

嗜酸乳杆菌 CICC 6074 全基因组信息和高温、高盐胁迫下的转录组学分析

黎谢飞^{1,2}, 时滔航^{1,2}, 曹莹^{1,2}, 吴振^{1,2}, 蔡振东^{1,2}, 曾小群^{1,2}, 涂茂林^{1,2}, 潘道东^{1,2*}

(¹ 宁波大学农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室 浙江宁波 315211

² 宁波大学食品与药学院 浙江省动物蛋白食品精深加工技术重点实验室 浙江宁波 315211)

摘要 通过益生菌在高温、高盐条件下的转录组分析,揭示菌体细胞在类似环境下的生理反应情况及相关机制。采用三代测序及生物信息学分析方法测定并拼接完成嗜酸乳杆菌 CICC 6074 的全基因组草图。将生长对数期的嗜酸乳杆菌细胞在高温、高盐条件下耐受后,提取总 RNA,在 Illumina HiSeqXTen PE150 平台上进行 RNA 测序,转录组学分析方法分析基因表达差异。结果表明,嗜酸乳杆菌 CICC 6074 的基因组为一条长 1 992 024 bp 的双链环状 DNA 分子,不含质粒序列,GC 含量为 34.71%,共预测出 1 864 个基因。在高温胁迫组,共检测到 513 个有显著性差异,显著上调 305 个,显著下调 208 个;在高盐胁迫组中共检测到 161 个有显著性差异,显著上调 81 个,显著下调 80 个。功能富集分析结果表明,在高温胁迫时,嗜酸乳杆菌可能通过增强有机酸的代谢和转录翻译调控过程来提升细胞对环境的适应性;而在高盐胁迫时,主要通过增强糖酵类代谢和增强膜运输来提升生存能力。

关键词 嗜酸乳杆菌;三代测序;全基因组;高温胁迫;高盐胁迫;转录组学

文章编号 1009-7848(2023)09-0285-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.09.030

乳酸菌是一类常见的益生菌,也是肠道微生物的重要组成部分之一^[1],对于维持肠道微生物平衡具有不可或缺的作用。益生菌只有在被消费者摄入并成功在肠道内存活和定植后才能发挥益生作用,而研究发现,益生菌的活性在食用时至少应达到 10^7 CFU/g^[2]。益生菌食品从生产到被消费者摄入,所承载的益生菌一直暴露在各种环境条件下,这些对益生菌的存活和保存来说都是挑战^[3-4]。

在工业加工和储存过程中,益生菌对温度变化的敏感性很容易影响最佳剂量的益生菌的制备,益生菌对高温的敏感性限制其作为营养品中的应用^[5]。培养温度对产品发酵时代谢产物的产生也有很大的影响,比如在 30 °C 或 37 °C 发酵产物中,乳酸和乙酸的比值为 3:2,而在 42 °C 或 45 °C 孵育时,乳酸和乙酸的比值低于理论值^[6]。因此生产发酵温度的选择和发酵过程中的温度控制非常重要。较高的发酵温度对发酵行业有吸引力,因为这

不仅可以提高产品的发酵速率,还将大大降低高温消毒后设备的冷却时间和成本^[7]。酸乳工业生产中,发酵温度一般控制在 42~45 °C,这在保证发酵效果的基础上大大节约了生产时间^[8]。选择耐高温的生产菌株非常重要。江南大学 Ge 等^[7]筛选出一株耐高温突变株干酪乳杆菌 G-03 (*Lactobacillus casei* G-03),其在 41 °C 发酵条件下乳酸浓度和乳酸产量分别比对照组菌株高 115.2% 和 97.8%。

高盐、高渗透压环境是益生菌需要挑战的环境,高盐环境下生长的益生菌的存活率及细胞结构、性质都会受到影响^[9]。Piuri 等^[10]发现高盐环境 (1 mol/L NaCl) 下干酪乳杆菌 ATCC 393 (*Lactobacillus casei* ATCC 393) 细胞壁的结构、性质发生变化,细胞显著大于对照组,其对诱变剂和细胞壁靶向抗生素的敏感性增加。没有暴露在渗透压下进行喷雾干燥的植物乳杆菌 LPS 47 (*Lactobacillus plantarum* LPS 47),在存活率、湿度和储存期间的稳定性方面较对照组 (0.25~0.75 mol/L NaCl) 有明显的改善^[11]。据报道,高盐饮食会引起乳酸杆菌减少,从而改变肠道免疫稳态,导致对炎症侵袭的脆弱性增加^[12-13],山东大学齐鲁医院 Dong 等^[14]也发现高盐饮食组 Wistar 大鼠肠道内容

收稿日期: 2022-09-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972048);国家重点研发计划项目(2021YFD2100104)

第一作者: 黎谢飞,男,博士生

通信作者: 潘道东 E-mail: daodongpan@163.com

物中乳酸杆菌的数量显著降低,这表明高盐摄入量与肠道菌群组成的变化有关。德国柏林 Max-Delbrück 分子医学中心一项发表在《Nature》上的研究显示,高盐摄入会影响小鼠的肠道微生物群,特别是降低鼠乳杆菌的种群数量;与这些发现一致的是,在人类的一项试验研究中,适度的高盐挑战降低了乳酸菌的肠道存活率^[15]。

