

# 1 株高产生物膜发酵乳杆菌抗胁迫特性与全基因组分析

张悦<sup>1,2</sup>, 蒋柠<sup>2</sup>, 郑砚学<sup>1</sup>, 顾悦<sup>1</sup>, 王艳<sup>1</sup>, 贺银凤<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>内蒙古农业大学食品科学与工程学院 呼和浩特 010018

<sup>2</sup>内蒙古自治区质量和标准化研究院 呼和浩特 010070)

**摘要** 为探究高产生物膜发酵乳杆菌 733 的抗性机理,测定其对模拟人工胃肠液、酸、胆盐、温度和盐胁迫的耐受性以及有害代谢产物的分泌情况,同时对其全基因组进行测序分析。结果显示,高产生物膜发酵乳杆菌 733 在模拟人工胃肠液中的存活率分别为(98.1±0.5)%和(98.1±1.2)%,存活率较高,且不产生有害代谢产物;不同胁迫环境均会抑制菌株生长,而在某些特定条件下会刺激菌株产生应激响应以保证菌株活力;发酵乳杆菌 733 在经历不同环境胁迫时,主要对 *trxA*、*perR*、*ctsR* 和 *argR* 基因产生影响,而这些基因调控菌株抗逆性的作用方式还有待研究。

**关键词** 发酵乳杆菌; 抗胁迫特性; 全基因组; 应激机制

文章编号 1009-7848(2023)10-0063-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.10.007

发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)是一种主要定植于动物肠道中的异型发酵乳酸菌<sup>[1]</sup>,能调节天然免疫与适应性免疫<sup>[2]</sup>,具有抗炎和降胆固醇等作用<sup>[3]</sup>。研究发现,发酵乳杆菌不仅可以在发酵驼乳时产生天然新型抗氧化肽<sup>[4]</sup>,在发酵过程中,还可以代替发酵香肠中亚硝酸盐,降低亚硝酸盐在香肠中的残留风险。此外,该菌株通过防止脂肪氧化、蛋白质分解、肌红蛋白氧化和提高游离氨基酸含量,有效提高香肠的品质和营养价值<sup>[5]</sup>。然而,发酵乳杆菌在人类的肠道<sup>[6]</sup>或者在用于食物发酵时经常受到不同的胁迫<sup>[7]</sup>,因此,增强其抗逆性变得非常关键。

基因组学时代彻底改变了人们对所有生物基因的理解。这个时代起源于 1995 年,Craig Venter 和他的同事发表第 1 个活的有机体的完整基因组序列——革兰氏阴性细菌流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)。当时的基因组序列计划,包括人类基因组计划,都是利用定向测序的方法,即以有序的方式对基因组的已绘制区域进行单独测序。Venter 等研究表明,一种鸟枪式测序方法,即构建整个随机剪切的基因组鸟枪库,并使用序列支架组装它们的序列,可以更快地完成这一

任务,并改变基因组序列计划的方向<sup>[8]</sup>。目前在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/?term=Lactobacillaceae>) 数据库中上传的乳酸杆菌(*Lactobacillaceae*)全基因组共有 5 726 组,其中植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)有 792 组,德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)有 419 组,罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)有 328 组,鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)有 230 组,而发酵乳杆菌只有 107 组。对发酵乳杆菌全基因组的测定远少于其它乳酸杆菌,这不利于其优异特性及相关作用机制的研究。本文研究 1 株高产生物膜发酵乳杆菌的益生和抗逆特性,采用全基因组测序技术分析该菌株的抗性机理,为后续提高其应对不良环境能力的研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株 试验菌株为前期分离筛选的 1 株高产生物膜发酵乳杆菌 733 (*Lactobacillus fermentum* 733),由内蒙古农业大学食品生物技术研究团队提供。

1.1.2 试剂 MRS 肉汤培养基,广东环凯微生物科技有限公司;胰蛋白酶、胃蛋白酶,美国 Sigma 公司;*L*-鸟氨酸、*L*-精氨酸、*L*-赖氨酸,北京酷来博科技有限公司;蛋白胨水培养基、吡啶、硝酸盐培养基、碘化钾溶液、淀粉溶液,北京博迈德生物

收稿日期: 2022-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960467)

第一作者: 张悦,女,博士生

通信作者: 贺银凤 E-mail: heyinf6468@163.com

技术有限公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 供试菌液的制备 将菌株活化二代,取5 mL菌悬液离心(4 000 r/min,4 min),弃上清,吸取5 mL生理盐水吹打混匀,洗涤并离心,重复3次。用紫外分光光度计调整菌悬液 OD<sub>595nm</sub> 值在 1.0,即供试菌液<sup>[9]</sup>。

1.2.2 发酵乳杆菌 733 生长量与生物膜生成量的测定 取 1.2.1 节制得的供试菌液接入新鲜 MRS 中,接种比例为 2%(体积分数),培养 25 h,分别在 4,7,10,13,16,19,22 h 和 25 h 测定菌株生长量和生物膜生成量<sup>[10]</sup>。

1.2.3 发酵乳杆菌 733 对人工胃肠液耐受性的测定 参考钟华晨等<sup>[11]</sup>的方法配制人工胃肠液,测定发酵乳杆菌 733 对人工胃肠液的耐受性<sup>[12]</sup>。

1.2.4 发酵乳杆菌 733 有害代谢产物的测定 参考魏朝治等<sup>[13]</sup>的方法对菌株进行吲哚、硝酸盐还原和氨基酸脱羧酶试验。

### 1.2.5 发酵乳杆菌 733 抗逆性的测定

1.2.5.1 发酵乳杆菌 733 对酸胁迫耐受能力的测定 将 1.2.1 节制备的供试菌液分别接入 pH 2.5,3.5,4.5,5.5,6.5(对照)的培养基中,37 °C 培养 24 h,对处理的菌株进行活菌计数。

