



全基因组测序揭示两株泡菜源植物乳杆菌基因型差异和潜在益生特性

伍亚龙^{2,3}, 杨恺¹, 史梅莓¹, 吕鹏军¹, 王勇^{2,3}, 张其圣^{1,3*}

1 四川省食品发酵工业研究设计院有限公司, 四川 成都 611130

2 四川益动源生物科技有限公司, 四川 眉山 620000

3 四川东坡中国泡菜产业技术研究院, 四川 眉山 620000

伍亚龙, 杨恺, 史梅莓, 吕鹏军, 王勇, 张其圣. 全基因组测序揭示两株泡菜源植物乳杆菌基因型差异和潜在益生特性[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2880-2898.

WU Yalong, YANG Kai, SHI Meimei, LYU Pengjun, WANG Yong, ZHANG Qisheng. Whole-genome sequencing reveals genotypic differences and potential probiotic properties of two Paocai-derived *Lactiplantibacillus plantarum* strains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2880-2898.

摘要: 【目的】为了探究植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)基因型差异和潜在益生特性, 采用全基因组测序技术对其进行测序并解析基因组序列及生物特性。【方法】本研究基于 HiSeq 和 PacBio 测序平台, 对团队前期从四川多代泡菜中分离获得、体外益生特性评价良好的潜在益生菌菌株 *L. plantarum* Eden-Star PC06 和 *L. plantarum* Eden-Star PC108 的全基因组进行测序。利用相关生物信息学软件对原始数据进行组装及其后续的功能注释、分子进化、菌株安全性、次级代谢产物合成基因簇以及益生特性相关基因进行分析。【结果】通过基因组组装得到了 2 株植物乳杆菌的全基因组信息, *L. plantarum* Eden-Star PC06 和 Eden-Star PC108 基因组大小分别为 3 163 902 bp 和 3 205 054 bp; GC 含量分别为 44.68%和 44.67%; 分别包含 3 161 个和 3 197 个 DNA 编码序列; 功能基因数据库比对结果显示 2 株菌在碳水化合物利用、氨基酸利用和糖基转移酶等基因上得到大量注释; 通过比对数据库, 在 2 株植物乳杆菌全基因组上发现了 4 个与肠液耐受相关的胆盐水解酶基因、完整的植物乳杆菌细菌素合成相关基因簇和抵御多种胁迫的益生相关基因。【结论】本研究通过全基因组测序在基因水平上探究了 *L. plantarum* Eden-Star PC06 和 Eden-Star PC108 基因型差异和益生特性基因, 证明 *L. plantarum* Eden-Star PC06 和 Eden-Star PC108 是 2 株有应用前景的益生菌菌株, 以期为筛选优良益生菌菌株和评价其益生特性提供遗传学基础。

关键词: 植物乳杆菌; 全基因组测序; 比较基因组; 功能基因; 胆盐水解酶; 细菌素

资助项目: 四川省科技创新苗子工程培育项目(2022110)

This work was supported by the Sichuan Science and Technology Innovation Seedling Project Cultivation Project (2022110).

*Corresponding author. E-mail: bigbeastone@163.com

Received: 2022-11-08; Accepted: 2023-02-07; Published online: 2023-02-21

Whole-genome sequencing reveals genotypic differences and potential probiotic properties of two Paocai-derived *Lactiplantibacillus plantarum* strains

WU Yalong^{2,3}, YANG Kai¹, SHI Meimei¹, LYU Pengjun¹, WANG Yong^{2,3}, ZHANG Qisheng^{1,3*}

1 Sichuan Food and Fermentation Industry Research & Design Institute Co., Ltd., Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Sichuan Eden Biology Technology Co., Ltd., Meishan 620000, Sichuan, China

