

弯曲乳杆菌与清酒乳杆菌的比较基因组学分析

何苗¹, 赵雨晴¹, 李居行¹, 葛佳琪¹, 陈盼婷¹, 应欣², 张连慧², 王昌禄¹, 李贞景¹, 郭庆彬¹, 刘欢欢^{1,*}
(1.天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457; 2.中粮营养健康研究院有限公司, 北京 102209)

摘要:本研究对19株弯曲乳杆菌 (*Latilactobacillus curvatus*) 和40株清酒乳杆菌 (*L. sakei*) 的基因组进行了比较分析。平均核苷酸同一性及全基因组共线性分析表明, *L. curvatus*和*L. sakei*基因组间的核酸序列同源性较弱, 可作为区分两个物种的指标。对两个物种分别构建泛基因组, 并对泛基因组中的核心基因功能进行注释。结果显示, *L. curvatus*和*L. sakei*各自的核心基因组主要涉及菌株的基础代谢。对菌株个体基因组的比对分析发现: 1) *L. curvatus*与*L. sakei*均含有广泛的糖苷水解酶类编码基因, 在分解和代谢膳食纤维类多糖、乳糖利用以及木质纤维素中具有丰富的基因资源; 2) 3个菌株含抗生素耐药性基因, 且来源于基因横向转移; 3) *L. sakei*特有的精氨酸脱亚胺酶途径、*L. curvatus*中的丝氨酸脱水酶途径及鸟嘌呤脱氨酶途径, 以及个别菌株中谷氨酸脱羧酶的发掘, 揭示了这两类菌不同的抗酸机制; 4) 冷应激蛋白编码基因的发现也赋予了这两类菌良好的冷加工特性。此外, 部分*L. sakei*基因组中含有编码lactocin S及凝集素相关的基因簇。总之, 本研究通过对*L. curvatus*及*L. sakei*进行基因组水平的比较和分析, 提供了两个物种之间的分类标准以及菌株个体上的差异信息, 为这两种乳酸菌的生理生化分子遗传机制研究以及工业应用奠定了基础。

关键词: 弯曲乳杆菌; 清酒乳杆菌; 基因组学; 泛基因组; 碳水化合物活性酶; 抗生素耐药性

Comparative Genomic Analysis of *Latilactobacillus curvatus* and *L. sakei*

HE Miao¹, ZHAO Yuqing¹, LI Juxing¹, GE Jiaqi¹, CHEN Panting¹, YING Xin², ZHANG Lianhui²,
WANG Changlu¹, LI Zhenjing¹, GUO Qingbin¹, LIU Huanhuan^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. COFCO Nutrition and Health Research Institute Co. Ltd., Beijing 102209, China)

Abstract: In this study, the genomes of 19 *Latilactobacillus curvatus* and 40 *L. sakei* strains were comparatively analyzed. Average nucleic acid identity (ANI) and genome-wide colinearity indicated that the genomes of *L. curvatus* and *L. sakei* had weak nucleotide sequence homology, allowing them to be used as indicators to distinguish the two species. Pangenomes for these species were constructed, whose core gene functions were annotated. The results showed that the core genomes of *L. curvatus* and *L. sakei* were mainly involved in their basic metabolism. Analysis of individual genomes of the strains revealed that 1) both *L. curvatus* and *L. sakei* contained a wide range of genes encoding glycoside hydrolases, which are abundant genetic resources for catabolizing and metabolizing dietary fiber such as polysaccharides, lactose utilization, and lignocellulose; 2) antibiotic resistance genes were annotated in the genomes of three strains, which originate from horizontal gene transfer; 3) the unique arginine deiminase pathway of *L. sakei*, the serine dehydratase and guanine deaminase pathways of *L. curvatus*, and the glutamate decarboxylase pathway of several strains were identified, revealing that the acid tolerance mechanisms of these two species are different; and 4) genes encoding cold stress proteins were discovered, which endow the two species with good cold processing properties. Moreover, the genomes of some *L. sakei* strains contained gene clusters related to the biosynthesis of lactocin S and condensin. In conclusion, this study established taxonomic criteria for the two species and information

收稿日期: 2023-04-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32072173); 天津市科技计划项目 (22YDTPJC00370; 21ZYJDJC00110)

第一作者简介: 何苗 (1999—) (ORCID: 0009-0005-6576-9632), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵食品与益生菌资源。

E-mail: hemiao@mail.tust.edu.cn

*通信作者简介: 刘欢欢 (1987—) (ORCID: 0000-0002-6381-1287), 男, 讲师, 博士, 研究方向为基因组学和群体遗传学。

E-mail: lh_tust@tust.edu.cn

on individual differences between their strains, which will provide a basis for the study of the physiological, biochemical, molecular genetic mechanisms of *L. curvatus* and *L. sakei* and their industrial applications.

Keywords: *Latilactobacillus curvatus*; *L. sakei*; genomics; pangenome; carbohydrate-active enzymes; antibiotic resistance

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230406-048

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0048-09

引文格式:

何苗, 赵雨晴, 李居行, 等. 弯曲乳杆菌与清酒乳杆菌的比较基因组学分析[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 48-56.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230406-048. <http://www.spkx.net.cn>

HE Miao, ZHAO Yuqing, LI Juxing, et al. Comparative genomic analysis of *Latilactobacillus curvatus* and *L. sakei*[J].

Food Science, 2024, 45(2): 48-56. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230406-048.

<http://www.spkx.net.cn>

弯曲乳杆菌 (*Latilactobacillus curvatus*) 和清酒乳杆菌 (*L. sakei*) 同为厚壁菌门、乳杆菌目、乳杆菌科、乳杆菌属中的两种益生菌, 近年来因其优良的发酵性能和对人体健康的益处而备受关注。*L. curvatus*最初于1903年由Troili-Petersson^[1]发现并命名为*Bacterium curvatum*; 1965年由Abo-Elnaga等^[2]更名为*Lactobacillus curvatus*; 2020年, 根据Zheng Jinshui等^[3]的研究, 通过对16S rRNA基因序列相似性、基因组间平均核苷酸同一性 (average nucleotide identity, ANI) 以及代谢、生态和功能特征的分析, 将其更新为*Latilactobacillus curvatus*。而*L. sakei*于1934年由Katagiri等^[4]从清酒中分离并命名为*Lactobacillus sakei*; 1996年Torriani等^[5]根据十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示的蛋白质分离模式, 将其分为两个亚群并总结了其生理生化特性的异同; 2020年Zheng Jinshui等^[3]将其名称更新为*Latilactobacillus sakei*。形态学上, *L. curvatus*与*L. sakei*同为革兰氏阳性菌, 无芽孢, 菌体杆状, 一般形成不透明乳白色凸起菌落。

