

干酪乳杆菌 Zhang 分类学地位及潜在益生相关基因分析

孙佳琦^{1,2,3}, 李伟程^{1,2,3}, 钟智^{1,2,3}, 张和平^{1,2,3*}

¹ 内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018

² 内蒙古农业大学 农业农村部奶制品加工重点实验室 呼和浩特 010018

³ 内蒙古农业大学 内蒙古乳业生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要 干酪乳杆菌 Zhang 是本研究团队筛选出的具有优良特性的益生乳酸菌菌株。传统方法难以区分干酪乳杆菌及其近缘物种。因最近乳杆菌的系统分类进行了更新,故导致 Zhang 的分类地位需重新确认。本研究利用比较基因组学方法分析 Zhang 的分类学地位、耐药基因、致病性基因和环境抗性基因特征,探究该菌株基因组上携带的细菌素基因簇和潜在益生基因。比较基因组学结果显示 Zhang 与副干酪乳酪杆菌模式菌株 ATCC 25302^T 的平均核苷酸一致性值是 98.49%,通过分类学数据库比对和系统发育分析确认 Zhang 的分类学地位为副干酪乳酪杆菌。Zhang 的基因组不含有耐药基因、致病性基因和环境抗性基因。在其基因组上注释到核心肽、LanT 转运和引导切割及免疫或运输功能等 Carnocin 细菌素基因簇。此外,Zhang 的基因组编码了谷胱甘肽合成、核黄素合成、黏附因子和分泌胞外多糖等潜在益生基因。本研究更新了 Zhang 的分类学地位为副干酪乳酪杆菌,揭示其不含有耐药基因、致病性基因及环境抗性基因,并注释到多个潜在益生基因,为该菌株进一步开发及产业化提供了数据参考。

关键词 副干酪乳酪杆菌; 比较基因组学; 细菌素基因簇; 潜在益生基因

文章编号 1009-7848(2023)08-0014-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.002

副干酪乳酪杆菌作为乳杆菌科中具应用价值的菌种,是干酪乳酪杆菌和鼠李糖乳酪杆菌的近缘物种。副干酪乳酪杆菌是国家卫生健康委员会发布的可用于食品的菌种之一,其常用来制备益生菌和发酵乳制品制剂^[1]。然而,副干酪乳酪杆菌的系统命名和分类一直存在争议,特别是随着分类学技术的进步,该物种的模式株、系统分类和命名几经变迁^[2]。1989 年 Collins 等^[3]通过 DNA-DNA 杂交分析发现干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)中存在大量与模式菌株 ATCC 393^T 同源性较低而菌株间同源性较高的菌株,因此建议干酪乳杆菌阿拉伯糖亚种(*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus*)、干酪乳杆菌假植物亚种(*Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum*)、干酪乳杆菌坚韧亚种(*Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*)以及大部分的干酪乳杆菌干酪亚种(*Lactobacillus casei* subsp. *casei*)划分为一个新的独立菌种即副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)。2020 年副干酪乳杆

菌更名为副干酪乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus paracasei*),其模式菌株为 ATCC 25302^T,并保留了副干酪乳酪杆菌副干酪亚种(*L. paracasei* subsp. *paracasei*)和副干酪乳酪杆菌坚韧亚种(*L. paracasei* subsp. *tolerans*)2 个亚种^[4-5]。

干酪乳杆菌 Zhang (Zhang)是本研究团队于 2001 年从内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗大草原传统发酵酸马奶中分离得到的 1 株益生菌^[6-7],其具有较强耐人工胃液^[8]、胆盐消化^[9]、免疫调节^[10]、抗氧化^[11]等益生功能。2008 年,本研究团队经生理生化鉴定和 16S rDNA 序列分析将 Zhang 的分类学地位鉴定为干酪乳杆菌^[12-13]。干酪乳杆菌与其近缘物种间的亲缘关系错综复杂,基于传统的分类学方法和 16S rDNA 序列很难从种水平上进行区分^[14]。本研究团队于 2010 年完成了 Zhang 全基因组测序,其是我国第 1 株完成全基因组测序的乳酸菌菌株,经进一步比较基因组学分析确认其的分类学地位为副干酪乳酪杆菌^[15]。由于副干酪乳酪杆菌分类学地位的变迁和更新,Zhang 的分类学地位需进一步确认。此外,目前尚无关于该菌株耐药基因、致病性基因和环境抗性基因的研究,限制了其进一步开发和应用。

收稿日期: 2023-05-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(U22A20540)

第一作者: 孙佳琦,女,硕士生

通信作者: 张和平 E-mail: hepingdd@vip.sina

《益生菌的科学共识》(2020 版)中建议针对益生菌菌株的安全性评估,应基于全基因组测序生物信息分析,阐述待评价益生菌菌株所携带的耐药基因、致病性基因和环境抗性基因的特征^[16]。基于此,本研究利用比较基因组学方法解析 Zhang 的分类学地位和遗传背景,评估 Zhang 的耐药基因、致病性基因和环境抗性基因特征,揭示其基因组上携带的细菌素基因簇及潜在益生基因,旨在为菌株进一步开发及产业化提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 基因组序列下载

截至 2023 年 3 月 9 日,采用 ncbi-genome-download 软件将 NCBI (National Coalition Building Institute, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)Ref-seq 数据库中 318 株副干酪乳酪杆菌基因组完成图全部下载完成。