1.2.5.2 发酵乳杆菌 733 对胆盐胁迫耐受能力的测定 将 1.2.1 节制备的供试菌液分别接入胆盐质量浓度为 0(对照),1,2 g/L 和 3 g/L 培养基中,37 °C 培养 24 h,对处理后的菌株进行活菌计数。

1.2.5.3 发酵乳杆菌 733 对温度胁迫耐受能力的测定 将 1.2.1 节制备的供试菌液分别接入新鲜的 MRS 液体培养基中,培养温度分别设为 4,10,37(对照),45,55 °C 和 70 °C,培养 24 h,对处理后的菌株进行活菌计数。

1.2.5.4 发酵乳杆菌 733 对盐胁迫耐受能力的测定 将 1.2.1 节制备的供试菌液分别接入 NaCl 质量浓度为 0(对照),15,30,45 g/L 和 60 g/L 的培养基中,37 °C 培养 24 h,对处理后的菌株进行活菌计数。

1.2.6 微生物全基因组测序 提取发酵乳杆菌 733 的 DNA,对其浓度、纯度、样品总量以及样品完整性进行测定。当 DNA 质检合格,即质量浓度  $\geq 50$  ng/ $\mu$ L,OD<sub>260nm/280nm</sub> 1.8~2.0,OD<sub>260nm/230nm</sub> 2.0~

2.2,单次建库总量  $\geq 5$   $\mu$ g,主带清晰且  $\geq 23$  kB,无降解且无 RNA 污染,方可进行后续试验。

样品检测合格后,进构建文库,质检合格后上机测序。

1.2.7 数据分析 每组试验重复至少 3 次,每次设置 3 组平行对照,用 SPSS 19.0 和 Origin 2021 进行数据分析和作图。所有数值用“平均值 $\pm$ 标准误差”表示, $P < 0.05$  表示差异显著。

使用 Qubit 3.0 对测序文库进行定量;使用 Agilent 2100 对文库大小进行检测;SMRT LINK 8.0 软件对下机文库进行数据处理,并采用 pb\_assembly\_microbial(from smrtlink10)、hifiasm 软件和 Canu(v2.2)软件对三代数据进行组装;Glimmer(v3.02)寻找发酵乳杆菌 733 的编码基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵乳杆菌 733 生长量与生物膜形成量

对发酵乳杆菌 733 生长量以及生物膜生成量进行测定,结果如图 1 所示。

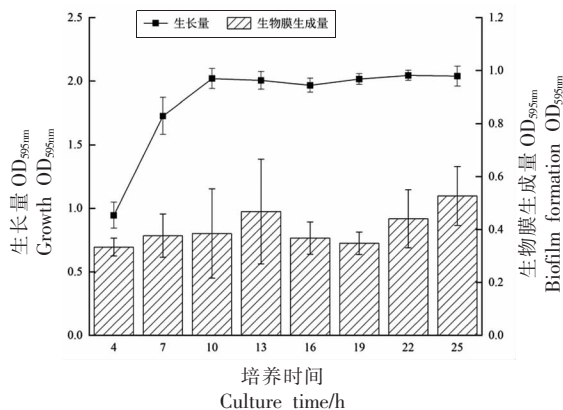


图 1 发酵乳杆菌 733 生长量与生物膜形成量  
Fig.1 The growth and biofilm formation of *L. fermentum* 733

由图 1 可知,发酵乳杆菌 733 生长量随培养时间的增加呈先上升后持续平稳状态,而生物膜生长量随时间的增加呈先上升后下降再上升的趋势,符合生物膜形成的规律。生物膜的形成是积累的过程,25 h 时生物膜形成量最多,为  $0.527 \pm 0.111$ 。往期研究中将生物膜生成量高于 0.500 判定为高产生物膜,因此发酵乳杆菌 733 为高产生物膜乳酸菌。

## 2.2 发酵乳杆菌 733 对模拟人工胃肠液耐受性及有害代谢产物试验结果

发酵乳杆菌 733 对模拟人工胃肠液耐受以及有害代谢产物分泌情况见表 1。

表 1 发酵乳杆菌 733 在模拟人工胃肠液中存活率及有害代谢产物评价结果

Table 1 The survival of *L. fermentum* 733 in simulated artificial gastric/intestinal fluid and evaluation results of harmful metabolites

菌名	存活率/%		有害代谢产物				
	模拟胃液	模拟肠液	臭味	硝酸盐还原	L-精氨酸	L-鸟氨酸	L-赖氨酸
发酵乳杆菌 733	98.1 ± 0.5	98.1 ± 1.2	-	-	-	-	-

注：“+”表示阳性结果；“-”表示阴性结果。

测定发酵乳杆菌 733 耐受模拟人工胃肠液的能力,结果发现,在模拟人工胃肠液中培养 3 h,发酵乳杆菌 733 存活率分别为(98.1±0.5)%和(98.1±1.2)%,具有较高活菌数。说明高产生物膜发酵乳杆菌 733 可以耐受人工胃肠液,并保持较好活力。

鉴于一些益生菌在发酵过程中会分泌一些有毒的代谢物质,可能导致类似严重过敏反应的症状<sup>[14]</sup>,本试验评估了发酵乳杆菌 733 是否存在产生有害代谢产物。该菌株有害代谢产物结果均为阴性,说明其不产生可分解体内色氨酸的色氨酸酶,且代谢产物中不含使硝酸盐还原为亚硝酸盐的硝酸盐还原酶,或者能够分解氨基酸形成胺类物质的氨基酸脱羧酶。