在早期对菌株表型的研究中, *L. curvatus*和*L. sakei*通常被分为同一亚组^[6]。在后续的研究中, *L. curvatus*与*L. sakei*又以耐盐^[7-8]、耐酸^[9-10]以及耐低温^[8-9]闻名, 同时因其优异的细菌素生产能力而受到大量关注。除此之外, 由于极其相似的生理生化特性及生存环境, 二者在应用方面也广泛重合^[11-12], 在食品工业中常用于肉制品与蔬菜发酵^[13], 其抑菌性能也被应用于食品包装等领域^[12,14]。*L. curvatus*与*L. sakei*还具有多种益生菌功能, 如调节免疫^[15]、缓解炎症^[16]、改善代谢综合征^[17]以及缓解肥胖^[18]等。在代谢方面, *L. curvatus*与*L. sakei*也具有相似之处, 例如, 两者均可发酵葡萄糖与蔗糖^[19]、分解游离氨基酸并产生生物胺, 以及对恶劣环境表现出类似的耐受性。为区分这两类菌, Berthier等^[20]通过随机扩增多态性DNA标记分析以及生化分析, 将精氨酸的水解与蜜二糖的发酵判定为区分*L. curvatus*与*L. sakei*的重要标准; 而Petrick等^[21]开发了一种DNA探针Lc45, 其对*L. curvatus*具有一定的特异性, 从而能够将两菌种区分。

随着基因组测序水平的提高, 基于基因组的系统发育分析及物种鉴定越来越受到重视^[22]。基因组测序相较于传统的单位点测序显著降低了系统发育分析中位点

突变带来的随机误差, 同时能够使人们全面地理解微生物的营养特征、致病性、宿主特异性、次级代谢产物合成等表型变异的内在机制^[23]。一个物种内的基因组或一个分支内的所有菌株通常具有一个核心/保守组分以及一组可变的遗传物质, 在个体或种群之间称为“泛基因组”^[24]。核心基因组包含存在于所有菌株中的序列, 并且通常与物种的生物功能和关键表型特征相关。可变/附属基因组包含一个菌株或菌株子集所特有的序列, 且与物种对特定环境的适应性或个体独特的生物特征有关^[25]。因此, 构建微生物泛基因组有助于更好地了解该物种的群体特征和个体遗传变异之间的关系。

基于此, 本研究将对NCBI中收录的19个*L. curvatus*及40个*L. sakei*公开可用的基因组信息进行比较分析, 通过ANI以及基因组共线性分析对菌株进行区分; 并通过鉴定直系同源基因家族从而构建两株菌的泛基因组, 最终在基因组水平上阐释两种菌株之间的代谢差异。通过比较基因组水平的差异, 对二者表型中的异同进行解析, 为这两类菌的分类学研究、生理生化分子遗传机制研究以及工业应用方面奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所采用的数据均来自NCBI基因组数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genomes>)。通过检索*Latilactobacillus curvatus*和*L. sakei*, 筛选并下载组装完整且被标识为“reference”的基因组序列。

1.2 方法

1.2.1 基因组的ANI计算及基因组共线性分析

ANI是在核苷酸水平比较两个基因组亲缘关系的指标。本研究采用FastANI^[26]计算基因组间的ANI数值, 其中, 参数fragLen设定为500 bp。之后采用Chiplot在线工具绘制ANI层级聚类树及热图 (<https://www.chiplot.online>)。基因组共线性分析采用Minimap2^[27], 参数选择-c、-cx和asm5, 之后使用R语言包pafR对结果进行可视化。

1.2.2 直系同源基因的识别与计算

直系同源基因为共同祖先基因进化后在不同物种中具有相同功能的一类同源基因。直系同源基因的识别流程：1) 将菌株基因组序列文件以FASTA格式输入Prokka^[28]，进行结构注释，选择默认参数；2) 将获得的gff文件输入Roary^[29]软件，该软件从基因组注释文件中提取编码区，并将其转换为蛋白质序列，过滤去除部分不完整序列。同时，使用BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对其序列进行相似性（默认参数为95%）比对，并采用隐马尔可夫算法将蛋白序列进行聚类，生成直系同源基因家族。

1.2.3 泛基因组分析

根据Heap's Law（即随着更多基因组的加入，物种群体的核心基因组缩小，而泛基因组增大）^[30]，本研究将基因家族总基因数设为 y 、基因组数设为 x ，采用Origin软件对其关系进行拟合，公式如下： $y = Ax^b + C$ ；对于核心基因组部分的基因家族总数，设基因组数为 x ，基因家族数为 y ，拟合公式如下： $y = Aexp(Bx) + C$ 。

1.2.4 核心基因组功能分析

利用ProCAST^[31]管路对核心基因组蛋白序列，进行直系同源集（Clusters of Orthologous Groups, COG）、京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）、基因本体论（Gene Ontology, GO）、碳水化合物活性酶（Carbohydrate-

Active Enzyme, CAZyme）等功能注释、汇总及可视化分析，相似性阈值设定为40%。

1.2.5 次级代谢产物分析

采用antiSMASH^[32]本地化软件流程，对基因组注释产生的gbk文件进行次级代谢产物基因簇挖掘，参数采用--cb-general、--cb-subclusters、--cb-knownclusters、--asf以及--pfam2go。

1.2.6 耐药性分析

采用ABRicate流程（Seemann T, Abricate, <https://github.com/tseemann/abricane>），整合CARD、NCBI AMRFinderPlus数据库，对基因组注释产生的所有蛋白编码序列进行抗生素耐药性注释。并采用IslandViewer 4 (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer>) 对抗生素耐受菌株的基因组进行基因组岛分析，揭示耐药性基因的来源。

2 结果与分析

2.1 基因组基本信息

选择19株*L. curvatus*和40株*L. sakei*的完整组装基因组序列。根据图1结果，*L. curvatus*的基因组大小在1.849~2.176 Mb之间，平均大小为1.988 Mb，GC含量为41.7%~42.1%，编码基因数为1 917~2 254个。而*L. sakei*的基因组大小在1.825~2.119 Mb之间，平均大小