本研究团队前期已完成 Zhang 连续传代过程遗传稳定性的研究(已接收,未见刊),对第 0,25,50,75,100 代(每代 3 组平行)共 15 株菌进行了基因组测序和组装工作。

1.2 比较基因组分析

1.2.1 基因组信息统计 采用李伟程^[17]的方法,统计所有副干酪乳酪杆菌的基因组大小、GC 含量以及蛋白质编码区(Coding sequence, CDS)。

1.2.2 分类学地位分析和平均核苷酸一致性计算

本研究使用 blastall 软件^[18]将 Zhang 与 GTDB 数据库(<http://gtdbecogenomic.org/>)进行比对, e 值小于 $e \times 10^{-10}$ 。使用 fastANI 软件^[19]计算 335 株副干酪乳酪杆菌的平均核苷酸一致性(Average nucleotide identity, ANI)值,比对片段长度设置为 1 000。

1.2.3 核心基因系统发育树 使用 prokka 软件对菌株进行注释,通过 Roary^[20]软件分析得到的核心基因序列,采用 TreeBeST^[21]软件(<http://www.mybioinformatics.com/treebest/>)基于邻接法(Neighbor-joining, NJ)进行系统发育树构建,自举值为 1 000。通过 iTol 在线软件(<https://itol.embl.de/>)进行系统发育树可视化。

1.2.4 单核苷酸多态性(SNP)系统发育树的构建

本研究以副干酪乳酪杆菌 ATCC 334 的全基因

组完成图序列(GCF_000014525.1)作为参考基因组,使用 Snippy 软件^[22](V4.6.0)中 snippy-multi 组件计算副干酪乳酪杆菌群体的核心 SNP(Core-SNP)。

采用 TreeBeST^[21]软件(<http://www.mybioinformatics.com/treebest/>)中的邻接法进行系统发育树构建,自举值为 200。在 iTol 在线软件(<https://itol.embl.de/>)中进行系统发育树可视化。

1.2.5 耐药基因、致病性基因和环境抗性基因注释 将 Zhang 基因组序列分别上传至在线注释 CARD 数据库(<http://card.mcmaster.ca/>,采用 RGI5.1.0 软件中的 Perfect 和 Strict 算法为筛选标准)、ResFinder 数据库(<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder-4.1/>),序列相似性>90%,序列覆盖度>60%、VFDB 数据库(Virulence Factors of Pathogenic Bacteria,<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm/>),序列相似性>90%,序列覆盖度>60%和 VirulenceFinder 数据库(https://cge.food.dtu.dk/services/Virulence_Finder/),序列相似性>90%,序列覆盖度>60%进行注释耐药基因、致病性基因和环境抗性基因。

1.2.6 共线性分析 以副干酪乳酪杆菌 ATCC 334 为参考序列,使用 Mauve 软件^[23]分析 ATCC 334^T、Zhang 和 PC-01 之间的共线性关系。

1.2.7 细菌素基因簇分析 利用 BAGEL4 在线数据库(<http://bagel4.molgenrug.nl/index.php>),对 Zhang 中核糖体合成、翻译后修饰肽和细菌素产生基因簇进行注释^[24]。

1.2.8 潜在益生基因分析 参照刘旭等^[25]和吴琼等^[26]的方法利用 Prokka 软件对菌株基因组进行基因预测后,挖掘菌株潜在益生基因。

2 结果与讨论

2.1 基因组特征

本研究团队前期已完成 Zhang 的基因组测序和组装,发现 Zhang 包含 1 条染色体和 1 个质粒,其基因组大小为 2.90 Mb,GC 含量为 46.43%,其中染色体大小为 2.73 Mb,GC 含量为 46.51%;质粒大小为 36.08 kb,GC 含量为 39.65%,共包含了 2 694 个蛋白质编码区^[15]。

本研究团队前期完成的副干酪乳酪杆菌 PC-

01 的基因组测序及序组装^[27],发现基因组仅有 1 条染色体组成。其基因组大小为 2.82 Mb,GC 含量为 46.64%,包含了 2 738 个蛋白质编码区。王静等^[28]研究发现副干酪乳酪杆菌基因组大小为 2.38~3.29 Mb,平均为 2.98 Mb;GC 含量为 46.00%~46.60%,平均为 46.33%;平均包含了 2 777 个蛋白质编码区。本研究发现副干酪乳酪杆菌基因组大小为(2.87±0.15)Mb;GC 含量为(46.31±0.25)%;包含了 2 875.8±164.8 个蛋白质编码区。

2.2 分类学地位确定

GTDB 数据库使用相对进化差异来描述高等级的分类单元并划分物种集群、限定分类单元,因此该数据库可以实现基因组在物种水平的分类^[29]。本研究使用 GTDB 数据库对 Zhang 的分类学地位进行确定,结果显示其为副干酪乳酪杆菌。

ANI 通过在全基因组水平进行基因组的同源序列比对从而鉴定菌株的亲缘关系^[30]。比较基因组学中,一般将 ANI 值大于 95% 视为同一物种^[31]。结果显示近缘物种干酪乳酪杆菌 ATCC 393^T、鼠李糖乳酪杆菌 DSM 20021^T 与 334 株副干酪乳酪杆菌的 ANI 值小于 95%,333 株副干酪乳酪杆菌之间 ANI 值均大于 95%,表明其为同一物种。Zhang 与模式菌株 ATCC 25302^T 的 ANI 值是 98.49%,大于 95%,说明 Zhang 与副干酪乳酪杆菌 ATCC 25302^T 为同一物种。上述结果表明,Zhang 的分类学地位应为副干酪乳酪杆菌 (*Lacticaseibacillus paracasei*)。