综上所述,发酵乳杆菌 733 可以耐受胃肠道环境且不会分泌有害代谢产物,是具有潜在益生特性的乳酸菌。

## 2.3 发酵乳杆菌 733 抗逆性试验结果

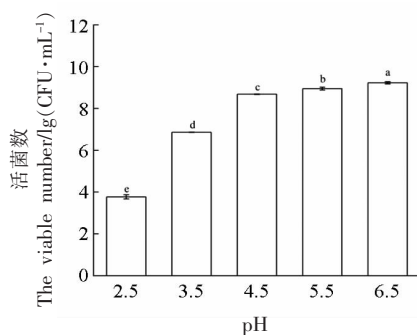
对发酵乳杆菌 733 耐酸、胆盐、温度、盐以及冷冻胁迫能力进行测定,结果如图 2 所示。

观察图 2a 可以发现,在酸胁迫时,随着 pH 值的上升,发酵乳杆菌 733 活菌数呈上升趋势;pH

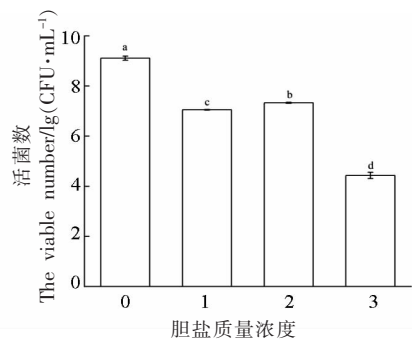
2.5 时菌株活菌数最低,说明强酸环境抑制菌株的生长。

胆盐胁迫时(图 2b),随着胆盐浓度的增加,发酵乳杆菌 733 活菌数呈先下降后轻微上升再下降的趋势;当胆盐质量浓度为 2 g/L 时,菌株活菌数显著高于 1 g/L 和 3 g/L,这可能是由于胆盐的存在,刺激发酵乳杆菌 733 生物膜的形成,使其大量分泌胞外多糖和蛋白质,在菌株细胞表面形成保护层,屏蔽胆盐,同时生物膜的存在可能介导物质交换及营养供给,从而提高菌株存活率<sup>[15]</sup>。当胆盐质量浓度为 3 g/L 时,菌株活菌数显著降低,说明胆盐对生物膜的刺激作用有限,超出阈值后会严重抑制菌株的生长。

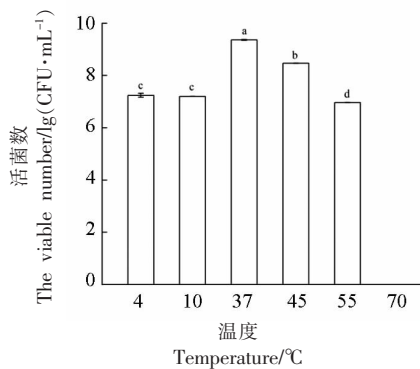
温度胁迫(图 2c)时,菌株活菌数呈先上升后下降的趋势。低温胁迫会抑制菌株的生长,在 4 °C 和 10 °C 培养 24 h 后,两组活菌数无显著差异;与对照组 37 °C 相比,45、55 °C 和 70 °C 培养均抑制菌株的生长,当培养温度 70 °C 时,菌株全部死亡;当培养温度为 45 °C 时,除对照组外,菌株活菌数显著高于其它菌株。该试验结果与 Haddaji 等<sup>[16]</sup>的结果一致,推测其作用机理可能是由于在热应激下



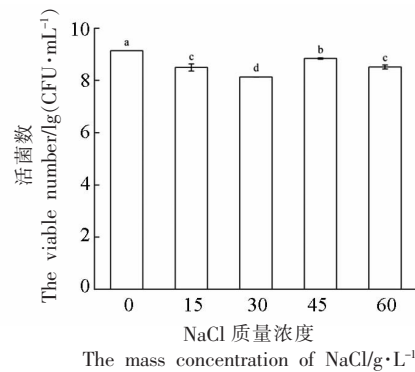
(a) 酸胁迫下发酵乳杆菌 733 存活情况



(b) 胆盐胁迫下发酵乳杆菌 733 存活情况



(c) 温度胁迫下发酵乳杆菌 733 存活情况



(d) 盐胁迫下发酵乳杆菌 733 存活情况

注:图中不同小写字母表示发酵乳杆菌 733 在不同培养条件下活菌数存在显著差异,  $P < 0.05$ 。

图 2 不同环境胁迫下发酵乳杆菌 733 存活情况

Fig.2 The survival of *L. fermentum* 733 under different environmental stresses

生长的发酵乳杆菌 733 具有饱和脂肪酸和直链脂肪酸,它们可以适当提供膜功能所需的流动性,从而提高菌株对高温胁迫的耐受能力。

盐胁迫(图 2d)时,随着 NaCl 质量浓度的增加,发酵乳杆菌 733 活菌数变化规律与胆盐胁迫时相似,当 NaCl 质量浓度为 30 g/L 时,菌株活菌数降到最低值,而当 NaCl 质量浓度为 45 g/L 时,菌株活菌数显著上升,且除对照组外,此浓度下发酵乳杆菌 733 活菌数最高,这可能是由于高渗透性介质中生长时,菌株可以调节细胞内的渗透性以维持细胞伸长所必需的膨压。由于高渗环境导致菌株的休克,会激活某些特定的机制(例如,  $K^+$  或兼容的溶质摄取/合成),防止细胞在含有高浓度盐的介质中死亡,如嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌,产生保护分子(主要是蛋白质),如 DnaK 和 HtrS 操纵子蛋白,保护细胞免受盐诱导的损伤<sup>[7]</sup>。