3 Sichuan Dongpo Chinese Paocai Industrial Technology Research Institute, Meishan 620000, Sichuan, China

Abstract: [Objective] To explore the genotypic differences and potential probiotic properties of *Lactiplantibacillus plantarum* by using whole genome sequencing technology. **[Methods]** Based on the HiSeq and PacBio, this study sequenced the potential probiotic strains *L. plantarum* Eden-Star PC06 and *L. plantarum* Eden-Star PC108 with good evaluation of *in vitro* probiotic properties isolated from Sichuan multi-generation Paocai in the previous study. The relevant bioinformatics software was used to assemble the raw data and analyze the subsequent functional annotation, molecular evolution, strain safety, secondary metabolite synthesis gene clusters, and probiotic-related genes. **[Results]** The whole-genome information of two *L. plantarum* strains was obtained through gene assembly, and the genome sizes of *L. plantarum* Eden-Star PC06 and Eden-Star PC108 were 3 163 902 bp and 3 205 054 bp, respectively. The GC content of Eden-Star PC06 and Eden-Star PC108 was 44.68% and 44.67%, respectively, and they contained 3 161 and 3 197 DNA coding sequences, respectively. The comparison results of functional gene database showed that the two strains were extensively annotated on genes such as carbohydrate utilization, amino acid utilization, and glycosyltransferase. We found four genes related to intestinal fluid tolerance, intact gene clusters related to bacteriocin synthesis of *L. plantarum*, and probiotic genes resistant to multiple stresses on the whole genome of two strains of *L. plantarum* in the comparison database. **[Conclusion]** This study explores the genotypic differences and potential probiotic properties of two *L. plantarum* strains Eden-Star PC06 and Eden-Star PC108 at the gene level by whole-genome sequencing, and it has proved that *L. plantarum* Eden-Star PC06 and Eden-Star PC108 are potential probiotic strains with promising applications. This study is expected to provide a genetic basis for screening out excellent probiotic strains and evaluating their probiotic properties.

Keywords: *Lactiplantibacillus plantarum*; whole genome sequencing; comparative genomics; functional gene; bile salt hydrolase; bacteriocin

植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) 是一种兼性异型乳酸菌, 广泛存在于环境、人体胃肠道和发酵蔬菜食品中。近年来, 大量研究表明, 植物乳杆菌是一种多功能益生菌, 具有抗氧化、降解胆固醇、维持宿主肠道菌群平衡和提高

人体免疫等功能^[1-2]。Choi 等^[3]从泡菜中分离出一株植物乳杆菌 EM, 经研究发现具有降低胆固醇的作用。Wang 等^[4]的研究发现, 植物乳杆菌 LPL-1 能合成具有抗菌活性的植物乳杆菌素, 可以有效代替抗菌素抑制致病菌的生长。由于植

物乳杆菌的益生特性,使其在食品和医用等领域都有广泛应用。

近年来高通量测序技术的不断发展进步,为研究人员开拓了一个全新的研究方向。2004 年第 1 株分离自人体口腔的植物乳杆菌 WCFS1 完成全基因组测序后,截至 2022 年 8 月,已有超过 100 株植物乳杆菌完成全基因组测序^[5]。而现有的生理生化方法对植物乳杆菌潜在益生特性的研究已十分有限,通过全基因组测序探究基因组与潜在益生特性之间关系,是一条筛选优质益生菌菌株的有效途径^[6]。有研究指出,植物乳杆菌 EM 是一株具有抗菌活性、降胆固醇和耐酸胆汁的益生菌,通过全基因组分析其包含耐酸耐胆盐、耐温抗氧化等基因发现,其同时含有与抗菌活性相关的抗菌素基因簇以及与降低血清胆固醇相关的胆盐水解酶基因^[7]。

本团队前期从四川多代泡菜中分离出 114 株植物乳杆菌,并对其生物特性和安全性进行评价,最终得到 13 株具有潜在益生特性的植物乳杆菌,从中选取 2 株植物乳杆菌 Eden-Star PC06 和 Eden-Star PC108 进行全基因组测序,其中 Eden-Star PC06 耐酸耐胆盐能力较为突出,而 Eden-Star PC108 拥有较强的自聚集和共聚集能力。本研究中完成图采用二代与三代结合即 Illumina HiSeq+PacBio 的测序方式,每个样品同时提供不低于基因组 100×的 PacBio 测序数据和 100×Illumina 测序数据,保证更完整更精确的组装,完成图可以避免小质粒(<15 kb)信息的丢失,保证获得包含质粒的完整基因组。利用比较基因组和功能基因注释等方法,从基因组水平上揭示菌株间的差异,并进一步挖掘其益生相关功能基因,以判断菌株作为益生菌菌株的潜力,同时为选优良益生菌菌株和评价其益生特性提供遗传学基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验菌株信息