2.3 系统发育分析

系统发育树可直观反映菌株间群体结构和遗传进化关系^[32]。为了分析 Zhang 与公共数据库中 318 株副干酪乳酪杆菌的系统发育关系,本研究以近缘物种干酪乳酪杆菌 ATCC 393^T 和鼠李糖乳酪杆菌 DSM 20021^T 作为外群,基于 59 个核心基因的核酸序列,通过邻接法构建系统发育树。由图 2a 可知,核心基因系统发育树分为 3 个大分支,分别为作为外群的干酪乳酪杆菌 ATCC 393^T、鼠李糖乳酪杆菌 DSM 20021^T 以及 333 株副干酪乳酪杆菌,表明不同物种在核心基因系统发育树上具有较大差异。此外,Zhang 与模式菌株副干酪乳酪杆菌 ATCC 25302^T 聚集在同一分支中,该结果支持 Zhang 为副干酪乳酪杆菌。Zhang 原始菌

表 1 Zhang 的 GTDB 数据库比对结果

Table 1 The alignment results of the GTDB database of Zhang

分类	Zhang
界	细菌界(Bacteria)
门	硬壁菌门(Firmicutes)
纲	芽孢菌纲(Bacilli)
目	乳杆菌目(Lactobacillales)
科	乳杆菌科(Lactobacillaceae)
属	乳酪杆菌属(<i>Lacticaseibacillus</i>)
种	副干酪乳酪杆菌(<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>)