综上所述,环境胁迫对发酵乳杆菌的生长有一定抑制作用,然而在一些条件下,环境胁迫会刺激菌株作出应激响应来保证菌株活力,超过一定阈值后,这些应激响应无法继续发挥作用,菌株生长受到严重影响。

为探究高产生物膜发酵乳杆菌 733 抗逆性的作用机制,对其全基因组进行测序。

## 2.4 发酵乳杆菌 733 全基因组测序分析

2.4.1 基因组组装与预测 由 HiseqX-Ten 下 PE150 模式对发酵乳杆菌 733 进行测序,测序数据量为 521 250,处理后的总序列长度为 3 092 416 389 bp,平均序列长度为 5 932.69 bp,

N50 长度为 7 810 bp。对三代数据进行组装,并对组装序列进行基因预测,结果见表 2。

由表 2 可知,发酵乳杆菌 733 基因组为环状分子,序列总长度为 2 146 209 bp,平均 GC 含量为 51.55%,腺嘌呤含量为 24.50%,胸腺嘧啶含量为 23.95%,鸟嘌呤含量为 25.91%,胞嘧啶含量为 25.64%,不确定碱基为 0。同时获得编码基因 2 151 个,总长度 1 852 353 bp,平均长度 861.16 bp,占

表 2 最终组装结果序列和编码基因预测统计表

Table 2 Table of the sequence statistics of the final assembly results and statistical statistics of coding genes

指标	结果
菌株名称	发酵乳杆菌 733
线状/环状	环状
序列长度/bp	2 146 209
平均 GC 含量/%	51.55
腺嘌呤含量/%	525 836(24.50)
胸腺嘧啶含量/%	513 960(23.95)
鸟嘌呤含量/%	556 084(25.91)
胞嘧啶含量/%	550 329(25.64)
不确定碱基含量/%	0
基因组大小/bp	2 146 209
基因数量/个	2 151
基因总长度/bp	1 852 353
基因平均长度/bp	861.16
GC 含量(基因区域)/%	52.76
基因长度/基因组长度/%	86.31

基因组大小的 86.31%,GC 含量为 52.76%。

2.4.2 基因组圈图分析 基因组圈图能够完整地显示基因在正、反链上的分布、COG 功能分类、GC 含量、基因组岛和同源基因等。通过一幅完整的基因组图谱,将多种不同的资讯进行整合(此处表示 GC 含量、GC 偏差、tRNA/rRNA、COG 注释、碱基修饰及限制修饰体系有关的酶类),可以更全面、直观地了解该菌的基因特性。发酵乳杆菌 733 的基因组圈图例见图 3。

最外层的一圈表示基因组大小,表明发酵乳杆菌 733 基因组是一个环形的分子,全长 2 146 209 bp;第二和第三圈是正链和负链上的基因,其不同的色彩表示作用不同。COG 数据库,根据基因功能分为 25 类。由图 3 可知,A、B 和 Y 类,即 RNA 加工与修饰、染色体结构、动力学和细胞核结构在发酵乳杆菌 733 中未检出,胞外结构与细胞骨架基因检出数量也很少,可能是由于发酵乳杆菌 733 为原核生物,缺乏真正的细胞核结构,且原核生物染色体结构和胞外结构简单,因此

相关基因较少<sup>[18]</sup>。其余 21 类中,翻译、核糖体结构和生物发生、氨基酸的转运和代谢、动员组:噬菌体原,转座子和仅一般功能预测基因数目位居前 4,分别为 188,185,179 和 167;剩余类中,基因数目超过 100 以上的有 6 类,其余类型数量在 10~100 之间,说明发酵乳杆菌 733 基因组中,不同类型的基因具有不同的拷贝数,这与其执行任务的复杂性有关,也反映随着时间的推移而进化的生物灵活性;第 4 圈为 tRNA 和 rRNA,发酵乳杆菌 733 基因组中有 58 个 tRNA,15 个 rRNA,分别由 5 个 5S rRNA、5 个 16S rRNA 和 5 个 23S rRNA 组成;第 5 圈是 GC-skew 值,即  $G-C/G+C$ ,从生物学角度来说,这个数值为正时,正链更容易转录 CDS,为负值时则相反;第 6 圈为 GC 含量,向外的部分表示该区域 GC 含量高于全基因组平均 GC 含量,峰值越高表示与平均 GC 含量差值越大,反之则亦然,发酵乳杆菌 733 基因组平均 GC 含量为 52.76%。

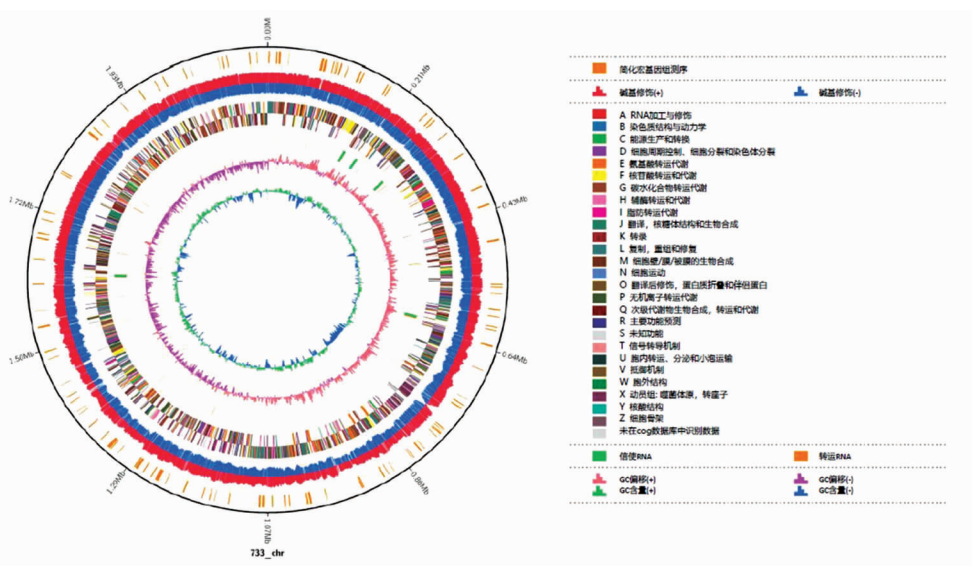


图 3 发酵乳杆菌 733 基因组圈图

Fig.3 The circle map of *L. fermentum* 733 genome

2.4.3 基因组的功能注释 对预测得到的编码基因进行蛋白序列注释(数据库为 NR、SwissProt、COG、GO 和 KEGG),所得注释结果如图 4 所示。