嗜酸乳杆菌是目前我国卫健委批准的可用于保健食品的益生菌菌种之一,被广泛添加到各种益生菌食品中充当益生菌补充剂。研究提高乳酸菌细胞对生产、储存或消化过程中发生的环境胁迫的抵抗力得到研究者的广泛关注^[16]。研究乳酸菌在各种应激条件(高温、高浓度盐、胆盐、过氧化氢或低 pH 值)下的生理状态和应激反应很有必要。本文采用转录组学分析方法研究嗜酸乳杆菌 CICC 6074(*Lactobacillus acidophilus* CICC 6074)在高温和高盐环境胁迫过程中乳酸菌对环境的应激反应,探究耐受过程中微生物细胞内可能发生的生理生化反应,为后续提升嗜酸乳杆菌的抗盐、抗高温性质研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株、材料与主要试剂

嗜酸乳杆菌 CICC 6074 购买自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。乳酸菌培养基 MRS 肉汤和 MRS 琼脂,中国海博生物技术有限公司。基因组 DNA 提取试剂盒 QIAGEN Genomic-tips,德国 Qiagen 公司;1D 文库构建连接试剂盒 SQK-LSK109,英国 Oxford Nanopore Technologie 公司;总 RNA 提取使用 TRIzol 试剂,美国赛默飞 Invitrogen 公司;双链 cDNA 合成试剂盒 SuperScript double-stranded cDNA synthesis kit,美国赛默飞 Invitrogen 公司;cDNA 扩增试剂 Phusion DNA polymerase,美国 NEB 公司;构建转录组测序文库构建试剂盒 TruSeq™ RNA sample preparation Kit,美国 Illumina 公司。

1.2 主要设备与仪器

Centrifuge5804R 高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;核酸电泳仪 PowerPac HC,美国 Bio-Rad 公司;恒温恒湿箱 HWS-250B,中国泰斯特公司;Nanodrop ND-2000,美国赛默飞公司;

PromethION 测序仪,英国 Oxford Nanopore Technology 公司;Illumina HiSeq X Ten 测序仪,美国 Illumina 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 乳酸菌的培养与菌体的获取 经过两代活化的嗜酸乳杆菌按体积分数 2%接入新鲜的 MRS 液体培养基,静置培养 16 h 后 4 °C 条件下 8 000×g 离心 5 min 去上清收取菌体,液氮速冻后置于-80 °C 暂存以备后续基因组 DNA 提取试验。细菌的高温和高盐胁迫方法参照 Kilstrup 等^[17]的方法并略作修改,经过两代活化的嗜酸乳杆菌按体积分数 2%接入新鲜的 MRS 液体培养基,静置培养 16 h 后分别在 43 °C 和 0.45 mol/L NaCl 条件下耐受 3 h,4 °C 条件下 8 000×g 离心 5 min 去上清收取菌体,液氮速冻后置于-80 °C 暂存以备后续总 RNA 提取试验。

1.3.2 基因组 DNA 与总 RNA 的提取 采用 QIAGEN Genomic-tips 试剂盒提取菌体基因组 DNA,0.75%琼脂糖电泳检测样品是否有降解以及 DNA 片段大小,Nanodrop 对 DNA 进行定量,高质量的 DNA 样品用于后续的建库测序;采用 TRIzol 法提取未胁迫对照组、高温胁迫组和高盐胁迫组的菌体总 RNA,去除基因组 DNA 后,用 1%琼脂糖电泳和 Agilent2100 生物分析仪检测总 RNA 的质量,使用 Nanodrop 进行 RNA 定量,高质量的 RNA 样品用于后续的建库。

1.3.3 建库、测序和质控 全基因组测序使用 SQK-LSK109 连接试剂盒构建 1D 文库,在 PromethION 测序仪上进行测序。RNA 测序使用 TruSeq™ RNA sample preparation Kit) 进行 RNA 文库构建,在 Illumina HiSeq×TenPE150 测序平台上进行双端测序。下机后的原始数据首先去除接头序列和 5' 端非 A、T、G、C 的碱基,然后去掉测序质量值小于 Q20 的序列,再去掉含 N 的比例达到 10%的序列,最后舍弃去掉接头序列及质量修剪后长度太小的小片段;经过质控后得到可用于后续分析的高质量序列。

1.3.4 基因组与转录组注释 基因组测序的高质量序列经 Unicycler(linux-64 v0.4.8)软件组装拼接后^[18],首先采用 BLASTN 进行质粒分析,然后分别用 prodigal (v2.6.3)、tRNAscan-SE -2.0 和

RNAmmmer(v1.2)进行编码基因、tRNA 基因预测和 rRNA 基因预测。采用 Interproscan(v5.25-64.0)将预测得到的编码蛋白分别与 COG、KEGG、GO、Refseq、Pfam 和 TIGRFAMs 等 6 个数据库比对进行功能注释^[19]。Bowtie2(v2.3.5)软件被用来对 RNA 测序后得到的高质量序列进行注释^[20],参考基因组序列为完成的嗜酸乳杆菌 CICC 6074 基因组序列。

1.3.5 全基因组比对与转录组基因表达分析

采用 Geneious Prime 对嗜酸乳杆菌基因组进行基因组分析, Mauve Alignment 程序进行全基因组比对。使用 RSEM(v1.3.1)进行转录本定量, FPKM 和 TPM 方法衡量表达水平。转录本定量后, 使用 DESeq2(v1.24.0)软件进行基因表达差异分析^[21]。

1.3.6 功能富集分析 使用软件 Goatools(v1.1.6)进行 GO 富集分析^[22], KOBAS (v2.0)进行 KEGG Pathway 富集分析^[23], 使用 Fisher 精确检验进行计算。使用 4 种多重检验方法 (Bonferroni, Holm, Sidak 和 false discovery rate), 对 P 值进行了校正, 以控制计算的假阳性率。通常情况下, 当经过校正的 $P \leq 0.05$ 时, 认为此 GO 功能存在显著富集情况或者此 KEGG 通路为在差异表达基因中显著富集的 KEGG 通路。