本研究测定的 2 株 *L. plantarum* Eden-Star PC06 (下文中简称为 PC06)和 Eden-Star PC108 (下文中简称为 PC108)由四川益动源生物科技有限公司保藏,均分离自四川多代泡菜,已在中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbial Culture Preservation and Management Center, CGMCC)注册专利,保藏号分别为 No. 25060 和 No. 25061。项目已上传国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center, NMDC),项目编号(NMDC accession)为 NMDC10018235,基因组编号(accession number)分别为 NMDC60045920 和 NMDC60045921。

本研究选取 12 株完成全基因组完成图且有研究报道具有益生特性的植物乳杆菌作为参考菌株(表 1),参与比较基因组的菌株信息均来自 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank 数据库。

1.2 全基因组测序和组装

全基因组由上海美吉生物医药科技有限公司基于 Illumina HiSeq 和 PacBio Sequel 平台进行测序。细菌基因组扫描图是利用短序列组装软件 SOAPdenovo2 (<http://soap.genomics.org.cn/>)对二代测序后的优化序列进行多个 Kmer 参数的拼接,得到最优的 contigs 组装结果,然后把 reads 比对到 contig 上,根据 reads 的配对端(paired-end)和重叠(overlap)关系,对组装结果进行局部组装和优化,形成 scaffolds。细菌基因组完成图利用组装软件 Unicycler^[8]进行三代序列组装,组装过程中会借助 Pilonjin 软件进行序列校正,如果最终组装序列两端存在一定长度以上的 overlap,则将序列成环并截去其中一端 overlap 序列^[9]。最终可得到完整的染色体及质粒序列。

表 1 植物乳杆菌参考基因组信息

Table 1 Reference genome information of *Lactiplantibacillus plantarum*

Strains	Whole genome size (bp)	Origin	GenBank ID
<i>L. plantarum</i> WCFS1	3 308 273	Human saliva	NC_004567
<i>L. plantarum</i> JDM1	3 197 759	Human digestive tract	NC_012984.1
<i>L. plantarum</i> NCU116	3 354 689	Pickles	NZ_CP016071
<i>L. plantarum</i> ST-III	3 254 376	Pickles	NC_014554.1
<i>L. plantarum</i> P9	3 016 749	Fermented sour porridge	NZ_CP060172.1
<i>L. plantarum</i> Zhang-LL	2 952 218	Fermented rice products	NZ_CP011769.1
<i>L. plantarum</i> Lp-6	3 101 304	Chinese koumiss	NZ_CP060182.1
<i>L. plantarum</i> KLDS1.0391	2 886 607	Traditional fermented dairy products	CP019348.1
<i>L. plantarum</i> ZJ316	3 203 964	Infant feces	NC_020229.1
<i>L. plantarum</i> 10CH	3 311 056	Cheese	NZ_CP023728.1
<i>L. plantarum</i> CAUH2	3 254 946	Sichuan pickles	NZ_CP015126.1
<i>L. plantarum</i> EM	3 184 808	Korean kimchi	NZ_CP037429.1

1.3 全基因组特征预测

利用 Glimmer (<http://ccb.jhu.edu/software/glimmer/index.shtml>)、GeneMarkS、Prodigal 软件对基因组中的编码序列(coding sequence, CDS)进行预测。扫描图组装结果默认使用 Glimmer 进行预测,完成图组装结果默认使用 Glimmer 预测染色体基因组,使用 GeneMarkS 预测质粒基因组^[9]。利用 tRNAscan-SE v2.0 软件(<http://trna.ucsc.edu/software/>)对基因组中包含的 tRNA 进行预测,可以获得每个样本基因组中 tRNA 的核苷酸序列信息,反密码子信息及二级结构信息。利用 Barrnap 软件 (<https://github.com/tseemann/barrnap>)对基因组中包含的 rRNA 进行预测,获得每个样本基因组中所有 rRNA 的种类、位置、序列信息^[10]。最后采用 CGView 绘制基因组圈图。

1.4 构建系统发育树

对本研究中 2 株植物乳杆菌和 12 株参考菌株进行系统发育分析,利用 MEGA X 软件基于 16S rRNA 基因序列构建邻接(neighbor-joining, NJ)树,参数 bootstrap 值设为 1 000。

1.5 平均核苷酸一致性(ANI)分析

平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)是基于两两基因组之间所有直系同源核苷酸序列比较的一个平均值,主要用于在全基因组水平评估物种间的亲缘关系。本研究利用软件 PYANIV0.2.10 (<https://github.com/widdowquinn/pyani.git>)计算 *L. plantarum* PC06 和 *L. plantarum* PC108 与参考菌株之间的相似性并绘制聚类热图。