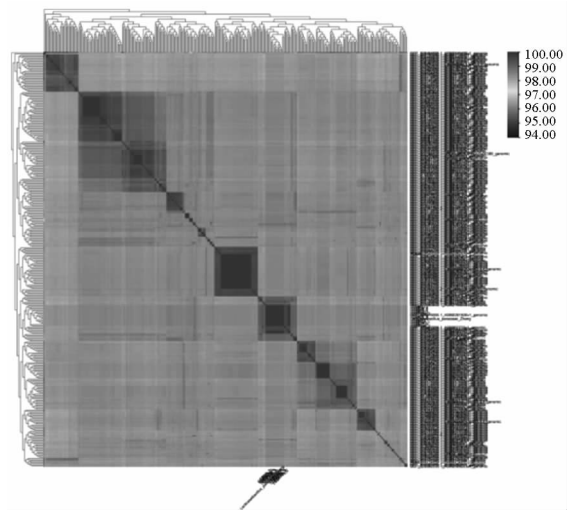


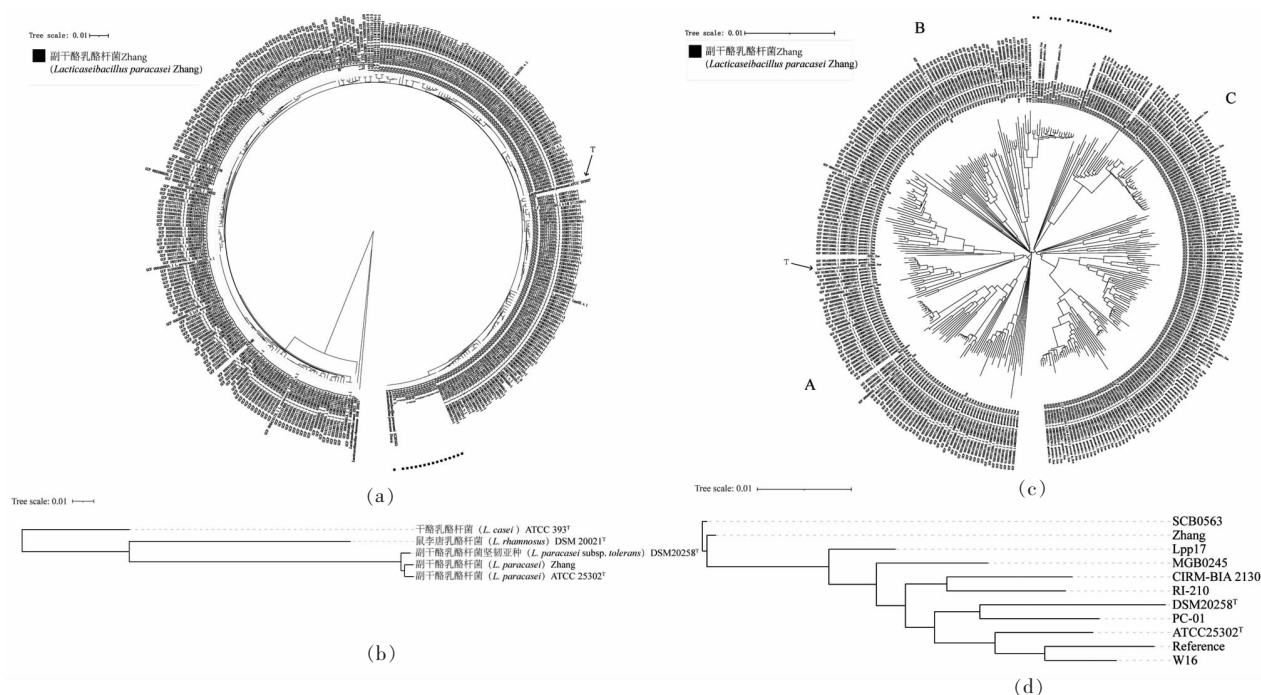
图 1 333 株副干酪乳酪杆菌基因组序列的 ANI 值

Fig.1 ANI value of the genome sequences of 333 strains of *L. paracasei*

株与其第 0,25,50,75,100 代菌株聚集在同一小分支,与副干酪乳酪杆菌 SCB0563 的遗传距离较近。对于干酪乳酪杆菌 ATCC 393^T、鼠李糖乳酪杆菌 DSM 20021^T、副干酪乳酪杆菌 ATCC 25302^T 和副干酪乳酪杆菌坚韧亚种 DSM 20258^T 以及 Zhang 的 335 个核心基因的核酸序列,使用最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统发育树。由图 2b 可知,副干酪乳酪杆菌 ATCC 25302^T、副干酪乳酪杆菌坚韧亚种 DSM 20258^T 和 Zhang 聚集在同一进化枝上,再次验证了 Zhang 的分类学地位为副干酪乳酪杆菌。然而,由于不同物种之间差异较大,因此无法判断 Zhang 亚种水平的分类学地位。本研究团队前期通过比较 16S rRNA、看家基因和核心基因的系统发育树,发现副干酪乳酪杆

菌与亚种干酪乳酪杆菌 ATCC 393^T、鼠李糖乳酪杆菌 DSM 20021^T 遗传差异较大, 基于核心基因

构建的系统发育树可以较好的区分干酪乳酪杆菌的近缘种^[14]。



注: a 图和 b 图为基于核心基因构建的系统发育树, c 图和 d 图为基于 SNP 构建的系统发育树。

图 2 副干酪乳酪杆菌系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of *Lactobacillus paracasei*

由于外群菌株与 333 株副干酪乳酪杆菌之间的遗传距离较远, 故进一步基于以副干酪乳酪杆菌 ATCC 334 的全基因组完成图序列作为参考基因组进行 Core-SNP 分析, 并使用 NJ 法构建系统发育树。结果如图 2c 所示, SNP 系统发育树分为 3 个大分支, Zhang 原始菌株与其第 0, 25, 50, 75, 100 代菌株聚集在分支 B 的同一小分支, 其相互之间略有差异, 且与副干酪乳酪杆菌 SCB0563 的遗传距离较近。以副干酪乳酪杆菌 ATCC 334 的全基因组完成图序列作为参考基因组, 选取各分支选取代表菌株进行 Core-SNP 分析, 并使用 ML 法构建系统发育树, 结果如图 2d 所示。Zhang 的分类学地位为副干酪乳酪杆菌, 然而基于核心基因和 Core-SNP 都无法在副干酪乳酪杆菌的亚种水平上对其进行区分。本研究团队前期发现不同代数 15 株菌所识别到的 SNP 位点均小于 21 个, 表明干酪乳杆菌 Zhang 在 MRS 液体培养基中连续传代过程中有较好的遗传稳定性 (已接收, 未见

刊)。Fontana 等^[33]研究发现副干酪乳酪杆菌群体在系统发育树中大致可划分为 4 个分支, 与本研究系统发育树聚类结果一致。综上所述, 通过 ANI、GTDB 数据库注释、基于核心基因的系统发育分析和基于 Core-SNP 的系统发育分析结果一致, 表明 Zhang 的分类学地位应为副干酪乳酪杆菌。

2.4 共线性分析

共线性可通过对同一物种不同个体基因组间同源序列及其排列顺序一致性的检测, 来探究基因组间的相关性^[34]。共线性分析结果显示, Zhang 与 ATCC 334 基因组共线性良好。然而, Zhang 在其基因组 328.49 kb 位置处存在其 49.37 kb 处的特有片段, 在 Zhang 基因组 392.52 kb 处存在 PC-01 没有的片段, 而 ATCC 334 存在此片段。Zhang 在其基因组 1.81 Mb 位置处存在 19.55 Kb 的特有片段, 包含酪氨酸蛋白激酶 (*yveL*) 和荚膜多糖生物合成蛋白质 (*ywqC*) 等基因。Zhang 基因组在 511.30 kb 处长度为 311.29 kb 的片段在 PC-01

的基因组中发生了基因组易位。以上结果表明,Zhang 和 PC-01 存在较大遗传差异。有研究表明当一个基因刚好位于易位区域边缘时基因会被打

断,促使基因内区、非翻译区域以及编码区域改变,导致 DNA 序列有较大的改变^[35]。

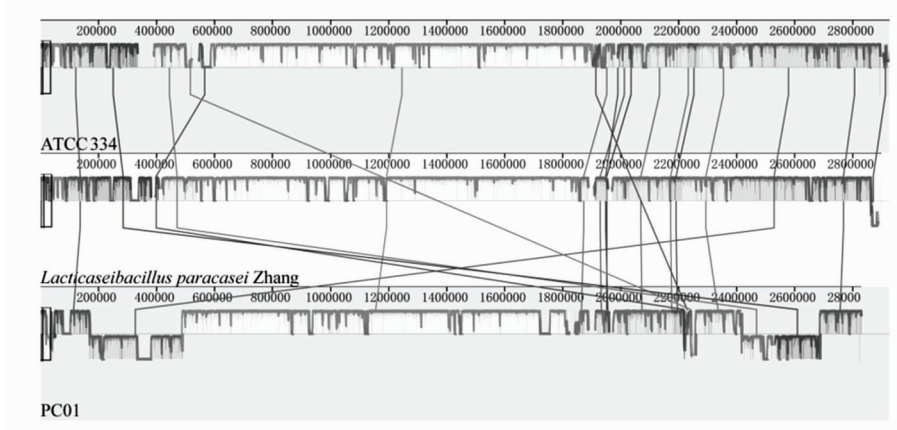


图3 副干酪乳杆菌基因组多序列比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of the *L. paracasei* genomic