2 结果与分析

2.1 全基因组拼接与注释结果

随机取 100 000 条质控后的序列, 利用 BLASTN 将其与 nt 数据进行比对, 统计序列在 nt 库中的分布情况及比对上的物种分布, 结果发现, 99.58% 的序列被分配到了嗜酸乳杆菌这个种的分类下面, 分配到其它菌种的和分类不清晰的序列数占 0.42%, 说明测序结果无数据污染情况。下机原始数据经过质控和拼接步骤后, 得到 1 个大小为 1 992 024 nt 的重叠群, 测序深度为 456.16, 未发现质粒序列。分析后可知, 得到的基因组长 1 992 024 bp, 是一条双链环状 DNA 分子, GC 含量为 34.71%, 结果与 NCBI 上已经完成拼接的嗜酸乳杆菌种各株的基因组信息符合。这也说明了此次的测序结果准确可靠, 可用于后续的分析。根据核酸序列特征, 对基因组上的基因组结构进行预测, 总共得到 1 864 个完整的 CDS, 其它基因组

结构预测结果见表 1。

2.2 嗜酸乳杆菌 CICC 6074 基因组注释结果

将基因组上预测出来的编码序列与 COG、KEGG、GO、Refseq、Pfam 和 TIGRFAMs 等数据库进行比对, 详细结果见表 2。可以看出, 单独注释到 Refseq 数据库的 CDS 最多为 1 855 条, 占总 CDS 数的 99.52%, 注释到 TIGRFAMs 数据库的 CDS 最少为 617 条, 占总 CDS 数的 33.1%, 能够注释到所有数据的 CDS 为 492 条, 经过 6 个数据的注释, 所有的 1 864 个 CDS 得到了充分注释。图 1 展示了嗜酸乳杆菌 CICC 6074 基因组中注释到 COG 数据库的 CDS 功能分类统计, 可以看出, 翻译、核糖体结构、化合物在生物体内的生物合成相关的基因数量最多为 184 条, 碳水化合物的转运和代谢相关的基因次之为 171 条, 而 RNA 加工、修饰、染色质结构与动力学, 细胞核结构相关的基

表 1 嗜酸乳杆菌 CICC 6074 基因组结构预测结果
Table 1 Results of genome structure prediction of *L. acidophilus* CICC 6074

类型	数量	长度/bp	占基因组序列比例/%
tRNA	61	4 618	0.23
16S rRNA	4	6 251	0.31
23S rRNA	4	11 624	0.58
5S rRNA	4	468	0.02
CDS	1 864	1 765 743	88.64
CRISPR	1	1 980	0.1
Genomic island	0	0	0

表 2 基因组编码蛋白功能注释统计表

Table 2 Statistical table of functional annotation of CDS

数据库	蛋白注释数量	占总预测蛋白比例/%
COG	1 463	78.49
KEGG	1 000	53.65
GO	1 154	61.91
Refseq	1 855	99.52
Pfam	1 573	84.39
TIGRFAMs	617	33.1
all databases	492	26.39
at least one database	1 855	99.52
Overall	1 864	100

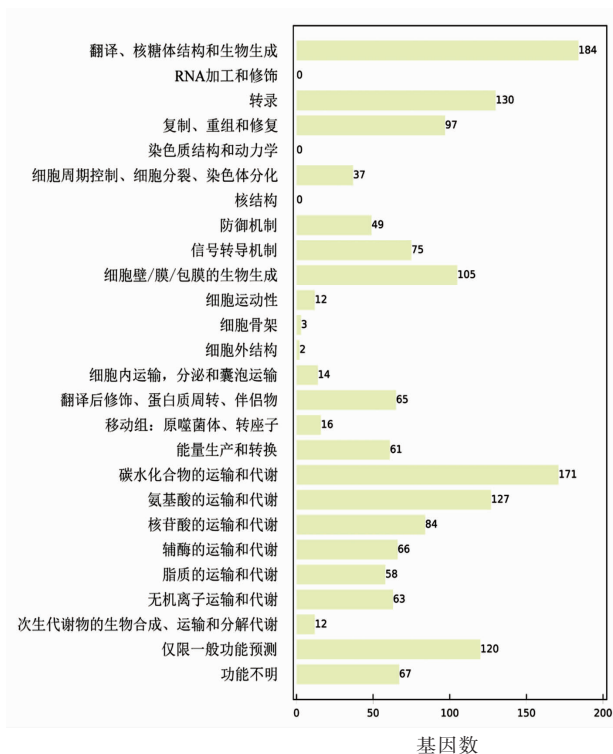


图1 基因组编码蛋白 COG 功能分类统计

Fig.1 Functional classification statistics of CDS in COG database

因数最少为0,功能未知的基因也有67条。这说明此基因组中蛋白质甚至是酶类的翻译、合成处于一个最重要的地位,能量代谢以及其它如氨基酸、核苷酸、脂类的代谢也相对重要。

2.3 全基因组草图绘制与比对

将基因组测序深度、GC分布、GC-skew以及基因组结构注释进行整合,使用Circos(v0.69)绘制全基因组圈图。如图3所示,由外到内依次为正义链编码基因、负义链编码基因、tRNA基因(橙色)和rRNA基因(紫色)、CRISPR序列(蓝色)和基因岛序列(绿色)、GC比、GC-skew与测序深度。