由图 4 可知,在 NR 数据库比到 2 129 个基因,在 SwissProt 数据库比到 1 571 个基因,在

COG 数据库比到 1 817 个基因,在 GO 数据库比到 1 529 个基因,在 KEGG 数据库比到 1 237 个基因。下面对 GO 和 KEGG 数据库注释情况进行介绍。

在 GO 数据库中注释情况如图 5 所示。GO 数

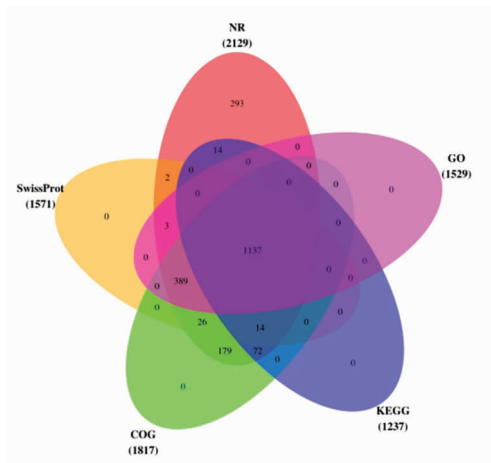


图4 基础数据库共有和特有注释分析统计图

Fig.4 Statistical map of the common and specific annotation analysis of the basic database

数据库将蛋白序列分为三大类:生物过程 BP、细胞组分 CC 和分子功能 MF, 其中与 BP 相关的基因种类和数量最多, 其次是 MF, 与 CC 相关的基因种类和数量最少。与 BP 相关的基因共 25 种, 其中基因数目最多的是细胞过程类的基因, 数量多达 992 条, 其次是代谢过程类的基因, 数量也多达 931 条。其余数量较多的还有应激反应和生物调节类的基因, 数量均为 151 条; 生物过程调节类, 有 137 条。与 MF 相关的基因共 13 种, 其中催化活性类基因, 数量多达 965 条, 其次是附着类的基因 916 条。CC 相关的基因共有 3 种, 其中数量最多的是细胞结构体类的基因, 有 884 条基因。从图 5 还可看出, 这些基因的作用涵盖了细胞新陈代谢的每个部分, 而各基因具有不同的强度, 表明细胞中不同生命进程的强度存在差异。

在 KEGG 数据库中注释情况如图 6 所示。发酵乳杆菌 733 编码基因在 KEGG 功能注释中共分为 6 大类, 分别为代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、生物体系统和人类疾病, 共有 1 064 个基因 38 个通路得到功能注释, 具体结果如图 6 所示。

发酵乳杆菌 733 在代谢途径层面特别是氨基酸代谢和碳水化合物代谢得到较多的基因功能注释。其中 669 个基因在代谢通路上得到注释, 占 KEGG 中全部注释基因的 62.88%。11 个代谢通路中, 与多聚糖的生物合成和代谢通路有关的基因有 37 个, 脂质代谢有关基因 45 个, 核苷酸代谢有

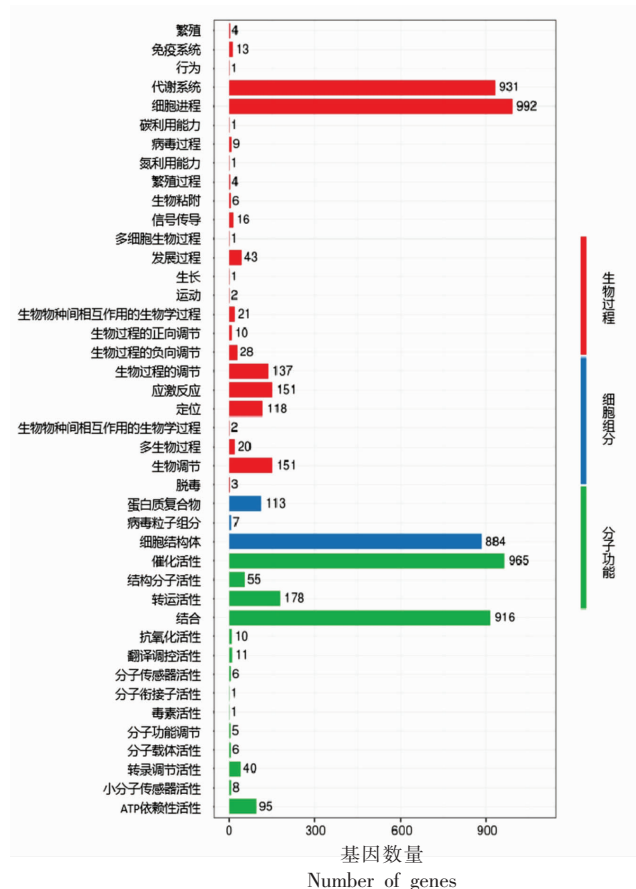


图5 GO Level2 分类水平注释分布图

Fig.5 Distribution diagram of the GO Level2 classification-level annotation

关的基因有 75 个。107 个基因在环境信息处理层面得到注释, 其中与膜运输有关的基因 54 个, 与信号传导有关的基因 53 个。

2.4.4 基于全基因组技术探究发酵乳杆菌 733 抗逆性作用机制 前期试验中发现, 发酵乳杆菌 733 对不良环境有一定耐受能力, 因此通过全基因组技术对其抗性机制进行探究。通过检索 KEGG 数据库发现, 发酵乳杆菌 733 在环境胁迫时主要涉及以下基因的变化: *trxA* (orf00555, K03671)、*perR* (orf01604, K09825)、*ctsR* (orf1791, K03708) 和 *argG* (orf01908, K01940)。