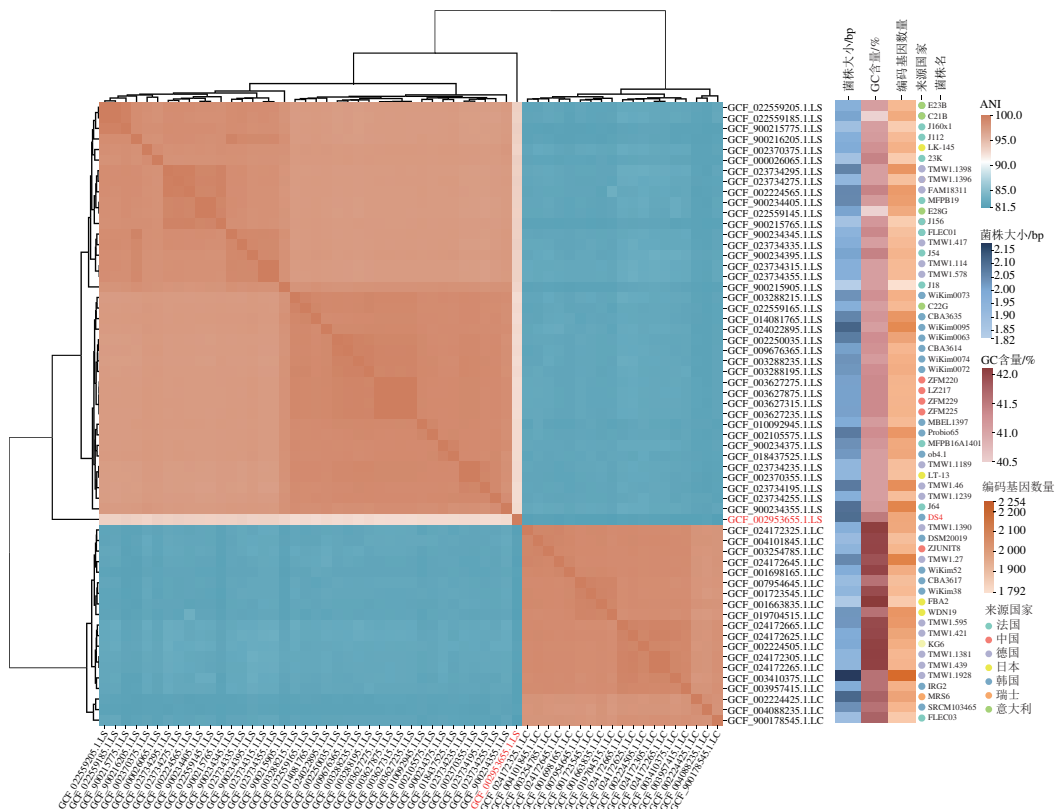


图1 *L. curvatus*与*L. sakei*基本信息及ANI热图

Fig. 1 Basic information and ANI heatmap of the genomes of *L. curvatus* and *L. sakei*

为2.005 Mb, GC含量为41.3%~41.41%, 编码基因数为2 001~2 173 个。

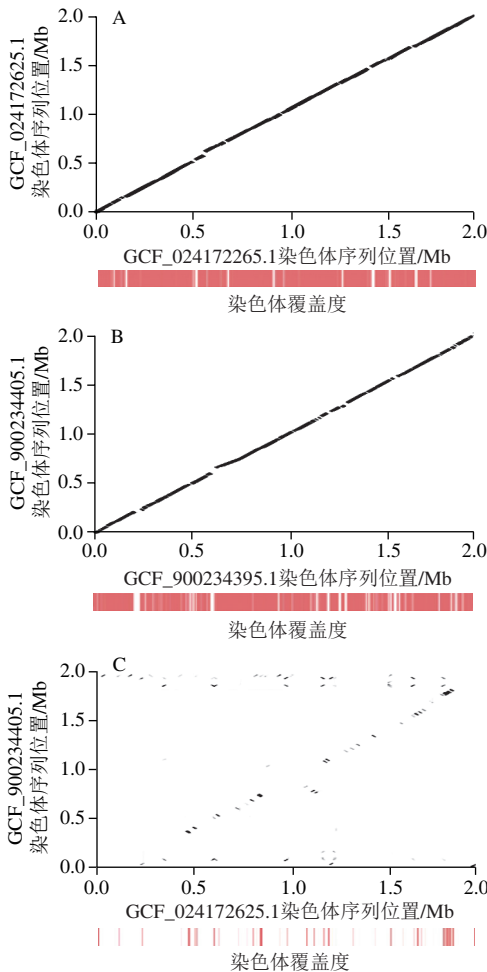
2.2 ANI分析

如图1所示, 19株*L. curvatus*与40株*L. sakei*被清晰地划分为两个独立分支。分支内基因组之间的ANI值大于95%, 而分支之间的两个基因组的ANI值小于85%。值得注意的是, *L. sakei* DS4 (编号GCF_002953655.1) 与其他*L. sakei*基因组的ANI值明显低于定义同一物种的95%分界值^[33], 表明该菌株可能被错误地分类, 因此在后续分析中将剔除该菌株。

2.3 共线性分析

*L. curvatus*与*L. sakei*物种内的基因组染色体有高度同源性(图2A、B), 但物种间的比对结果显示(图2C), 大片段同源基因较少且位置重合度低。通过基因组共线性分析可清晰判断*L. curvatus*与*L. sakei*在基因组的序列结构上表现出巨大差异, 染色体同源性较弱。

综上所述, ANI与基因组共线性分析可作为区分这两类菌株的重要指标。



A. *L. curvatus* GCF_024172625.1与*L. curvatus* GCF_024172265.1;
B. *L. sakei* GCF_900234395.1与*L. sakei* GCF_900234405.1;
C. *L. sakei* GCF_900234405.1与*L. curvatus* GCF_024172625.1。

图2 基因组共线性分析

Fig. 2 Genome collinearity analysis

2.4 菌株直系同源基因的鉴定与泛基因组构建

分别对*L. curvatus*与*L. sakei*两个种群的基因组进行直系同源基因家族的识别, 并构建泛基因组。如图3所示, 泛基因组被定义为基因家族的总和, 而核心基因家族被定义为存在于所有菌株个体中的保守序列基因家族。对于这两个物种, 随着基因组数量的增加, 泛基因组中包含的基因家族总数可以通过以下拟合公式描述:

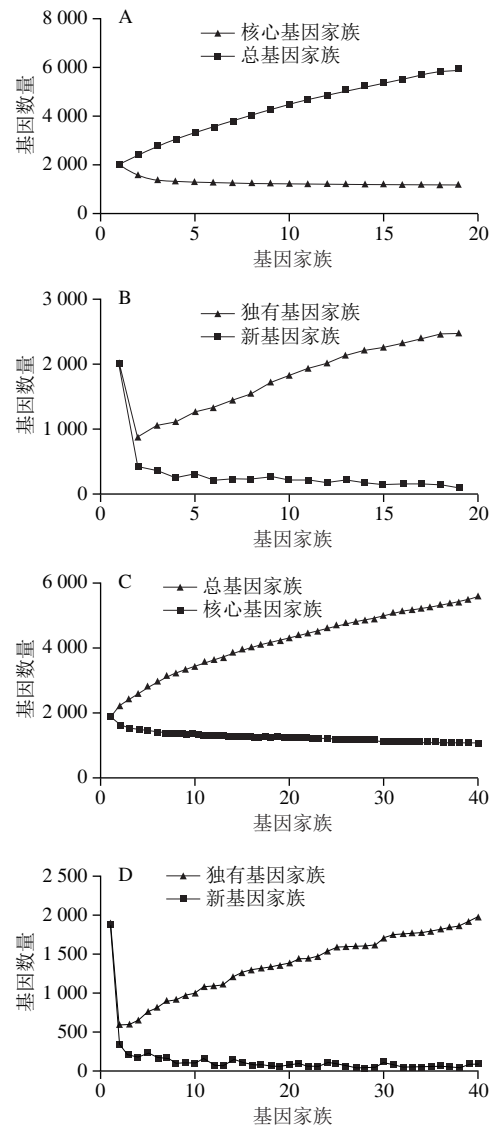
$$L. curvatus: y = 822x^{0.6} + 1\ 174 \quad (R^2 = 0.992) \quad (\text{图3A});$$

$$L. sakei: y = 856x^{0.45} + 1\ 047 \quad (R^2 = 0.969) \quad (\text{图3C}).$$

而核心基因家族的数量变化可以通过以下拟合公式描述:

$$L. curvatus: y = 1\ 496 \exp(-0.693\ 2x) + 1\ 237 \quad (R^2 = 0.956) \quad (\text{图3A});$$

$$L. sakei: y = 859 \exp(-0.158x) + 1\ 091 \quad (R^2 = 0.953) \quad (\text{图3C}).$$



A、C. *L. curvatus*、*L. sakei*种群的基因家族总数及核心基因家族数量变化;
B、D. *L. curvatus*、*L. sakei*种群的独有基因家族及新基因家族数量变化。

图3 *L. curvatus*与*L. sakei*种群的基因家族分布

Fig. 3 Gene family distribution of *L. curvatus* and *L. sakei*

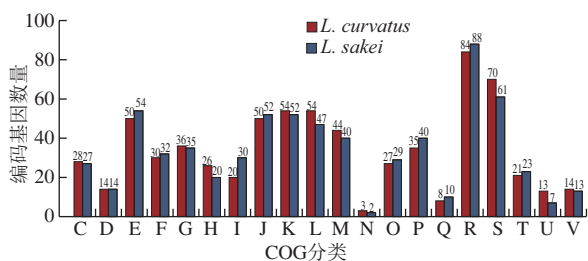
根据拟合方程与图3A、C可知,新基因组的加入导致*L. curvatus*与*L. sakei*总基因家族数呈指数型增长趋势,泛基因组呈现开放性特征,而核心基因家族在不断加入新的基因组后呈现平缓状态,数量稳定在1 237个及1 091个。图3B、D显示,随着基因组数目的增加,*L. curvatus*与*L. sakei*新基因家族的数目呈下降趋势,但并未趋向零,且菌株独有的基因家族数目呈持续上升趋势,这可能是造成泛基因组开放性的原因。开放的泛基因组意味着该物种具有较强的获得外源基因的能力,例如通过质粒载体或基因的水平转移等,实现较强的环境适应性^[34]。

2.5 核心基因组功能分析

种群核心基因组的序列保守性通常与基础代谢和生物功能密切相关,基于此,本研究对两个物种的核心基因组部分进行COG、KEGG以及GO注释,以揭示物种核心基因组的功能特征。

2.5.1 COG注释

*L. curvatus*与*L. sakei*的分别注释了619、613个基因,占核心基因组的63.88%、71.78%。如图4所示,除去一般功能预测(R)及未知功能(S),两个物种的核心基因组在氨基酸转运与代谢(E)、翻译、核糖体结构与生物合成(J)、转录(K)及复制、重组与修复(L)的保守基因家族较多。



C.能量产生与转化; D.细胞周期控制、细胞分裂、染色体分裂; E.氨基酸转运与代谢; F.核苷酸转运与代谢; G.碳水化合物运输和代谢; H.辅酶转运代谢; I.脂质运输和代谢; J.翻译、核糖体结构与生物合成; K.转录; L.复制、重组与修复; M.细胞壁、膜、被膜生物合成; N.细胞运动; O.翻译后修饰,蛋白质转换伴侣; P.无机离子转运与代谢; Q.次级代谢物生物合成转运与分解代谢; R.一般功能预测; S.未知功能; T.信号转导机制; U.细胞内运输、分泌和囊泡运输; V.防御机制。

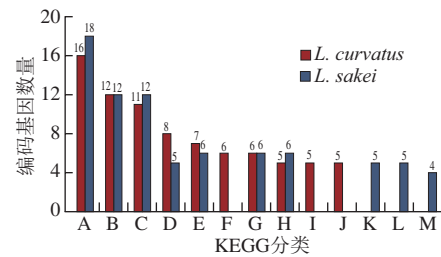
图4 *L. curvatus*与*L. sakei* COG功能注释

Fig. 4 COG functional annotation of *L. curvatus* and *L. sakei*

2.5.2 KEGG功能注释

*L. curvatus*与*L. sakei*分别注释了277、271个基因,占各自核心基因组的28.59%、31.73%。如图5所示,氨酰基-tRNA生物合成(A)、肽聚糖的生物合成(B)以及嘧啶代谢(C)等在维持菌体蛋白及核酸代谢、细胞壁合成等基础代谢方面具有高度的保守性。而*L. curvatus*中

的甘油酯代谢途径(F)、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成途径(I)与丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径(J)以及*L. sakei*中的脂肪酸生物合成途径(K)、磷酸戊糖途径(L)、牛磺酸和次牛磺酸代谢途径(M)方面表现出物种特异性。



A.氨酰基-tRNA生物合成; B.肽聚糖生物合成; C.嘧啶代谢; D.硫酸代谢; E.泛酸和辅酶A生物合成; F.甘油酯代谢; G.蒴类骨架生物合成; H.嘌呤代谢; I.苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成; J.丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; K.脂肪酸生物合成; L.戊糖磷酸途径; M.牛磺酸和次牛磺酸代谢。

图5 *L. curvatus*与*L. sakei* KEGG功能注释

Fig. 5 KEGG functional annotation of *L. curvatus* and *L. sakei*

2.5.3 GO功能注释分析

如图6所示,*L. curvatus*与*L. sakei*分别注释了636、608个基因,占核心基因组的65.63%、71.19%。涉及生物过程的转录调控、跨膜运输、氧化还原过程、蛋白水解作用等,在*L. curvatus*与*L. sakei*种群中均具有高度保守的基因序列。而*L. curvatus*种群在涉及硫酸生物合成的途径中具备独有的保守基因家族。在细胞组成中,*L. curvatus*与*L. sakei*在膜组分、膜、细胞质、核糖体、DNA聚合酶III复合物、质膜组分等方面均具有保守基因序列。在分子功能上,除共有的ATP结合、DNA结合、催化活性等保守基因外,*L. curvatus*拥有ATP酶活性、蛋白质结合相关的保守基因,*L. sakei*具有甲基转移酶活性以及核苷酸结合相关保守基因。