1.6 基因组功能注释与分析

使用 Diamond 和 blast2go 软件分别通过 COG (clusters of orthologous groups)、KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)和 CAZy (carbohydrate-active enzymes)数据库进行功能基因注释。使用 VFDB (virulence factors database)数据库核心数据集(setA)和完整数据集(setB)中 14 个基础毒力因子类别对细菌所有基因组进行毒力因子预测,采用严格参数(相似性>80%,覆盖率>60%,E 值 $\leq 1e-5$)和一般参数(相似性>30%,覆盖率>70%,E 值 $\leq 1e-5$)^[11]。使用 CARD (comprehensive antibiotic resistance

database, <http://arpcard.mcmaster.ca>)耐药基因标识符(RGI)软件(CARD 比对条件设置为 loose)^[11]从细菌基因组序列中预测抗微生物耐药性(AMR)基因,提供由抗生素耐药性本体(ARO)分类标签和抗生素耐药基因(ARG)注释以初步评估菌株的安全性。此外,利用 BLAST 软件与参考菌株 *L. plantarum* WCFS1 进行对比,挖掘胃肠道耐受性相关基因;利用 BAGEL4 (<http://bagel.molgenrug.nl/index.php>)在线分析软件对基因组序列进行产植物乳杆菌素相关基因簇的挖掘,综合分析益生相关基因以初步探究其益生潜力。

2 结果与分析

2.1 植物乳杆菌 PC06 和 PC108 全基因组概况

对测序样品 *L. plantarum* PC06 和 PC108 进行数据评估和序列组装,得到基因组组装结果(表 2)和基因组基本特征(表 3)。

测序结果显示, *L. plantarum* PC06 全基因组包含 1 个片段长度为 3 163 902 bp 的环状染色体,其 GC 含量为 44.68%,含 6 个完整质粒,其序列长度和 GC 含量分别为 67 746 bp 和 38.30%、61 375 bp 和 39.23%、40 384 bp 和 36.68%、6 143 bp 和 36.82%、3 516 bp 和 37.32%、2 042 bp 和 37.95%。*L. plantarum* PC06 预测有 3 161 个编码基因。

L. plantarum PC108 全基因组包含 1 个片段长度为 3 205 054 bp 的环状染色体,其 GC 含量为 44.67%,含 5 个完整质粒,其序列长度和 GC 含量分别为 49 882 bp 和 41.79%、35 865 bp 和 39.79%、34 459 bp 和 41.37%、9 568 bp 和 36.95%、9 450 bp 和 35.95%。*L. plantarum* PC108 预测有 3 197 个编码基因。

针对 *L. plantarum* PC06 和 PC108 组装的基

因组序列,利用 GCView 对染色体(chromosome, Chr)进行绘制,包含全部基因、COG 注释基因、prophage、CRISPR、ncRNA、GC 含量以及 GC skew 结果。其图谱见图 1。

2.2 系统发育树构建

为了探究 *L. plantarum* PC06 和 PC108 两株菌与其他具有益生特性的 12 株 *L. plantarum* 之间的关系,基于 16S rRNA 基因构建包含 PC06、PC108 以及 12 株参考菌株的系统发育树(图 2)。发现 PC06 与 EM 和 CAUH2 具有较近的亲缘关系,EM 和 CAUH2 的来源均为泡菜。PC108 与 JDM1 和 ZJ316 亲缘关系较近,而 JDM1 与 ZJ316 均来源于人体,从系统发育树中也可看出 PC06 与 PC108 亲缘关系相距较远,这意味着 PC108 可能往更适应人体环境的方向进化。