研究发现, Trx 系统在许多生物中高度保守, 由硫氧还蛋白还原酶 (TrxR)、NADPH (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 和 Trx (硫氧还蛋白) 组成<sup>[9]</sup>, 是一类广泛存在于原核和真核生物体内的蛋白质, 具有维持细胞内硫醇基团的还原状态, 参

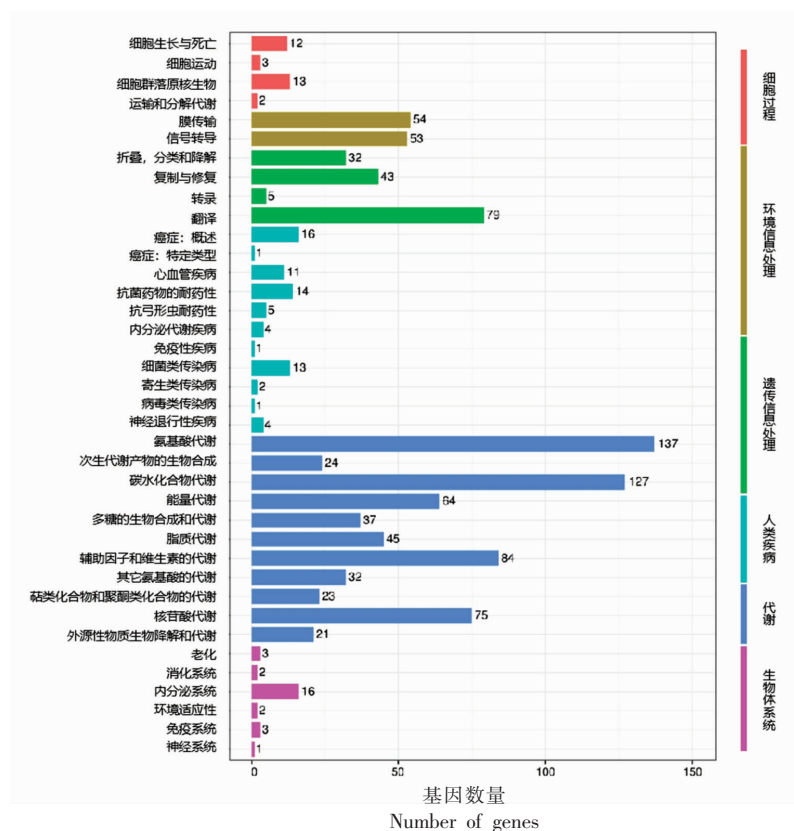


图 6 KEGG 层级二注释结果分类统计图

Fig.6 Classification statistical map of KEGG hierarchical secondary annotation results

与广泛的细胞过程,包括核苷酸还原、硫同化、氧化应激反应和砷盐解毒。对乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中 *trxA* 和 *trxD* 基因进行敲除后发现这两种硫氧还蛋白在乳酸乳球菌中具有不同的抗逆功能。*TrxA* 参与菌株对氧化应激的反应,而 *TrxD* 表现出对砷酸盐和碲酸盐的抗性起重要作用,具体机制尚不明确<sup>[20]</sup>。

*PerR*,属于 *Fur* 家族(是一种控制铁载体和铁转运蛋白基因表达的铁敏感性阻遏蛋白),其功能主要是细胞的氧化应激应答,同时也能维持细胞内金属离子的稳态。*PerR* 包含两个金属结合位点,研究表明其中一个位点上的  $Zn^{2+}$  可以被激活并与 DNA 结合,通过  $Fe^{2+}$  或  $Mn^{2+}$  作为辅阻遏物可以产生两种形式的 *perR*, 分别为 *PerR:Zn,Fe* 或 *PerR:Zn,Mn*。因此大部分 *PerR* 的调节基因会在细胞处于低水平  $H_2O_2$  或同时缺乏铁和锰的情况下发生阻遏效应<sup>[21]</sup>。

乳酸菌中,受 *CtsR* 抑制因子调控的 III 类基因保守性不高。这表明 *CtsR* 是一种广泛的转录抑

制因子,参与革兰氏阳性细菌的热休克调节,因此它被认为是细胞蛋白质质量的主要调节者,并控制与蛋白稳态有关的基因表达<sup>[22]</sup>。对植物乳杆菌 WCFS1 中 *hrcA* 和 *ctsR* 基因分别敲除后发现,*hrcA* 和 *ctsR* 基因的单一突变导致与转录调控、初级代谢、运输、结合和不同化合物的生物合成相关的不同基因的表达发生显著变化<sup>[23]</sup>。*HrcA* 和 *ctsR* 的缺失表明受压力相关调控基因影响的基因调控网络之间的串扰的复杂性<sup>[24]</sup>。