2.5 耐药基因、致病性基因和环境抗性基因的特征

比较基因组学分析可对乳酸菌基因组所含有的耐药、致病性、环境抗性等相关基因的结构和功能信息进行分析,对乳酸菌在基因层面的安全性进行评估,一定程度上能有效地反映供试乳酸菌的生物安全性^[36-37]。通过生物信息学分析发现,Zhang 及其第 0,25,50,75,100 代菌株的基因组上均检测到了 1 种抗生素外排泵基因 *qacj*,相似度为 38.24%,小于 40%,故认为不具有该耐药基因。与此同时,并未在 Zhang 及其第 0,25,50,75,100 代菌株的基因组上检测到致病性基因和环境抗性基因。综上,Zhang 及其第 0,25,50,75,100 代菌株在基因组上不具有耐药基因、致病性基因和环境抗性基因。

2.6 细菌素基因簇分析

细菌素是指细菌在代谢过程中合成并分泌的具有抗菌活性的物质,对其自身没有抑菌活性,而对亲缘关系较近的菌株具有抑制作用^[38]。相关研究表明,可以通过基因挖掘工具发现新的细菌素基因簇^[39-40]。通过细菌素基因簇注释,发现 Zhang 有 2 个潜在的热点区域(Areas of interest, AOI),以操纵子的结构排列。AOI_01 由 36 个开放阅读框(Open reading frames, ORFs)组成,包含 II c 细

菌素相关核心肽 LSEI_2386。在基因簇的上游有天冬酰胺合成酶(*LasC*)及 orf00005 编码细菌素生成相关的乳酸脱氢酶。下游位置的 orf00045 编码细菌素生成相关的乙酸激酶。AOI_02 由 37 个 ORFs 组成,核心肽包括 Enterocin_X_chain_beta、Carnocin_CP52。在基因簇的上游有 ABC 转运蛋白(*LanT*)及 orf0007 编码细菌素生成相关的组氨酸激酶,中游位置的 orf00038 编码免疫蛋白 PlnI。PlnI 属于 CAAX 氨基蛋白酶家族,在其它细菌素基因簇中这种类型 CAAX 基因十分罕见,目前其在细菌素合成过程中的作用尚不明确^[41]。下游位置 orf0007 编码细菌素生成相关的氧化还原酶 *YdhF*。瞿茜楠等^[42]发现副干酪乳杆菌 PC-724 的细菌素基因簇含有细菌素 Carnocin 基因、专用免疫蛋白基因、ABC 转运蛋白基因及其辅助蛋白基因,推测其可产生细菌素。综上所述,推测 Zhang 可能具有产生细菌素 Carnocin 的潜力。

2.7 潜在益生基因

Zhang 发现有 15 个潜在益生特性相关基因(如表 2 所示)。吕瑞瑞等^[27]在 Zhang 中注释到与糖基转移、转录调节等代谢功能相关基因(*epsE*、*yybR*、*mshA*)。本研究还注释到了谷胱甘肽合成(*gshAB*)、核黄素合成(*ribF*、*ribU*)、黏附因子(*atpC*)、分泌胞外多糖(*rmlA*、*rmlB*、*rmlD*、*epsE*、