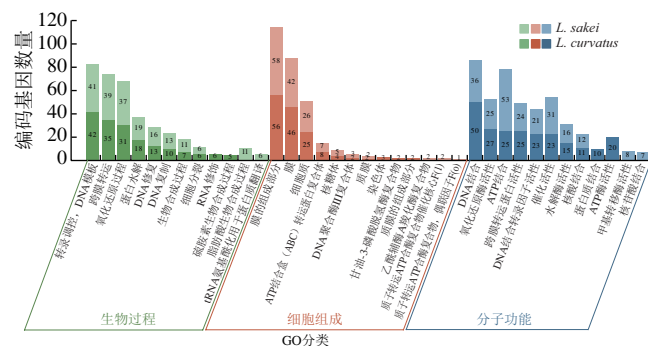


图6 *L. curvatus*与*L. sakei* GO功能注释

Fig. 6 GO functional annotation of *L. curvatus* and *L. sakei*

由上述COG、KEGG、GO功能注释可知，核心基因组，即每个种群包含的保守基因序列，大部分涉及该物种的初级代谢途径或模块，少量涉及其他途径。泛基因组的核心理论分析揭示了两个种群保守序列的功能特征，而作为食品发酵剂与肠道益生菌，*L. curvatus*与*L. sakei*的个体分析，如碳水化合物利用相关酶类(CAZyme)、抗生素耐药性及次级代谢产物等，则是体现菌株差异与工业应用潜力的重要指标。基于此，本研究鉴定了所有58个菌株基因组中的直系同源基因家族，并对其进行了缺失-存在变异分析及功能挖掘，同时，也针对基因组中潜在的次级代谢产物基因簇等信息进行了汇总分析。

2.6 菌株个体代谢差异分析

2.6.1 CAZyme编码基因分析

如图7所示，*L. curvatus*与*L. sakei*的基因组分别平均包含45、44个不同的CAZymes基因，分布在糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GH)、糖基转移酶(glycoside transferases, GT)、糖结合模块(carbohydrate binding modules, CBM)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CE)以及辅助活性(auxiliary activities, AA)蛋白家族中(图7A、B)。

GH是乳酸菌分解和代谢淀粉及膳食纤维类多糖的关键酶。其中，GH1、GH25及GH73家族在两个物种中的基因拷贝数均较高(图7C)。GH1家族中最常见的酶为可诱导降解纤维二糖的 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)，其属于纤维素酶类，能够水解结合于末端非还原性的 β -D-葡萄糖键，同时释放出 β -D-葡萄糖和相应的配基，在膳食纤维的降解中发挥重要作用，还可作为风味酶抑制剂参与到果汁与果酒的生产^[35]；豆奶中存在该酶能够转化高活性的大豆异黄酮苷元，有预防癌症的功效^[36]。GH25及GH73家族都包含溶菌酶(EC 3.2.1.17)，一类能水解细菌中黏多糖的碱性酶。溶菌酶可以通过水解肽聚糖导致细胞壁破裂，从而使细菌溶解，还可以与带负电荷的病毒蛋白结合形成复合体使病毒失活。由于对肽聚糖的敏感性，溶菌酶对革兰氏阳性菌如藤黄微球菌、枯草杆菌或溶壁微球菌等破坏力度更强^[37]。这赋予了*L. curvatus*与*L. sakei*一定的抑菌潜力。

在GH2、GH32家族中，多数*L. sakei*比*L. curvatus*具有更高的基因拷贝数(图7C)。GH2家族中重要成员为 β -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)，它是母乳/奶粉为主要营养来源的婴幼儿体内最重要的消化酶，通过解决人体乳糖不耐受发挥益生活性^[38]，且在食品工业中可用于生产低聚半乳糖。而GH32家族中的蔗糖酶(EC 3.2.1.26)主要用于水解蔗糖生成果糖与葡萄糖，但该家族只存在于*L. curvatus*的部分菌株中。

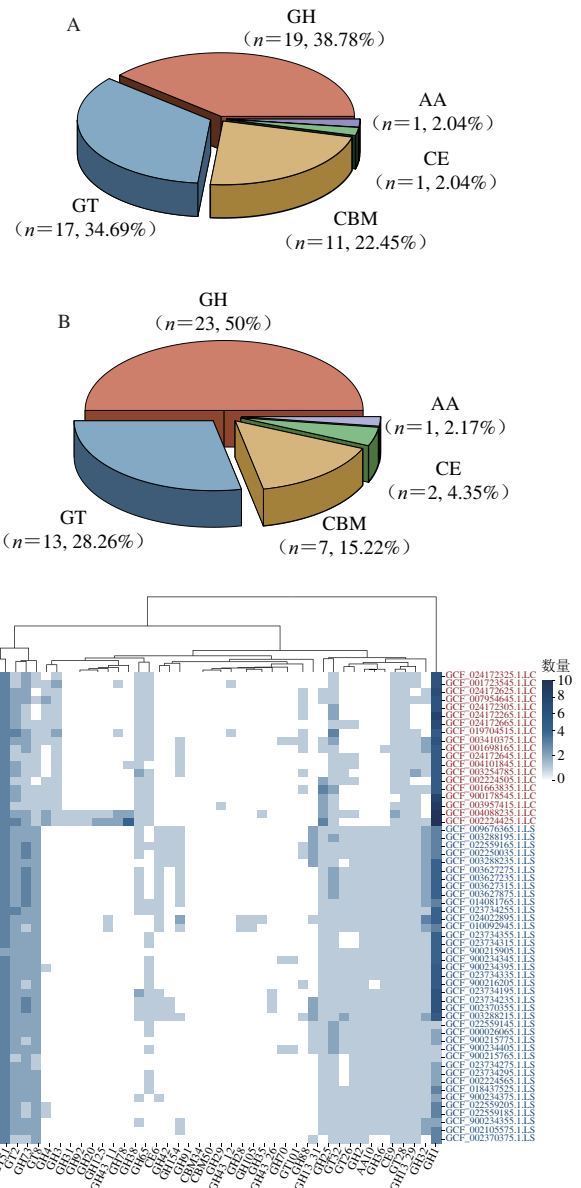


图7 CAZyme基因家族在*L. curvatus* (A)及*L. sakei* (B)个体中的占比及分布汇总 (C)