精氨酸代谢<sup>[25]</sup>及精氨酸脱亚胺酶途径<sup>[26]</sup>的调节作为酸胁迫响应在乳酸菌中被广泛报道。精氨酸琥珀酸合成酶(*ASS*)由 *argG* 基因编码,可以催化瓜氨酸、天冬氨酸和 ATP 产生精氨酸琥珀酸,是精氨酸合成和尿素循环的限速酶<sup>[27]</sup>。精氨酸琥珀酸裂解酶由 *argH* 基因编码,可以催化精氨酸琥珀酸产生精氨酸<sup>[28]</sup>,是尿素循环相关的重要酶,两个蛋白的合成均受到 *ArgR* 蛋白的调控<sup>[29]</sup>。研究发现,*argG*<sup>[30]</sup>和 *argH*<sup>[31]</sup>基因的转录和表达上调与干酪乳杆菌的酸胁迫响应有关。据报道,DNA 结合蛋

白 ArgR 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*)<sup>[32]</sup>、芽孢杆菌 (*Bacillus*)<sup>[33]</sup> 以及乳酸菌的精氨酸代谢调节中发挥重要的作用<sup>[34]</sup>。

综上所述, 发酵乳杆菌 733 在经历不同环境胁迫时, 主要会对 *trxA*、*perR*、*ctsR* 和 *argR* 基因产生影响, 然而这些基因通过哪些作用方式调控菌株抗逆性还有待研究。

### 3 结论

高产生物膜发酵乳杆菌 733 在模拟人工胃肠液中有较高的存活率且不分泌有害代谢产物, 是 1 株具有潜在益生特性的乳酸菌。菌株在酸、胆盐、温度和盐胁迫环境中生长受到抑制。通过对其全基因组测序得出发酵乳杆菌 733 基因组经组装后长度为 2 146 209 bp, GC 含量为 52.76%, 共 2 151 个编码基因, 基因组中包含 5 个 5S 的 rRNA, 58 个 tRNA。在 KEGG 数据库中共注释到 4 个与胁迫密切相关的基因, 分别为 *trxA*、*perR*、*ctsR* 和 *argG*。

### 参 考 文 献

- [1] SUN Z, ZHANG W, BILIGE M, et al. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus fermentum* F-6 isolated from raw milk [J]. Journal of Biotechnology, 2015, 194: 110-111.
- [2] ZHAO Y, HONG K, ZHAO J, et al. *Lactobacillus fermentum* and its potential immunomodulatory properties [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 56: 21-32.
- [3] YANG D, LYU W, HH Z, et al. Probiotic effects of *Lactobacillus fermentum* ZJUIDS06 and *Lactobacillus plantarum* ZY08 on hypercholesteremic golden hamsters [J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 705763.
- [4] PATEL D, SAKURE A, LODHA D, et al. Significance of *Lactobacillus fermentum* on antioxidative and anti-inflammatory activities and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidative peptides from fermented camel milk (Indian Breed) [J]. Journal of the American College of Nutrition, 2021, 42(1): 75-84.
- [5] XU Y, ZHU Y. Complete replacement of nitrite with a *Lactobacillus fermentum* on the quality and safety of Chinese fermented sausages [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 704302.
- [6] FOXX-ORENSTEIN A E, CHEY W D. Manipulation of the gut microbiota as a novel treatment strategy for gastrointestinal disorders [J]. American Journal of Gastroenterology Supplements, 2012, 1(1): 41-46.
- [7] 王学良, 韩雪, 王海娟, 等. 乳酸菌在各种胁迫下的应激反应研究进展 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(6): 365-369.
- [8] WANG X L, HAN X, WANG H J, et al. Studying progress of *Lactobacillus*'s responses in a variety of stress [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(6): 365-369.
- [9] ROBERT D F, MARK D A, OWEN W, et al. Whole-genome Random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd [J]. Science, 1995, 269(5223): 496-512.
- [10] 刘蕾, 武瑞赞, 李军, 等. 类植物乳杆菌 L-ZS9 生物被膜态的黏附能力及形成影响因素 [J]. 食品科学, 2016, 37(15): 136-143.
- [11] LIU L, WU R Y, LI J, et al. Adhesion ability of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 and influencing factors of its biofilm formation [J]. Food Science, 2016, 37(15): 136-143.
- [12] ZHANG Y, GU Y, WU R, et al. Exploring the relationship between the signal molecule AI-2 and the biofilm formation of *Lactobacillus sanfranciscensis* [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154: 112704.
- [13] 钟华晨, 张悦, 顾悦, 等. 高产生物膜乳酸菌的筛选、鉴定及胞外多糖分泌条件的研究 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 76-86.
- [14] ZHONG H C, ZHANG Y, GU Y, et al. Screening and identification of high-producing biofilm lactic acid bacteria and studies on the conditions of extracellular polysaccharide secretion [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(7): 76-86.
- [15] 张悦, 贺银凤, 顾悦, 等. 高产生物膜乳酸菌抗逆性及其抗氧化特性 [J]. 农业工程学报, 2021, 37(6): 282-288.
- [16] ZHANG Y, HE Y F, GU Y, et al. Stress resistance and antioxidant properties of lactic acid bacteria with high biofilm production [J]. Transactions of