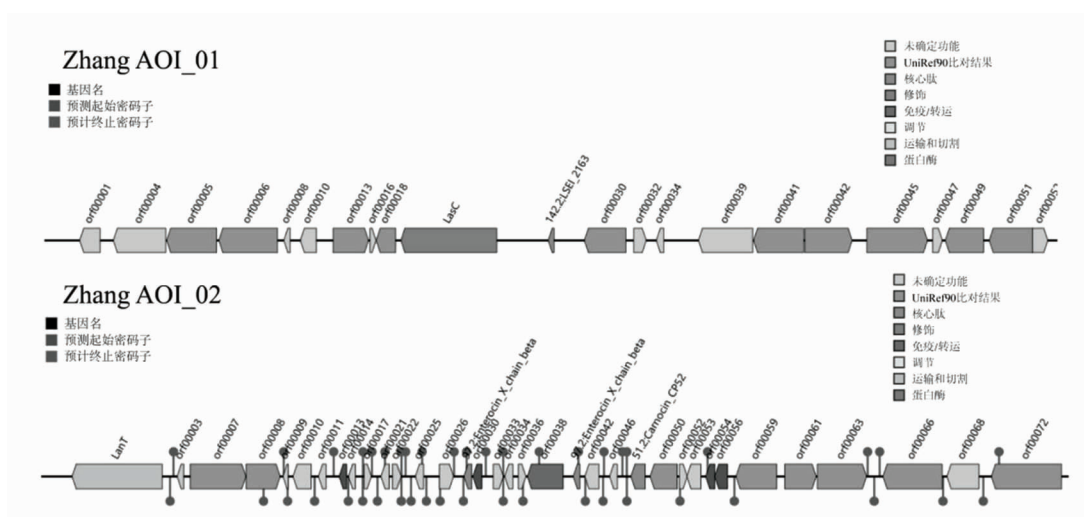


图 4 Zhang 细菌素基因簇

Fig.4 Bacteriocin gene cluster of Zhang

epsJ、*epsH*)、耐酸基因(*clpP*)、提高宿主代谢能力(*tagE*)、乳酸和转运乳酸(*pyk*)产生相关的基因。*rmlA* 作为葡萄糖-1-磷酸胸苷酰基转移酶,能催化 *D*-葡萄糖-1 转化为 dTDP-葡萄糖。已有研究证明 *rmlA* 基因与细菌形态及耐受性相关^[43]。据报道谷胱甘肽对于维持正常的免疫系统、整合解毒、抗氧化等方面都具有积极的影响^[44]。此外谷胱甘肽也有助于菌株在胃肠道存活率的增加^[45],利于菌株益生功能的发挥。

3 结论

本研究对 Zhang 进行比较基因组学分析发现,Zhang 的分类学地位为副干酪乳酪杆菌。Zhang 在基因组上不含有耐药基因、致病性基因和环境抗性基因。此外,Zhang 携带核心肽、LanT 转运和引导切割及免疫或运输功能的 Carnocin 相关细菌素基因簇,推测其可能具有产生细菌素 Carnocin 的潜力。Zhang 还携带谷胱甘肽合成(*gshAB*)、核黄素合成(*ribF*)、黏附因子(*atpC*)、耐酸基因(*clpP*)和分泌胞外多糖(*rmlA*、*epsH*)等潜在益生基因。本研究明确了 Zhang 的分类学地位为副干酪乳酪杆菌,评估发现其在基因组上不具有耐药基因、致病性基因和环境抗性基因,并注释发现完整的细菌素基因簇及谷胱甘肽生物合成等潜在益生基因,为其进一步开发研究以及产业化提供了遗传学基础。

表 2 副干酪乳酪杆菌 Zhang 具有的潜在益生基因

Table 2 Potential probiotic genes of *L. paracasei* Zhang

基因	注释
<i>atpC</i>	ATP 合成酶 epsilon 链
<i>clpP</i>	ATP 依赖的 <i>Clp</i> 蛋白酶
<i>epsE</i>	蛋白质分解亚单位
<i>epsH</i>	推测的糖基转移酶 <i>EpsE</i>
<i>epsJ</i>	推测的糖基转移酶 <i>EpsH</i>
<i>gshAB</i>	推测的糖基转移酶 <i>EpsJ</i>
<i>mshA</i>	谷胱甘肽生物合成双功能蛋白 <i>GshAB</i>
<i>pyk</i>	<i>D</i> -肌醇-3-磷酸糖基转移酶
<i>ribF</i>	丙酮酸激酶
<i>ribU</i>	双功能核黄素激酶/FMN 腺苷酸转移酶
<i>rmlA</i>	核黄素转运蛋白 <i>RibU</i>
<i>rmlB</i>	葡萄糖-1-磷酸胸苷转移酶
<i>rmlD</i>	dTDP 葡萄糖 4,6-脱水酶
<i>tagE</i>	dTDP-4-脱氢鼠李糖还原酶
<i>yybR</i>	聚(甘油磷酸) α 葡糖基转移酶

参 考 文 献

- [1] 国家卫生健康委员会. 国家卫生健康委员会公告 (2022 年第 4 号)[EB/OL]. (2022-08-18)[2023-05-03] <https://www.nhc.gov.cn/sps/s7892/202208/1d6c229d6f744b35827e98161c146afb.shtml>. National Health Commission. Announcement of the National Health Commission(No. 4 of 2022)[EB/OL].