以“*Lactobacillus acidophilus*”为关键词在NCBI上的Genome数据库里搜索,发现嗜酸乳杆菌的基因组信息有61条,有9条完成了拼接,其余的为重叠群或者基因组骨架。完成拼接的9条完整基因组中,长度分布范围为1.99 Mb到2.09 Mb,包含的CDS数为1756个到1867个不等(数据截至2021年12月,NCBI上Genome数据库信

息, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#/prokaryotes/1099/>)。可知,嗜酸乳杆菌不同株的基因组间存在一定的差异性。采用 Mauve Alignment 程序进行全基因组序列比对,结果如图3所示,图3a、3b、3c分别为嗜酸乳杆菌 CICC 6074 的基因组与嗜酸乳杆菌 NCFM (NC_006814)、嗜酸乳杆菌 La-14 (NC_021181) 和嗜酸乳杆菌 YT1 (NZ_CP025200) 基因组比对的结果。可知,NC_006814、NC_021181 与嗜酸乳杆菌 CICC 6074 基因组的相似度比 NZ_CP025200 与嗜酸乳杆菌 CICC 6074 基因组的相似度高。经分析,删掉 NC_006814 中 16S rRNA 基因(163 426~1 632 698) 和 23S rRNA 基因(1 630 941~1 628 035) 的间隔区比嗜酸乳杆菌 CICC 6074 基因组中 16S rRNA 基因(637 135~635 577) 和 23S rRNA 基因(635 372~632 467) 的间隔区多出的 1 536 对碱基后,两个基因组的相似度最高(图 3d)。除了主要来自于两对 23S rRNA 基因(相似性分别为 99.3% 和 96.1%)、一对 transposase 基因(相似性为 97.5%)、一对 16S rRNA 基因(相似性为 99.2%) 的序列差异,其它 CDS 的分布位置与序列基本一致。