- the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2021, 37(6): 282–288.
- [13] 魏朝治, 裘纪莹, 陈蕾蕾, 等. 恶味乳杆菌 B2 的益生特性及安全性评价[J]. 江苏农业科学, 2022, 47(5): 162–165.
- WEI C Z, QIU J Y, CHEN L L, et al. Evaluation of the probiotic characteristics and safety of *Lactobacillus perolens* B2[J]. 2022, 47(5): 162–165.
- [14] RUIZ-CAPILLAS C, HERRERO A. Impact of biogenic amines on food quality and safety[J]. Foods, 2019, 8(2): 62.
- [15] 骆海龙, 张安杰, 邱雪梅, 等. 肠道细菌适应胆盐胁迫的机制研究进展[J]. 湖北医药学院学报, 2020, 39(5): 510–515.
- LUO H L, ZHANG A J, QIU X M, et al. Research progress on the mechanisms of intestinal bacterial adaptation to bile salt stress [J]. Journal of Hubei Medical College, 2020, 39(5): 510–515.
- [16] HADDAJI N, KRIFI B, LAGHA R, et al. Effect of high temperature on viability of *Lactobacillus casei* and analysis of secreted and GroEL proteins profiles [J]. Academic Journals, 2015, 7(3): 29–35.
- [17] PALOMINO M M, WAEHNER P M, FINA J, et al. Influence of osmotic stress on the profile and gene expression of surface layer proteins in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(19): 8475–8484.
- [18] 李建宏. 优良植物根际促生菌 *Bacillus mycoides* Gnyt1 特性研究及全基因组测序分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- LI J H. The characteristics of a fine plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus mycoides* Gnyt1 and its whole genome sequencing analysis[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.
- [19] 董志梅. 单核细胞增多性李斯特菌硫氧还蛋白 TrxA 介导的感染机制研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017.
- DONG Z M. Mechanical study of thioredoxin A involved in *Listeria monocytogenes* infection [D]. Hangzhou: Zhejiang Agricultural and Forestry University, 2017.
- [20] EFLER P, KILSTRUP M, JOHNSEN S, et al. Two *Lactococcus lactis* thioredoxin paralogues play different roles in responses to arsenate and oxidative stress[J]. Microbiology, 2015, 161(3): 528–538.
- [21] 蔡雯雯. 副猪嗜血杆菌 Fur 蛋白和猪链球菌 PerR 蛋白与启动子的相互作用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- CAI W W. Interactions of *Haemophilus parasuis* Fur protein and *Streptococcus suis* PerR protein with their target promoters[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.
- [22] SOKOOWSKA B. Effect of high hydrostatic pressure on stress-related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* expression patterns in selected *Lactobacilli* strains [J]. Genes, 2021, 12(11): 1720.
- [23] KONSTANTINOS P, ÁNGEL A, A P B, et al. Stress physiology of lactic acid bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016, 80(3): 837–890.
- [24] VEEN B, BONGERS R S, WELS M, et al. Transcriptome signatures of class I and III stress response deregulation in *Lactobacillus plantarum* reveal pleiotropic adaptation [J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12(1): 1–15.
- [25] BUDIN-VERNEUIL A, MAGUIN E, AUFRAY Y, et al. Genetic structure and transcriptional analysis of the arginine deiminase (ADI) cluster in *Lactococcus lactis* MG1363[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2006, 52(7): 617–622.
- [26] POOLMAN B, DRIESSEN A J, KONINGS W N. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5597–5604.
- [27] LEMKE C T, HOWELL P L. Substrate induced conformational changes in argininosuccinate synthetase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(15): 13074–13081.
- [28] CAO Y L, LI G L, WANG K T, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of argininosuccinate lyase from *Streptococcus mutans*[J]. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications, 2011, 67(Pt 6): 682–684.
- [29] ZHAO Q, LUO Y, DOU W, et al. Controlling the transcription levels of *argG H* redistributed L-arginine metabolic flux in N-acetylglutamate kinase and ArgR-deregulated *Corynebacterium crenatum*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(1): 55–66.
- [30] WU C, ZHANG J, CHEN W, et al. A combined physiological and proteomic approach to reveal lac-

- tic-acid-induced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(2): 707-722.
- [31] LAMBERT J M, BONGERS R S, KLEEREBEZEM M. Cre-lox-Based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(4): 1126-1135.
- [32] LARSEN R, BUIST G, KUIPERS O P, et al. ArgR and AhrC are both required for regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(4): 1147-1157.
- [33] NICOLOFF H, ARSENE PLOETZE F, MALANDAIN C, et al. Two arginine repressors regulate arginine biosynthesis in *Lactobacillus plantarum* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(18): 6059-6069.
- [34] CUNIN R, ECKHARDT T, PIETTE J, et al. Molecular basis for modulated regulation of gene expression in the arginine regulon of *Escherichia coli* K-12 [J]. *Nucleic Acids Research*, 1983, 11(15): 5007-5019.

### Stress Resistance and Whole Genome Analysis of a *Lactobacillus fermentum* with High Biofilm Production

Zhang Yue<sup>1,2</sup>, Jiang Ning<sup>2</sup>, Zheng Yanxue<sup>1</sup>, Gu Yue<sup>1</sup>, Wang Yan<sup>1</sup>, He Yinfeng<sup>1\*</sup>  
(<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018  
<sup>2</sup>Inner Mongolia Institute of Quality and Standardization, Hohhot 010070)

**Abstract** To explore the resistance mechanism of high biofilm production in *Lactobacillus fermentum* 733, its tolerance to simulated artificial gastrointestinal fluids, acid, bile salts, temperature, and salt stress, as well as the secretion of harmful metabolites, were determined. Additionally, a whole-genome sequencing analysis was conducted. The results showed that the survival rates of high biofilm production *L. fermentum* 733 in simulated artificial gastrointestinal fluids were (98.1±0.5)% and (98.1±1.2)%, respectively, indicating high survival rates, and the strain did not produce harmful metabolites. Growth of the strain was inhibited in different stress environments, while under specific conditions, it stimulated stress responses to ensure strain vitality. The *L. fermentum* 733 mainly affected the *trxA*, *perR*, *ctsR* and *argR* genes when experiencing different environmental stresses, however, how these genes regulate the stress resistance of strain remains to be further studied.

**Keywords** *Lactobacillus fermentum*; anti-stress characteristics; whole genome; stress mechanism