- (2022-08-18)[2023-05-03]. <https://www.nhc.gov.cn/sps/s7892/202208/1d6c229d6f744b35827e98161c146afb.shtml>.
- [2] 张哲, 于学健, 曹艳花, 等. 干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 及相近菌种的分类变迁[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(16): 243-248.
ZHANG Z, YU X J, CAO Y H, et al. Taxonomic changes of *Lactobacillus casei* and its closely related species[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(16): 243-248.
- [3] COLLINS M D, PHILLIPS B A, ZANONI P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* sp. nov. Subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. Nov., comb. nov.[J]. Int J Syst Bacteriol, 1989, 39(2): 105-108.
- [4] WARD L, TIMMINS M. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction[J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 29(2): 90-92.
- [5] 刘光全, 刘勇, 李辉, 等. *pheS* 基因序列分析在干酪乳杆菌种群水平鉴定中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(9): 94-97.
LIU G Q, LIU Y, LI H, et al. Species identification of the *Lactobacillus casei* group by *pheS* gene sequences analysis[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(9): 94-97.
- [6] WU R N, WANG L P, WANG J C, et al. Isolation and preliminary probiotic selection of *Lactobacilli* from koumiss in Inner Mongolia[J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(3): 318-326.
- [7] GUO Z, WANG J C, YAN L Y, et al. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains [J]. LWT -Food Science and Technology, 2009, 42(10): 1640-1646.
- [8] WU R N, WANG W W, YU D L, et al. Proteomics analysis of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic bacterium isolated from traditional homemade koumiss in Inner Mongolia of China[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2009, 8(10): 2321-2338.
- [9] WU R, SUN Z, WU J, et al. Effect of bile salts stress on protein synthesis of *Lactobacillus casei* Zhang revealed by 2-dimensional gel electrophoresis [J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(8): 3858-3868.
- [10] YA T, ZHANG Q J, CHU F L, et al. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: A newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China[J]. BMC Immunology, 2008, 9: 1-9.
- [11] ZHANG Y, DU R T, WANG L F, et al. The antioxidative effects of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on the hyperlipidemic rats[J]. European Food Research and Technology, 2010, 231: 151-158.
- [12] WANG J G, CHEN X, LIU W, J et al. Identification of *Lactobacillus* from koumiss by conventional and molecular methods[J]. European Food Research and Technology, 2008, 227: 1555-1561.
- [13] 刘文俊, 乌日娜, 张和平. 益生菌 *L.casei* Zhang 的多项分类鉴定[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(2): 14-18.
LIU W J, WU R N, ZHANG H P. Classification of the probiotics *L. casei* Zhang with polyphasic taxonomy[J]. China Dairy Industry, 2009, 37(2): 14-18.
- [14] 多拉娜, 宋宇琴, 李伟程, 等. 干酪乳杆菌的近缘种及亚种部分看家基因的系统发育分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2751-2761.
DUO L N, SONG Y Q, LI W C, et al. Phylogenetic analysis of *Lactobacillus casei* and closely related species/subspecies based on sequences of housekeeping genes[J]. Microbiology China, 2018, 45(12): 2751-2761.
- [15] ZHANG W Y, YU D L, SUN Z H, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic strain isolated from traditional homemade koumiss in Inner Mongolia, China [J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(19): 5268-5269.
- [16] AUTHORITY E F S. EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain [J]. EFSA Journal, 2021, 19(7): e06506.
- [17] 李伟程. 自然发酵乳中乳酸乳球菌乳酸亚种群体遗传学和功能基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
LI W C. Population genetics and functional genomics of lactic acid subspecies of *Lactococcus lactis* in naturally fermented milk[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [18] PARKS D H, CHUVOCHINA M, WAITE D W, et al. A standardized bacterial taxonomy based on

- genome phylogeny substantially revises the tree of life[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(10): 996–1004.
- [19] JAIN C, RODRIGUEZ-R L M, PHILLIPPY A M, et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 5114.
- [20] 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.
- [21] VILELLA A J, SEVERIN J, URETA-VIDAL A, et al. EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates[J]. *Genome Research*, 2009, 19(2): 327–335.
- [22] SEEMANN T. Snippy: Rapid haploid variant calling and core genome alignment[EB/OL]. (2020-08-04) [2023-05-01]. GitHub <https://github.com/tseemann/snippy>.
- [23] DARLING A C, MAU B, BLATTNER F R, et al. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. *Genome Research*, 2004, 14(7): 1394–1403.
- [24] VAN HEEL A J, DE JONG A, SONG C, et al. BAGEL4: A user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W278–W281.
- [25] 刘旭, 李伟程, 王可欣, 等. *Lactobacillus paragasseri* IMAU FB017 的遗传背景和益生相关基因分析[J/OL]. *微生物学报*, (2022-11-16)[2023-05-03]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEV12pW9UrhTDCdPD65MJ_TzI-dondkyQuHaWNhAUqnC7z8WpqeaA9QgEiW8YHAQ1qtksvsrI&uniplatform=NZKPT.
- LIU X, LI W C, WANG K X, et al. Genetic background and probiotic-related gene analysis of *Lactobacillus paragasseri* IMAU FB017[J/OL]. *Acta Microbiologica Sinica*, (2022-11-16) [2023-05-03]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEV12pW9UrhTDCdPD65MJ_TzI-dondkyQuHaWNhAUqnC7z8WpqeaA9QgEiW8YHAQ1qtksvsrI&uniplatform=NZKPT.
- [26] 吴琼, 李伟程, 李敏, 等. *Limosilactobacillus fermentum* F-6 的遗传背景和功能基因组[J]. *微生物学报*, 2022, 62(4): 1438–1451.
- WU Q, LI W C, LI M, et al. Genetic background and functional genome of *Limosilactobacillus fermentum* F-6[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1438–1451.
- [27] 吕瑞瑞, 李伟程, 康小红, 等. 副干酪乳杆菌 PC-01 全基因组测序及不同副干酪乳杆菌菌株比较基因组学分析[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(9): 3025–3038.
- LÜ R R, LI W C, KANG X H, et al. Whole genome sequencing of *Lactobacillus paracasei* PC-01 and comparative genomics analysis about *Lactobacillus paracasei* strains[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(9): 3025–3038.
- [28] 王静, 张文羿. 副干酪乳杆菌系统发育组学分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(7): 1461–1474.
- WANG J, ZHANG W Y. Phylogenomics analysis of *Lactobacillus paracasei*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2022, 41(7): 1461–1474.
- [29] PARKS D H, CHUVOCHINA M, RINKE C, et al. GTDB: An ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D785–D794.
- [30] ILLEGHEMS K, DE VUYST L, WECKX S. Comparative genome analysis of the candidate functional starter culture strains *Lactobacillus fermentum* 222 and *Lactobacillus plantarum* 80 for controlled cocoa bean fermentation processes[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 1–13.
- [31] SUN Z, HARRIS H M, MCCANN A, et al. Expanding the biotechnology potential of *Lactobacilli* through comparative genomics of 213 strains and associated genera[J]. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 8322.
- [32] MORITA H, TOH H, FUKUDA S, et al. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production[J]. *DNA Research*, 2008, 15(3): 151–161.
- [33] FONTANA A, ZACCONI C, MORELLI L. Genetic signatures of dairy *Lactobacillus casei* group[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2611.
- [34] TANG H, BOWERS J E, WANG X, et al. Synteny and collinearity in plant genomes[J]. *Science*, 2008, 320(5875): 486–488.
- [35] 邢锋. 籼稻珍汕 97 和明恢 63 基因组的注释和比较