Fig. 7 CAZyme family distribution in *L. curvatus* (A) and *L. sakei* (B) and CAZyme encoding gene distribution (C)

在GH4及GH65家族中，*L. curvatus*比*L. sakei*具有更多基因拷贝(图7C)。GH4家族中存在可降解木聚糖类半纤维素成分的 α -葡萄糖醛酸酶(EC 3.2.1.139)，这可能是其多用作蔬菜发酵的原因之一。GH65家族的麦芽糖磷酸化酶(EC 2.4.1.8)能够分解代谢麦芽糖，表明*L. curvatus*对于麦芽糖代谢潜力更大。

2.6.2 抗生素耐药性基因注释

如表1所示，只有3株菌株拥有抗生素耐药性基因，表明大部分*L. curvatus*与*L. sakei*中抗生素耐药性风险较低。其中，*L. curvatus* ZJUNIT8(GCF_003254785.1)基因组中存在*lnuA*基因。*lnuA*编码一种质粒介导的核昔

酸转移酶^[39],可抑制林可酰胺在机体内的作用。林可酰胺(如林可霉素、克林霉素)通过抑制转肽酶反应来抑制肽链的早期延伸,作用类似于大环内酯类。此外,在*L. sakei* C22G(GCF_022559165.1)及*L. sakei* CBA3635(GCF_014081765.1)中发现了*tetM*基因,其编码一种核糖体保护蛋白,使微生物对四环素、强力霉素及米诺环素产生耐药性^[40]。

对上述基因组进一步分析发现,*L. curvatus* ZJUNIT8中的*lnuA*基因与*L. sakei* CBA3635中的*tetM*基因分别来自于质粒pnunamed3(NCBI编号:CP029969.1)与质粒pCBA3635;而*L. sakei* C22G(GCF_022559165.1)菌株中的*tetM*基因则来自其基因组岛(染色体位置1 829 586~1 862 258),且该基因组岛存在接合转移蛋白编码基因*TraG*以及转座子Tn552 DNA-转化酶基因*bin3*等序列,表明*tetM*可能源于外源转座子的接合转移。

表1 *L. curvatus*与*L. sakei*抗生素耐药性基因分布

分组	菌株号	菌株名	序列号	基因	基因编码号	抵抗物
<i>L. curvatus</i>	GCF_003254785.1	ZJUNIT8	DMEPIPMKI_02064	<i>lnuA</i>	M14039	林可霉素
<i>L. sakei</i>	GCF_014081765.1	CBA3635	GAFIKODM_02107	<i>tetM</i>	X75073	多西环素
	GCF_022559165.1	C22G	JPHPIKNE_01851			四环素

2.6.3 其他功能差异分析

在耐酸相关的基因中,乳酸菌中的*arcA*基因可编码精氨酸脱亚胺酶(arginine deiminase, ADI),该酶通过降解L-精氨酸,生成L-瓜氨酸、NH₃和ATP,从而提高胞内pH值,使菌株产生耐酸性。该基因在39株*L. sakei*中全部存在,并且为*L. sakei*菌株特有。ADI途径不仅为乳酸菌在酸性环境下的生存提供了分子保障,也提供了将精氨酸转化为能源的可能,使其在精氨酸含量高的基质(如肉类)中更具备代谢优势,这可能也是*L. sakei*更多应用于肉类发酵的机制之一。与之相比,19株*L. curvatus*中均发现了L-丝氨酸脱水酶编码基因*sdhA*和*sdhB*,其可将丝氨酸转化为丙酮酸和NH₃;其中17个菌株含有鸟嘌呤脱氨酶基因*guaD*,可将鸟嘌呤转化为黄嘌呤和NH₃。上述基因的存在,使得*L. curvatus*在ADI途径缺失的情况下同样具备抗酸能力。事实上,已有研究证实ADI途径为区分*L. curvatus*和*L. sakei*的重要标志^[41]。

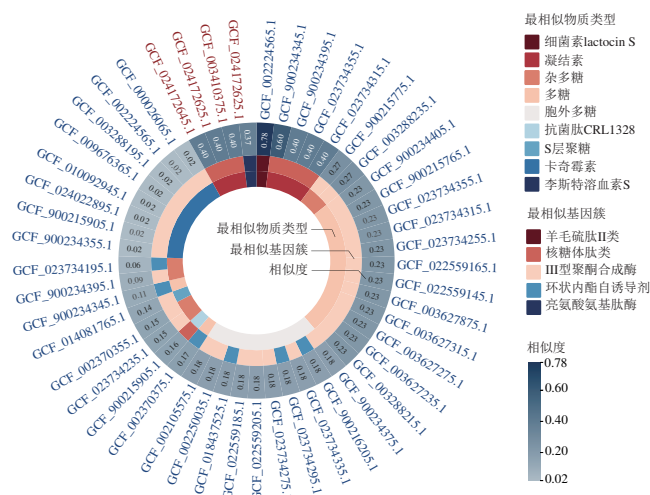
而在*L. curvatus* KG6(GCF_002224505.1)及*L. sakei* WiKim0074(GCF_003288235.1)中也发现了基因*gadB*,其编码的谷氨酸脱羧酶可裂解谷氨酸生成γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)。GABA是一种可以调节菌体酸性pH值的非蛋白质氨基酸,也是一种重要的中枢神经系统抑制性神经递质,具备改善机体睡眠质量、降血压等生理功效^[41]。已有研究证实个别*L. curvatus*与*L. sakei*菌株能够产生GABA,如*L. curvatus* K285^[42]、

L. sakei A156^[43]等,有学者分离出能将谷氨酸钠100%转化为GABA的菌株*L. sakei* B2-16^[44]。GABA的产生可赋予菌株更强的耐酸性和益生活性,在发酵食品中表现出较强的竞争力。

此外,本研究还发现,冷休克蛋白相关基因*CspA*、*CspB*及*CspC*存在于全部*L. curvatus*与*L. sakei*菌株中。冷休克蛋白作为RNA分子伴侣与mRNA结合从而维持细胞活力,在菌体适应低温环境和增强抗冻能力方面发挥重要作用。其中,*CspA*蛋白可在短时间内减轻细胞的冷冻损伤;*CspB*主要用于维持菌体生长、抵御低温及冷冻伤害并且可以提高稳定期菌体存活率;而*CspC*则可提高冷冻条件下菌体的生长恢复能力^[45]。上述基因的存在能够帮助*L. curvatus*与*L. sakei*在冷冻干燥相关的工艺过程中保持较高菌体活力。