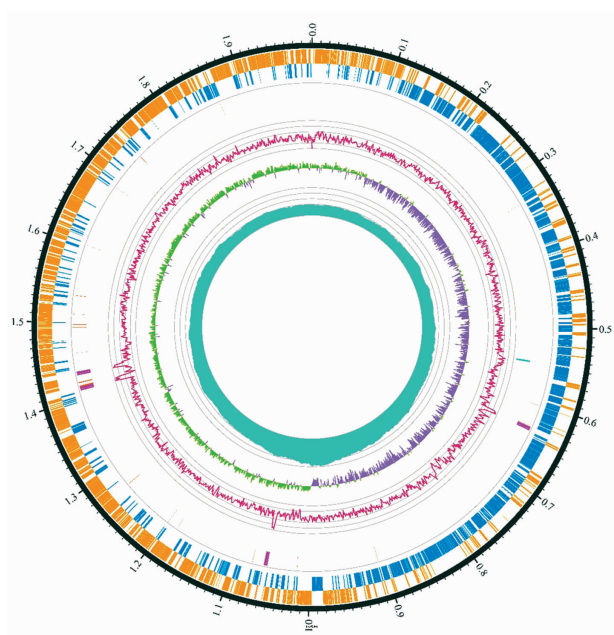


图2 嗜酸乳杆菌 CICC 6074 基因组圈图

Fig.2 Genome circle map of *L. acidophilus* CICC 6074

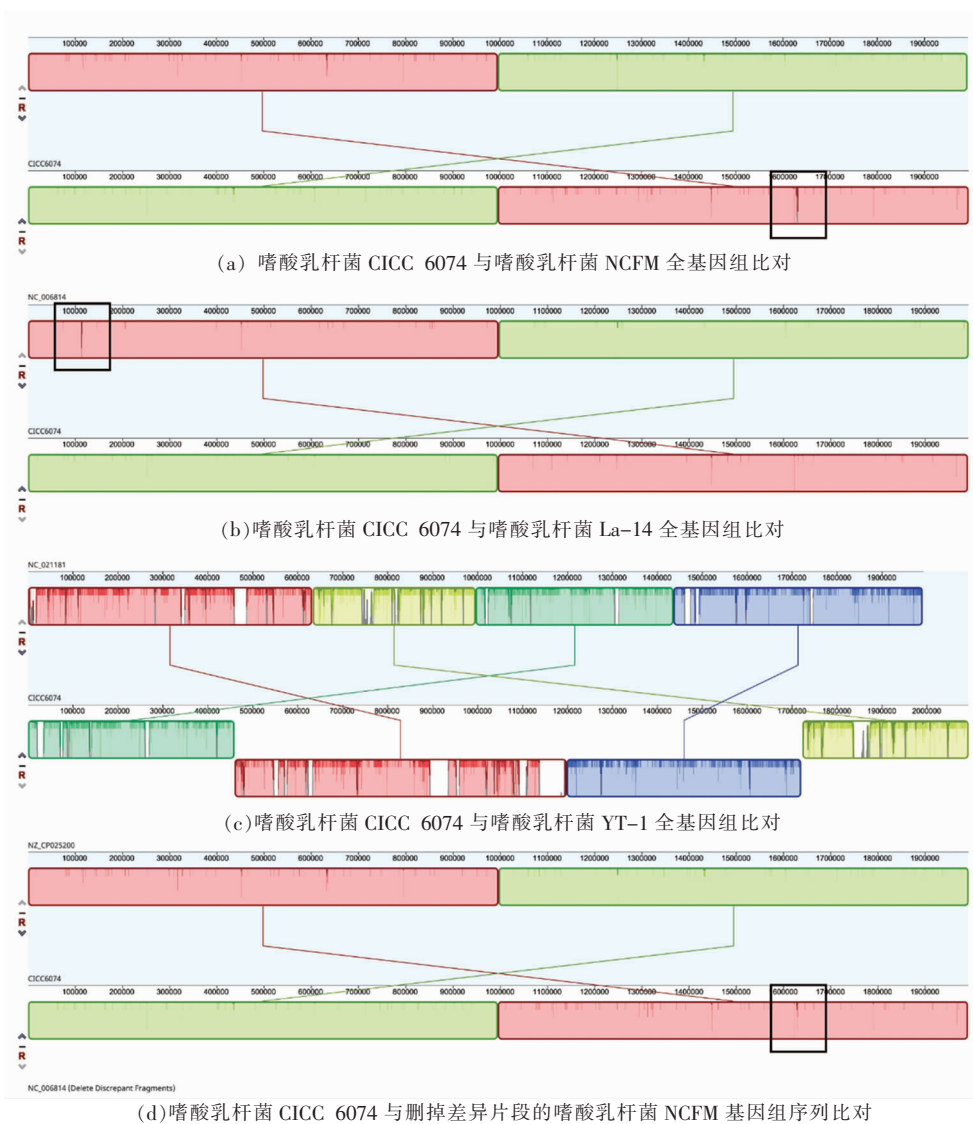


图 3 嗜酸乳杆菌 CICC 6074 与其它株嗜酸乳杆菌全基因组比对

Fig.3 Whole genome alignment of *L. acidophilus* CICC 6074 with other strains of *L. acidophilus*

2.4 转录组测序结果注释与表达量分析

将经过质控和拼接后的 RNA 序列与对照基因组的序列进行比对注释,并对注释情况进行统计。基于表达矩阵,进行样本间 Venn,PCA 分析,获取组间的共表达和特表达基因。图 4a 可以看出,对照组检测出了 1704 个表达基因,热胁迫组和盐胁迫组分别检测出了 1805 和 1713 个表达基因,其中 3 组共表达的基因有 1677 个,热胁迫组特异表达的基因有 74 个,盐胁迫组有 1 个。PCA 分析发现,图 4b 中 PC1 的贡献度为 69.16%,

PC2 的贡献度为 17.48%,3 组样品能够较好的分别聚集到一起,组间差异明显。结果表明,在不同胁迫环境中,嗜酸乳杆菌 CICC 6074 的基因表达谱会发生不同程度的变化,在高温胁迫时乳酸菌细胞内表达的基因数量明显上升,而在高盐胁迫的环境中则上升的不多。说明在面对高温胁迫时,嗜酸乳杆菌的细胞可能会做出更多的应激反应。

2.5 转录组基因差异表达分析

图 5 表达量差异火山图显示了不同组间转录组基因的差异表达情况,横坐标为不同基因在两

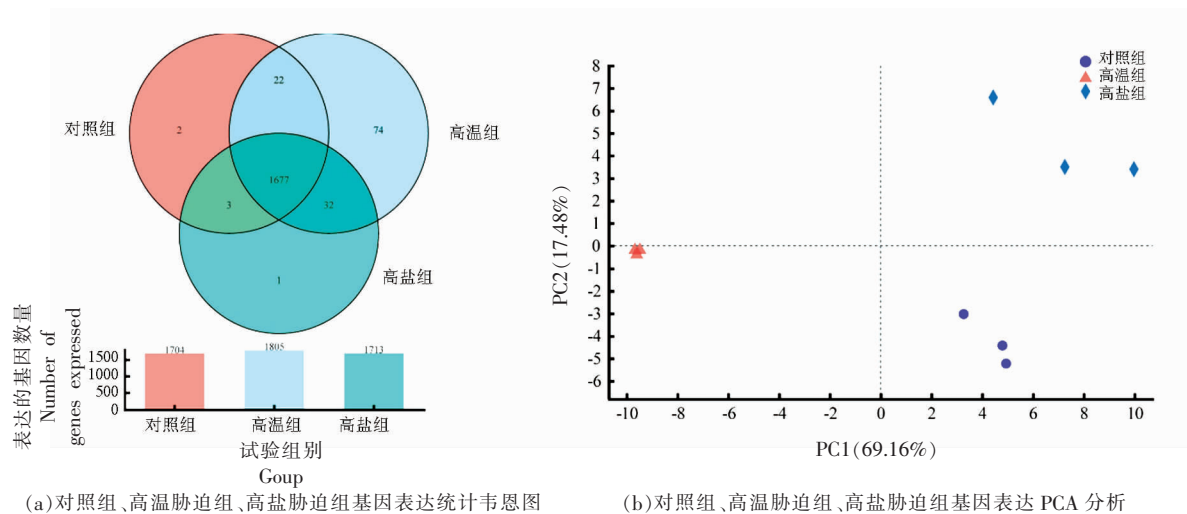


图 4 转录组基因表达量分析

Fig.4 Gene expression analysis of transcriptome

组样本间表达差异的倍数变化值, 纵坐标为基因表达量变化差异的统计学检验值, 图中红色圆点、绿色圆点和灰色圆点分别表示显著上调、显著下调和非显著差异的基因。可知在热胁迫组, 总共检测到 1 790 个差异表达基因, 其中 1 277 个有差异但不显著, 513 个有显著性差异; 显著上调 305 个, 显著下调 208 个。在盐胁迫组中总共检测到 1 654 个差异表达基因, 相较对照组来说, 其中 1 494 个有差异但不显著, 161 个有显著性差异;