- 分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- XING F. Annotation and comparative analysis of the genomes of indica rice Zhenshan 97 and Mingcui 63 [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [36] PAPIZADEH M, ROHANI M, NAHREVAIAN H, et al. Probiotic characters of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are a result of the ongoing gene acquisition and genome minimization evolutionary trends[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 111: 118–131.
- [37] PAPADIMITRIOU K, ANASTASIOU R, MAISTROU E, et al. Acquisition through horizontal gene transfer of plasmid pSMA198 by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 points towards the dairy origin of the species[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116337.
- [38] 刘超楠, 蔡熙姮, 张新宇, 等. 植物乳杆菌基因组学研究进展[J]. *食品科技*, 2020, 45(11): 1–7.
- LIU C N, CAI X H, ZHANG X Y, et al. Advances in *Lactobacillus plantarum* genomics research [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(11): 1–7.
- [39] HAMMAMI R, ZOUHIR A, LAY C L, et al. Database mining for bacteriocin discovery[M]. Wallingford: *Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality*, 2011: 349–358.
- [40] CARSON D A, BARKEMA H W, NAUSHAD S, et al. Bacteriocins of non-aureus *Staphylococci* isolated from bovine milk[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(17): e01015–17.
- [41] 郭行. 鼠李糖乳杆菌 LS-8 中新型细菌素的挖掘及抑菌机制的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
- GUO X. Excavation of novel bacteriocins in *Lactobacillus rhamnosus* LS-8 and study of the mechanism of bacterial inhibition[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2020.
- [42] 瞿茜楠, 彭传涛, 黄天, 等. 副干酪乳酪杆菌 PC-724 蛋白类抑菌活性代谢产物的研究[J/OL]. *中国食品学报*, (2023-04-08)[2023-06-25]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEV12pW9UrhTDCdPD64bFQGXSZy43nINXK-Trk6hwwzsJstBa7_02OZUKYI-Es4zHMm4fNUh&uniplatform=NZKPT.
- QU Q N, PENG C T, HUANG T, et al. Study of the protein-like antibacterial activity metabolites of *Lactobacillus paracasei* PC-724[J/OL]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, (2023-04-08)[2023-06-25]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEV12pW9UrhTDCdPD64bFQGXSZy43nINXK-Trk6hwwzsJstBa7_02OZUKYI-Es4zHMm4fNUh&uniplatform=NZKPT.
- [43] QU H, XIN Y, DONG X, et al. An *rmlA* gene encoding *D*-glucose-1-phosphate thymidyltransferase is essential for mycobacterial growth[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 275(2): 237–243.
- [44] 丛峰松. 神奇的小分子活性肽[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2015: 18.
- CONG F S. Miraculous small molecule active peptide[M]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University Press, 2015: 18.
- [45] CÁRDENAS N, LAIÑO J E, DELGADO S, et al. Relationships between the genome and some phenotypic properties of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99: 4343–4353.

Taxonomic Status and Analysis of Potential Probiotic Genes of *Lactobacillus casei* Zhang

Sun Jiaqi^{1,2,3}, Li Weicheng^{1,2,3}, Zhong Zhi^{1,2,3}, Zhang Heping^{1,2,3*}

¹Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

²Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

³Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

Abstract *Lactobacillus casei* Zhang is a probiotic lactic acid bacteria strain with excellent properties screened by our

research team. It is difficult to distinguish *Lactobacillus casei* from its relative's species by traditional methods, and the systematic classification of *Lactobacillus* has recently been updated, resulting in the need to reconfirm the taxonomic status of Zhang. In this study, the taxonomic status, antibiotic resistance genes, virulence genes, and environmental resistance genes of Zhang were characterized using comparative genomics, and the bacteriocin gene cluster and potential probiotic genes carried on the genome of this strain were explored. The comparative genome's results showed that average nucleotide identity value between Zhang and *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 25302^T was 98.49%. The taxonomic status of Zhang was confirmed as *Lacticaseibacillus paracasei* by comparison with taxonomic database and phylogenetic analysis. Zhang's genome does not contain antibiotic resistance genes, virulence genes, or environmental resistance genes. Carnocin-related bacteriocin gene cluster include core peptide, *LanT* transport and guided cleavage, and immune or transport functions were annotated on Zhang's genome. In addition, Zhang's genome encodes potential probiotic genes such as glutathione synthesis, riboflavin synthesis, adhesion factors, and exopolysaccharides secreted. This study updated the taxonomic status of Zhang as *Lacticaseibacillus paracasei*, revealed that it does not contain antibiotic resistance genes, virulence genes, or environmental resistance genes, and annotated several potential probiotic genes, providing data reference for further development and industrialization of this strain.

Keywords *Lacticaseibacillus paracasei*; comparative genomics; bacteriocin gene cluster; potential probiotic genes