2.7 次级代谢产物基因簇分析

如图8所示,次级代谢基因簇的分布呈菌株特异性。其中,*L. sakei* FLECO1(GCF_900234345.1)菌株中发现的RiPPs类型的基因簇序列与凝结素合成序列相似度为60%。凝结素作为一种对蛋白酶敏感的抗菌物质,对指示细胞表现出较高的杀菌和溶菌作用^[46]。同时,在*L. sakei* FAM18311(GCF_002224565.1)菌株中发现的基因簇与细菌素lactocin S合成序列相似度达78%。lactocin S是一种含有大量疏水氨基酸残基的多肽,属于I型细菌素,主要通过改变细胞膜通透性起到抑菌与缓慢杀菌作用^[47]。其他基因簇,如亮氨酸氨基肽酶、环内酯自身诱导肽和III型聚酮合成酶类产物基因簇,与李斯特溶血素S、胞外多糖类、抗菌肽CRL1328、杂多糖、S层聚糖以及卡奇霉素产物基因簇,在个别基因组中有发现,但与参考序列一致性得分较低(≤40%)。



红色菌株编号为*L. curvatus*;蓝色菌株编号为*L. sakei*。

图8 *L. curvatus*与*L. sakei*次级代谢产物基因簇分布

Fig. 8 Distribution of gene clusters encoding secondary metabolites in *L. curvatus* and *L. sakei*

3 结论

本研究采用比较基因组学技术对*L. curvatus*和*L. sakei*基因组进行ANI和全基因组共线性分析,对这两类菌株进行了物种区分。泛基因组构建结果显示,两个物种的泛基因组呈现开放性特征,两个种群的核心基因组主要涉及菌体基础代谢功能。在次级代谢产物基因簇和耐药性分析中,部分*L. sakei*基因组中发现了抑菌相关的lactocin S和凝结素基因簇,而抗生素耐药性基因只存在于3个菌株中,且来自横向转移。*L. curvatus*和*L. sakei*均含有广泛的GH类编码基因,可能在分解和代谢膳食纤维类多糖、乳糖和木质纤维素中发挥重要作用。此外,*L. sakei*特有的ADI途径和*L. curvatus*的丝氨酸脱水途径以及鸟嘌呤脱氨酶途径揭示了两类菌不同的耐酸机制,而冷应激蛋白相关基因的发现也赋予了两类菌株良好的冷加工特性。本研究为这两种重要乳酸菌的分类、生理生化分子遗传机制研究以及工业应用提供了基础。

参考文献:

- [1] TROILI-PETERSSON G. Studien über die mikroorganismen des schwedischen Güterkäses[M]. Zentralblatt für Bakteriologie II, 1903, 11: 137.
- [2] ABO-ELNAGA I G, KANDLER O. On the taxonomy of genus *Lactobacillus* Beijerinck. I. subgenus *Streptobacterium* Orla Jensen[J]. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, 1965, 119(1): 1-36.
- [3] ZHENG J S, WITTOUCK S, SALVETTI E, et al. A Taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(4): 2782-2858. DOI:10.1099/ijsem.0.004107.
- [4] KATAGIRI H, KITAHARA K, FUKAMI K, et al. The characteristics of the lactic acid bacteria isolated from moto, yeast mashes for saké manufacture[J]. Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1934, 10(10/11/12): 153-157. DOI:10.1080/03758397.1934.10857096.
- [5] TORRIANI S, VAN REENEN G A, KLEIN G, et al. *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* subsp. nov. and *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *sake* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *carnosus* subsp. nov., new subspecies of *Lactobacillus curvatus* Abo-Elnaga and Kandler 1965 and *Lactobacillus sake* Katagiri, Kitahara, and Fukami 1934 (Klein et al. 1996, emended descriptions), respectively[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(4): 1158-1163. DOI:10.1099/00207713-46-4-1158.
- [6] KLEIN G, DICKS L M T, PACK A, et al. Emended descriptions of *Lactobacillus sake* (Katagiri, Kitahara, and Fukami) and *Lactobacillus curvatus* (Abo-Elnaga and Kandler): numerical classification revealed by protein fingerprinting and identification based on biochemical patterns and DNA-DNA hybridizations[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(2): 367-376. DOI:10.1099/00207713-46-2-367.
- [7] KASK S, ADAMBERG K, ORLOWSKI A, et al. Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from estonian semi-hard cheese[J]. Food Research International, 2003, 36(9/10): 1037-1046. DOI:10.1016/j.foodres.2003.08.002.
- [8] MARCEAU A, ZAGOREC M, CHAMPOMIER-VERGES M C. Positive effects of growth at suboptimal temperature and high salt concentration on long-term survival of *Lactobacillus sakei*[J]. Research in Microbiology, 2003, 154(1): 37-42. DOI:10.1016/S0923-2508(02)00010-4.
- [9] ADIKARI A M M U, PRIYASHANTHA H, DISANAYAKA J N K, et al. Isolation, identification and characterization of *Lactobacillus* species diversity from *Meekiri*: traditional fermented buffalo milk gels in Sri Lanka[J]. Heliyon, 2021, 7(10): e08136. DOI:10.1016/j.heliyon.2021.e08136.
- [10] BARBIERI F, LAGHI L, MONTANARI C, et al. Insights into the metabolomic diversity of *Latilactobacillus sakei*[J]. Foods, 2022, 11(3). DOI:10.3390/foods11030477.
- [11] CHEN Y, LI N, ZHAO S X, et al. Integrated phenotypic-genotypic analysis of *Latilactobacillus sakei* from different niches[J]. Foods, 2021, 10(8): 1717. DOI:10.3390/foods10081717.
- [12] CHEN Y, YU L L, QIAO N Z, et al. *Latilactobacillus curvatus*: a candidate probiotic with excellent fermentation properties and health benefits[J]. Foods, 2020, 9(10): 1366. DOI:10.3390/foods9101366.
- [13] SUN F D, KONG B H, CHEN Q, et al. *N*-Nitrosoamine inhibition and quality preservation of Harbin dry sausages by inoculated with *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*[J]. Food Control, 2017, 73: 1514-1521. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.11.018.
- [14] GAO Y R, LI D P, LIU X Y. Effects of *Lactobacillus sakei* C2 and Sakacin C2 individually or in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*, chemical and odor changes of vacuum-packed sliced cooked ham[J]. Food Control, 2015, 47: 27-31. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.06.031.
- [15] JUNG J Y, SHIN J S, LEE S G, et al. *Lactobacillus sakei* K040706 evokes immunostimulatory effects on macrophages through TLR 2-mediated activation[J]. International Immunopharmacology, 2015, 28(1): 88-96. DOI:10.1016/j.intimp.2015.05.037.
- [16] RATHER I A, BAJPAI V K, HUH Y S, et al. Probiotic *Lactobacillus sakei* proBio-65 extract ameliorates the severity of imiquimod induced psoriasis-like skin inflammation in a mouse model[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1021. DOI:10.3389/fmicb.2018.01021.
- [17] LIU M M, CHEN Q Q, SUN Y L, et al. Probiotic potential of a folate-producing strain *Latilactobacillus sakei* LZ217 and its modulation effects on human gut microbiota[J]. Foods, 2022, 11(2): 234. DOI:10.3390/foods11020234.
- [18] YOO S R, KIM Y J, PARK D Y, et al. Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity[J]. Obesity (Silver Spring), 2013, 21(12): 2571-2578. DOI:10.1002/oby.20428.
- [19] ZHENG J S, RUAN L F, SUN M, et al. A genomic view of *Lactobacilli* and *Pediococci* demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(20): 7233-7243. DOI:10.1128/AEM.02116-15.
- [20] BERTHIER F, EHRlich S D. Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(3): 997-1007. DOI:10.1099/00207713-49-3-997.