显著上调 81 个, 显著下调 80 个。在 Zhang 等^[24]的研究中, 高温胁迫下的鼠李糖乳杆菌 *hsryfm 1301* 的转录组中有 242 个基因表达上调, 320 个基因表达下调, Zhao 等^[25]的文章中盐胁迫下植物乳杆菌 *KLDS1.0391* 的转录组中有 260 个基因表达差异显著, 其中 159 个基因表达显著上调, 101 个基因表达显著下调。这些结果与本研究相似, 也说明了在面对高温胁迫时嗜酸乳杆菌的细胞可能会做出更多的应激反应。一个有意思的现象是, 在热应

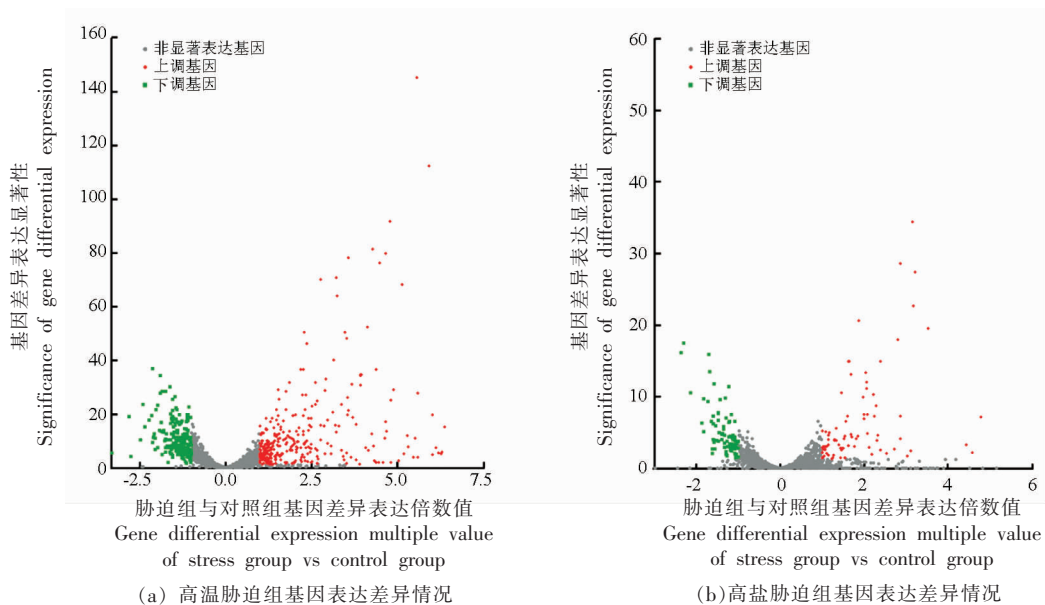


图 5 表达量差异火山图

Fig.5 Differential expression volcano map

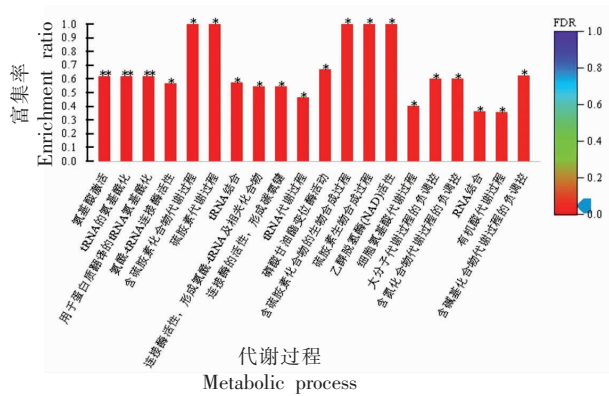
激时,嗜酸乳杆菌的 α -半乳糖苷酶较对照组有 83.32 倍的上调,这或许对嗜酸乳杆菌在食品生产或者饲料生产上有着巨大的应用价值^[26-27]。

2.6 功能富集分析

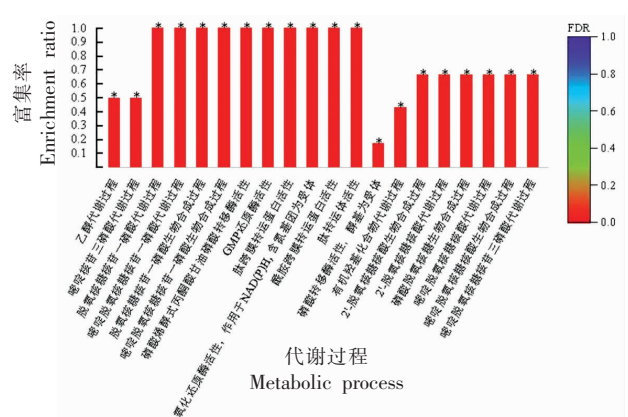
对差异表达基因集中的基因进行 GO 富集和 KEGG 富集分析,结果如图 6 所示。图 6a 和图 6b 展示了热胁迫组、盐胁迫组分别与对照组的差异表达基因 GO 功能富集分析结果,可以看出,热胁迫组与对照组的差异表达基因主要富集于氨基酸、硫胺素、有机酸及 tRNA 相关的生物学过程,而盐胁迫组与对照组的差异表达基因主要富集于脱氧核糖核苷酸、嘧啶脱氧核糖核苷酸合成与代谢,肽跨膜转运酶活性,肽转运酶活性,酰胺跨膜转运酶活性等生物过程。图 6c 和图 6d 展示了热胁迫组、盐胁迫组分别与对照组的差异表达基因 KEGG 功能富集分析结果,在热胁迫组中碳水化合物代谢、翻译、膜运输、氨基酸代谢、核苷酸的代

谢等代谢通路富集的基因相对较多,而在盐胁迫组中核苷酸代谢、膜运输、碳水化合物代谢、氨基酸代谢和细胞群体感应或者生物膜形成等代谢通路富集的基因相对较多。这同样证明了上文的陈述,两组胁迫条件下细胞的应激反应是不同的。

