic carbohydrate starters[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 115: 486-499. DOI:10.1016/j.tifs.2021.06.058.
- [2] SUN E, ZHANG X M, ZHAO Y F, et al. Beverages containing *Lactobacillus paracasei* LC-37 improved functional dyspepsia through regulation of the intestinal microbiota and their metabolites[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(6): 6389-6398. DOI:10.3168/jds.2020-19882.
- [3] LV X C, CHEN M, HUANG Z R, et al. Potential mechanisms underlying the ameliorative effect of *Lactobacillus paracasei* FZU103 on the lipid metabolism in hyperlipidemic mice fed a high-fat diet[J]. Food Research International, 2021, 139: 109956. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109956.
- [4] 占萌, 李春, 李慧臻, 等. 乳酸菌黏附肠道上皮细胞的研究进展[J]. 中国食品学报, 2020, 20(11): 341-350. DOI:10.16429/j.1009-7848.2020.11.038.
- [5] RUIZ L, HEVIA A, BERNARDO D, et al. Extracellular molecular effectors mediating probiotic attributes[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 359(1): 1-11. DOI:10.1111/1574-6968.12576.
- [6] CLAES I J J, LEBEER S, SHEN C, et al. Impact of lipoteichoic acid modification on the performance of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in experimental colitis[J]. Clinical & Experimental Immunology, 2010, 162(2): 306-314. DOI:10.1111/j.1365-2249.2010.04228.x.
- [7] DU Y, LI H, XU W L, et al. Cell surface-associated protein elongation factor Tu interacts with fibronectin mediating the adhesion of *Lactobacillus plantarum* HC-2 to *Penaeus vannamei* intestinal epithelium and inhibiting the apoptosis induced by LPS and pathogen in Caco-2 cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 224: 32-47. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.11.252.
- [8] LU Y M, HAN S Y, ZHANG S B, et al. The role of probiotic exopolysaccharides in adhesion to mucin in different gastrointestinal conditions[J]. Current Research in Food Science, 2022, 5: 581-589. DOI:10.1016/j.crf.2022.02.015.
- [9] XIAO L Y, YANG Y, HAN S, et al. Effects of genes required for exopolysaccharides biosynthesis in *Lactocaseibacillus paracasei* S-NB on cell surface characteristics and probiotic properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 224: 292-305. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.124.
- [10] WU J S, HAN X P, YE M Z, et al. Exopolysaccharides synthesized by lactic acid bacteria: biosynthesis pathway, structure-function relationship, structural modification and applicability[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(24): 7043-7064. DOI:10.1080/10408398.2022.2043822.
- [11] MENDE S, ROHM H, JAROS D. Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products[J]. International Dairy Journal, 2016, 52: 57-71. DOI:10.1016/j.idairyj.2015.08.002.
- [12] REHM B. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(8): 578-592. DOI:10.1038/nrmicro2354.
- [13] WHITFIELD C, WEAR S, SANDE C. Assembly of bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides[J]. Annual Review of Microbiology, 2020, 74: 521-543. DOI:10.1146/annurev-micro-011420-075607.
- [14] BRON P, VAN BAARLEN P, KLEEREBEZEM M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(1): 66-78. DOI:10.1038/nrmicro2690.
- [15] NILSEN N J, DEININGER S, NONSTAD U, et al. Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling: role of CD14 and CD36[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2008, 84(1): 280-291. DOI:10.1189/jlb.0907656.
- [16] GRANGETTE C, NUTTEN S, PALUMBO E, et al. Enhanced anti-inflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(29): 10321-10326. DOI:10.1073/pnas.0504084102.
- [17] MATSUGUCHI T, TAKAGI A, MATSUZAKI T, et al. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2003, 10(2): 259-266. DOI:10.1128/CDLI.10.2.259-266.2003.
- [18] MOHAMADZADEH M, PFEILER E A, BROWN J B, et al. Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(Suppl 1): 4623-4630. DOI:10.1073/pnas.100506610.
- [19] DESVAUX M, DUMAS E, CHAFSEY I, et al. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 256(1): 1-15. DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00122.x.
- [20] BUCK B L, ALTERMANN E, SVINGERUD T, et al. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8344-8351. DOI:10.1128/AEM.71.12.8344-8351.20.
- [21] 范郁冰, 肖荣, 李宗军. 乳酸菌S-层蛋白及其黏附性相关研究技术[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 294-297. DOI:CNKI:SUN:SPKX.0.2012-01-061.
- [22] HYMES J P, KLAENHAMMER T R. Stuck in the middle: Fibronectin-binding proteins in Gram-positive bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1504. DOI:10.3389/fmicb.2016.01504.

- [23] CHAGNOT C, LISTRAT A, ASTRUC T, et al. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components[J]. Cellular Microbiology, 2012, 14(11): 1687-1696. DOI:10.1111/cmi.12002.
- [24] SINGH B, FLEURY C, JALALVAND F, et al. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(6): 1122-1180. DOI:10.1111/j.1574-6976.2012.00340.x.
- [25] YADAV A K, TYAGI A, KAUSHIK J K, et al. Role of surface layer collagen binding protein from indigenous *Lactobacillus plantarum* 91 in adhesion and its anti-adhesion potential against gut pathogen[J]. Microbiological Research, 2013, 168(10): 639-645. DOI:10.1016/j.micres.2013.05.003.
- [26] LEHRI B, SEDDON A M, KARLYSHEV A V. *Lactobacillus fermentum* 3872 as a potential tool for combatting *Campylobacter jejuni* infections[J]. Virulence, 2017, 8(8): 1753-1760. DOI:10.1080/1505594.2017.1362533.
- [27] HYMES J P, JOHNSON B R, BARRANGOU R, et al. Functional analysis of an S-layer-associated fibronectin-binding protein in *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(9): 2676-2685. DOI:10.1128/AEM.00024-16.
- [28] 秦文飞, 宋馨, 夏永军, 等. 乳酸菌在肠道定植的影响因素及研究方法[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 275-283. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200811-140.
- [29] ISKANDAR C F, CAILLIEZ-GRIMAL C, BORGES F, et al. Review of lactose and galactose metabolism in lactic acid bacteria dedicated to expert genomic annotation[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 88: 121-132. DOI:10.1016/j.tifs.2019.03.020.
- [30] BARRANGOU R, ALTERMANN E, HUTKINS R, et al. Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(15): 8957-8962. DOI:10.1073/pnas.1332765100.
- [31] SAULNIER D M A, MOLENAAR D, DE VOS W M, et al. Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(6): 1753-1765. DOI:10.1128/AEM.01151-06.
- [32] SMILOWITZ J T, LEBRILLA C B, MILLS D A, et al. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate[J]. Annual Review of Nutrition, 2014, 34: 143-169. DOI:10.1146/annurev-nutr-071813-105721.