- [21] PETRICK H A, AMBROSIO R E, HOLZAPFEL W H. Isolation of a DNA probe for *Lactobacillus curvatus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(2): 405-408. DOI:10.1128/aem.54.2.405-408.1988.
- [22] NAGY L G, SZOLLOSI G. Fungal phylogeny in the age of genomics: insights into phylogenetic inference from genome-scale datasets[J]. Advances in Genetics, 2017, 100: 49-72. DOI:10.1016/bs.adgen.2017.09.008.
- [23] SAN J E, BAICHO S, KANZI A, et al. Current affairs of microbial genome-wide association studies: approaches, bottlenecks and analytical pitfalls[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 3119. DOI:10.3389/fmicb.2019.03119.
- [24] BARBER A E, SAE-ONG T, KANG K, et al. *Aspergillus fumigatus* pan-genome analysis identifies genetic variants associated with human infection[J]. Nature Microbiology, 2021, 6(12): 1526-1536. DOI:10.1038/s41564-021-00993-x.
- [25] SIREN J, MONLONG J, CHANG X, et al. Pangenomics enables genotyping of known structural variants in 5202 diverse genomes[J]. Science, 2021, 374(6574): abg8871. DOI:10.1126/science.abg8871.
- [26] JAIN C, RODRIGUEZ R L, PHILLIPPY A M, et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 5114. DOI:10.1038/s41467-018-07641-9.
- [27] LI H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences[J]. Bioinformatics, 2018, 34(18): 3094-3100. DOI:10.1093/bioinformatics/bty191.
- [28] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. Bioinformatics, 2014, 30(14): 2068-2069. DOI:10.1093/bioinformatics/btu153.
- [29] PAGE A J, CUMMINS C A, HUNT M, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis[J]. Bioinformatics, 2015, 31(22): 3691-3693. DOI:10.1093/bioinformatics/btv421.
- [30] TETTELIN H, RILEY D, CATTUTO C, et al. Comparative genomics: the bacterial pan-genome[J]. Current Opinion in Microbiology, 2008, 11(5): 472-477. DOI:10.1016/j.mib.2008.09.006.
- [31] HAMMER Ø, HARPER D A, RYAN P D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis[J]. Palaeontologia Electronica, 2001, 4(1): 9.
- [32] BLIN K, SHAW S, STEINKE K, et al. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(W1): W81-W87. DOI:10.1093/nar/gkz310.
- [33] 钱文江, 汪步青, 李葭茜, 等. 凝结芽孢杆菌次级代谢挖掘与泛基因组分析[J]. 生物技术通报, 2020, 36(10): 88-98. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020-0097.
- [34] 钟朝芳. 基于微生物组大数据的物种多样性和异质性分析[D]. 武汉: 华中科技大学, 2021: 40-57. DOI:10.27157/d.cnki.ghzku.2021.002841.
- [35] 孙爱东, 葛毅强, 倪元颖, 等. 不同来源的增香酶解橙汁(皮)中键合态主要芳香物质的效果分析[J]. 食品与发酵工业, 2001(11): 1-4. DOI:10.3321/j.issn:0253-990X.2001.11.001.
- [36] 韩婷, 程钢, 刘莹, 等. β -葡萄糖苷酶以及益生菌生物转化大豆异黄酮糖苷的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 333-337.
- [37] 赵荣文, 谭丽萍, 刘同军. 溶菌酶及其应用研究进展[J]. 齐鲁工业大学学报, 2021, 35(1): 12-18. DOI:10.16442/j.cnki.qlydxxb.2021.01.003.
- [38] 张莉, 李庆章, 田雷. β -半乳糖苷酶研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(7): 128-131. DOI:10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2009.07.027.
- [39] LEE J H, JEONG D W. Characterization of mobile staphylococcus equorum plasmids isolated from fermented seafood that confer lincomycin resistance[J]. PLoS ONE, 2015, 10(10): e0140190. DOI:10.1371/journal.pone.0140190.
- [40] SANCHEZ-PESCADOR R, BROWN J T, ROBERTS M, et al. Homology of the *TetM* with translational elongation factors: implications for potential modes of *tetM*-conferred tetracycline resistance[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(3): 1218. DOI:10.1093/nar/16.3.1218.
- [41] 李科, 俞兰秀, 刘小雨, 等. γ -氨基丁酸改善睡眠作用机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 353-358. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2019.14.058..
- [42] LEE S J, JEON H S, YOO J Y, et al. Characterization of a novel glutamate decarboxylase (GAD) from *Lactobacillus curvatus* K285 isolated from gat-kimchi[J]. Food Science and Biotechnology, 2022, 31: 69-78. DOI:10.1007/s10068-021-01005-8.
- [43] SA H D, PARK J Y, JEONG S J, et al. Characterization of glutamate decarboxylase (GAD) from *Lactobacillus sakei* A156 isolated from jeot-gal[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(5): 696-703. DOI:10.4014/jmb.1412.12075.
- [44] KOOK M C, SEO M J, CHEIGH C I, et al. Enhancement of γ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus sakei* B2-16 expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917[J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2010, 53(6): 816-820. DOI:10.3839/jksabc.2010.123.
- [45] 王辉, 丁协刚, 李世文, 等. 冷休克蛋白的生物学功能研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2015, 9(8): 119-125.
- [46] HYRONIMUS B, LE MARREC C, URDACI M C. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* 14[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 85(1): 42-50. DOI:10.1046/j.1365-2672.1998.00466.x.
- [47] GILMORE M S, SKAUGEN M, NES I. Enterococcus faecalis cytolysin and lactocin S of *Lactobacillus sakei*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1996, 69(2): 129-138. DOI:10.1007/BF00399418.