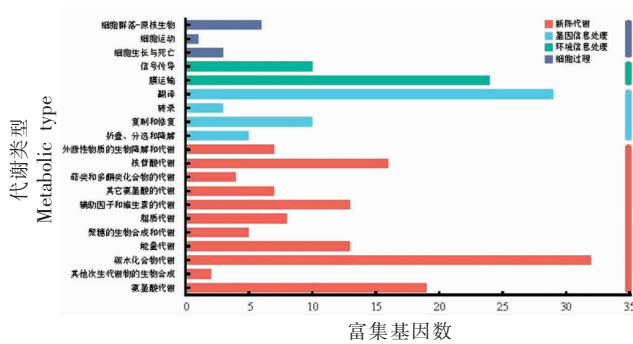
Chen 等^[6]和 Ge 等^[7]的研究说明了高温处理会影响乳酸菌的有机酸代谢,这与我们的结果有一定的一致性,而 López-Bucio 等^[28]也说明了有机酸代谢在细胞水平上对多种生物化学途径(包括能量生产、氨基酸生物合成前体的形成)以及对环境的适应具有重要意义。在高温下培养细胞会抑制蛋白质的合成,而持续热胁迫也会导致细胞对于环境的适应,也就是蛋白质合成的逐渐恢复^[29],这说明为了帮助细胞适应热胁迫,会有大量的翻译调控过程参与进来。细胞对盐胁迫的反应是通过渗透液的合成、K⁺的吸收和 Na⁺在质膜上的外排^[30],说明了膜运输对细胞适应盐胁迫环境的重要性,



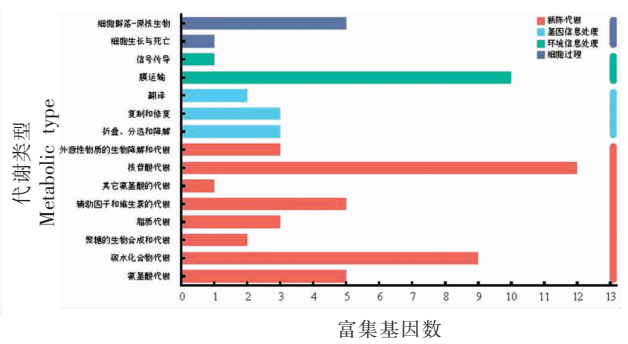
(a) 高温胁迫组 GO 功能富集分析



(b) 高盐胁迫组 GO 功能富集分析



(c) 高温胁迫组 KEGG 功能富集分析



(d) 高盐胁迫组 KEGG 功能富集分析

注:*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$ 。

图 6 转录组功能富集分析

Fig.6 Functional enrichment analysis of transcriptome

我们的结果中高盐胁迫下嗜酸乳杆菌的转录组中膜运输的生物过程明显增多。在 Fu 等^[31]的研究中,氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢、膜转运、调控功能和细胞信号转导等变化对海藻希瓦氏菌的高盐响应具有重要意义,而 Conde 等^[32]也描述了糖醇代谢可能在高盐胁迫下受到调节,功能富集分析发现在高盐胁迫时乳酸菌的糖醇代谢增强。

3 结论

嗜酸乳杆菌 CICC 6074 的基因组长 1 992 024 bp, 是一条双链环状 DNA 分子,GC 含量为 34.71%,总共预测出来 1 864 个基因,与已经发表的嗜酸乳杆菌的基因组相似度极高,遗传信息基本一致。高温和高盐两种胁迫条件下嗜酸乳杆菌的转录组与对照组产生了一定的差异性,分析发现,在面对高温胁迫时,嗜酸乳杆菌的细胞可能会做出更多的应激反应。功能富集分析的结果表明,在高温胁迫时,嗜酸乳杆菌可能主要通过增强有机酸的代谢和翻译调控过程来提升细胞对环境的适应性;而在高盐胁迫时,则主要通过增强糖醇类代谢和增强膜运输来提升生存能力。

参 考 文 献

[1] BOLAN S, SESHADRI B, GRAINGE I, et al. Gut microbes modulate bioaccessibility of lead in soil[J]. *Chemosphere*, 2021, 270: 128657.

[2] RANADHEERA R, BAINES S, ADAMS M. Importance of food in probiotic efficacy[J]. *Food Research International*, 2010, 43(1): 1-7.

[3] CHAMPAGNE C P, GARDNER N J, ROY D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2005, 45(1): 61-84.

[4] TRIPATHI M K, GIRI S K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage[J]. *J Funct Foods*, 2014, 9: 225-241.

[5] FAREEZ I M, LIM S M, ZULKEFLI N A A, et al. Cellulose derivatives enhanced stability of alginate-based beads loaded with *Lactobacillus plantarum* LAB12 against low pH, high temperature and prolonged storage [J]. *Probiotics and Antimicrobial*

Proteins, 2018, 10(3): 543-557.

- [6] CHEN C, ZHAO S, HAO G, et al. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review[J]. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20 (sup1): S316-S330.
- [7] GE X Y, YUAN J, QIN H, et al. Improvement of L-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(1): 73-78.
- [8] MACORI G, COTTER P D. Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 49: 172-178.
- [9] HOSSEINI NEZHAD M, HUSSAIN M A, BRITZ M L. Stress responses in probiotic *Lactobacillus casei*[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 55(6): 740-749.
- [10] PIURI M, SANCHEZ - RIVAS C, RUZAL S M. Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*[J]. *J Appl Microbiol*, 2005, 98(1): 84-95.
- [11] BUSTOS P, BÓRQUEZ R. Influence of osmotic stress and encapsulating materials on the stability of autochthonous *Lactobacillus plantarum* after spray drying[J]. *Drying Technology*, 2013, 31(1): 57-66.
- [12] MIRANDA P M, DE PALMA G, SERKIS V, et al. High salt diet exacerbates colitis in mice by decreasing *Lactobacillus* levels and butyrate production [J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 1-17.
- [13] MÜLLER D N, WILCK N, HAASE S, et al. Sodium in the microenvironment regulates immune responses and tissue homeostasis[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2019, 19(4): 243-254.
- [14] DONG Z, LIU Y, PAN H, et al. The effects of high-salt gastric intake on the composition of the intestinal microbiota in Wistar rats[J]. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2020, 26: e922160.
- [15] WILCK N, MATUS M G, KEARNEY S M, et al. Salt-responsive gut commensal modulates TH 17 axis and disease[J]. *Nature*, 2017, 551(7682): 585-589.
- [16] LACROIX C, YILDIRIM S. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(2): 176-183.
- [17] KILSTRUP M, JACOBSEN S, HAMMER K, et al.

- Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(5): 1826–1837.
- [18] WICK R R, JUDD L M, GORRIE C L, et al. U-nicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads [J]. PLoS Comput Biol, 2017, 13(6): e1005595.
- [19] JONES P, BINNS D, CHANG H Y, et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification[J]. Bioinformatics, 2014, 30(9): 1236–1240.
- [20] LANGDON W B. Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks [J]. BioData Min, 2015, 8(1): 1–7.
- [21] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 1–21.
- [22] KLOPFENSTEIN D, ZHANG L, PEDERSEN B S, et al. GOATOOLS: A python library for gene ontology analyses[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1–17.
- [23] XIE C, MAO X, HUANG J, et al. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(suppl_2): W316–W322.
- [24] ZHANG C, GUI Y, CHEN X, et al. Transcriptional homogenization of *Lactobacillus rhamnosus* hsrifm 1301 under heat stress and oxidative stress[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(6): 2611–2621.
- [25] ZHAO L, ZHAO P, SHANG J, et al. Transcriptome analysis of the molecular mechanism of bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 under nanoparticle NaCl stress [J]. J Biomed Nanotechnol, 2021, 17(3): 369–381.
- [26] 邓春, 易弋, 李平, 等. α -半乳糖苷酶的研究进展 [J]. 食品工业, 2016, 37(2): 255–260.
- DENG C, YI Y, LI P, et al. Research advance of α -galactosidase[J]. Sci Technol Food Ind, 2016, 37(2): 255–260.
- [27] 闫巧娟, 刘瑜, 江正强. 微生物 α -半乳糖苷酶的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(3): 9.
- YAN Q J, LIU Y, JIANG Z Q. Advances in microbial α -galactosidase [J]. J Microbiol, 2017, 37(3): 9.
- [28] LOPEZ –BUCIO J, NIETO –JACOBO M F, RAMIREZ –RODRIGUEZ V, et al. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils[J]. Plant Sci, 2000, 160(1): 1–13.
- [29] DUNCAN R F, HERSHEY J. Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation[J]. The Journal of Cell Biology, 1989, 109(4): 1467–1481.
- [30] SERRANO R, MULET J M, RIOS G, et al. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress[J]. Journal of Experimental Botany, 1999, 50: 1023–1036.
- [31] FU X, WANG D, YIN X, et al. Time course transcriptome changes in *Shewanella algae* in response to salt stress[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96001.
- [32] CONDE A, REGALADO A, RODRIGUES D, et al. Polyols in grape berry: transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(3): 889–906.

Whole Genome Information of *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074 and the Transcriptomic Analysis of the Response to High Temperature and Salt Stress

Li Xiefei^{1,2}, Shi Zihang^{1,2}, Cao Ying^{1,2}, Wu Zhen^{1,2}, Cai Zhendong^{1,2},
Zeng Xiaoqun^{1,2}, Tu Maolin^{1,2}, Pan Daodong^{1,2*}

¹State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-Products, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang;

²Key Laboratory of Animal Protein Food Processing Technology of Zhejiang Province, School of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang)

Abstract Transcriptome analysis of probiotic bacteria under heat and salt stress conditions can reveal the physiological

response of bacterial cells and related mechanisms in similar environments. The whole-genome map of *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074 was determined and assembled by triple sequencing and bioinformatics analysis. Total RNA was extracted from *Lactobacillus acidophilus* cells after tolerance to high temperature and high salt conditions and RNA sequencing was performed on the Illumina HiSeq×TEN PE150 platform. The and transcriptomic analysis methods were used to analyze gene expression differences. The results showed that the genome of *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074 was a 1 992 024 bp double-stranded circular DNA molecule without plasmid sequences, with a GC content of 34.71%, and a total of 1 864 genes were predicted. In the high-temperature stress group, a total of 513 significant differences were detected, with 305 significantly up-regulated and 208 significantly down-regulated; in the high salt stress group, a total of 161 significant differences were detected, with 81 significantly up-regulated and 80 significantly down-regulated. The results of functional enrichment analysis indicated that *Lactobacillus acidophilus* might enhance the adaptation of cells to the environment mainly by enhancing the metabolism of organic acids and transcriptional-translational regulatory processes during high-temperature stress, while enhancing the survival ability mainly by enhancing the metabolism of sugar alcohols and enhancing transmembrane transport during high salt stress.

Keywords *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074; third generation sequencing technology; whole genome; high-temperature stress; high salt stress; transcriptomic