表 2 植物乳杆菌 PC06 与 PC108 基因组组装结果详情

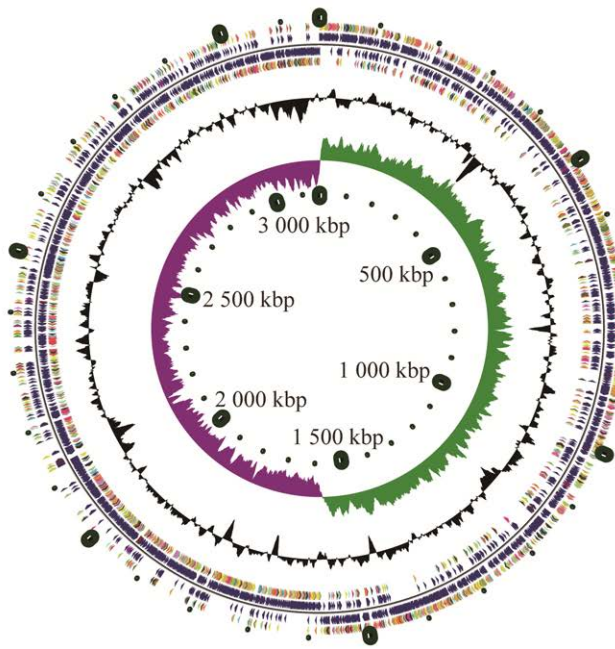
Table 2 Details of *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 and PC108 gene assembly results

Characteristics	<i>L. plantarum</i> PC06	<i>L. plantarum</i> PC108
Total reads No.	410 272	508 057
Total bases (bp)	4 648 952 898	5 873 062 770
Genome size (bp)	3 343 066	3 344 278
Largest (bp)	294 068	228 819
Average length (bp)	11 331.39	11 559.85
Clean Q20 (%)	96.59	96.70
Clean Q30 (%)	90.64	90.89
G+C (%)	44.33	44.50

表 3 植物乳杆菌 PC06 和 PC108 基因组基本特征
Table 3 Basic characteristics of the *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 and PC108 genomes

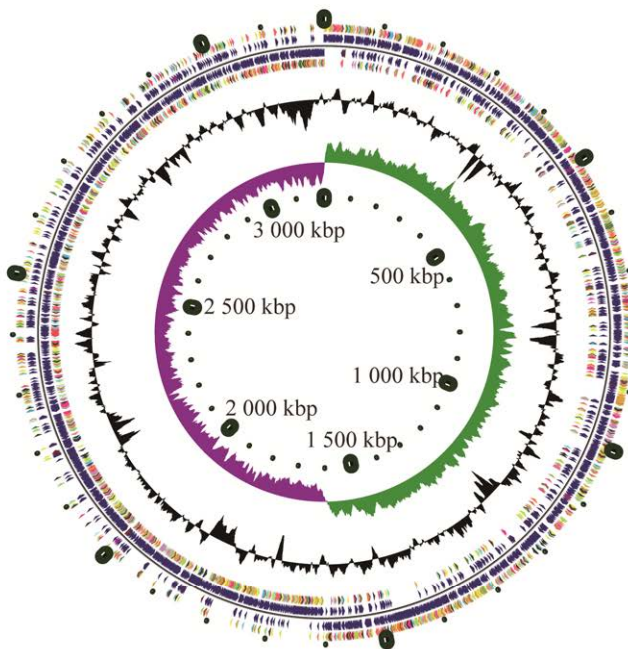
Genomic characteristics	PC06	PC108
Number of CDS	3 161	3 197
Number of tRNA	73	69
Number of rRNA	16	16
Number of sRNA	48	49

A



- A RNA processing and modification
- B Chromation structure and dynamics
- C Energy production and conversion
- D Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
- E Amino acid transport and metabolism
- F Nucleotide transport and metabolism
- G Carbohydrate transport and metabolism
- H Coenzyme transport and metabolism
- I Lipid transport and metabolism
- J Translation, ribosomal structure and biogenesis
- K Transcription
- L Replication, recombination and repair
- M Cell wall/Membrane/Envelope biogenesis
- N Cell motility
- O Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
- P Inorganic ion transport and metabolism
- Q Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- R Function unknown
- S Function unknown
- T Signal transduction mechanisms
- U Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
- V Defense mechanisms
- W Extracellular structure
- Y Nuclear structure
- Z Cytoskeleton
- CDS
- tRNA
- rRNA
- Others
- GC content
- GC skew+
- GC skew-

B



- A RNA processing and modification
- B Chromation structure and dynamics
- C Energy production and conversion
- D Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
- E Amino acid transport and metabolism
- F Nucleotide transport and metabolism
- G Carbohydrate transport and metabolism
- H Coenzyme transport and metabolism
- I Lipid transport and metabolism
- J Translation, ribosomal structure and biogenesis
- K Transcription
- L Replication, recombination and repair
- M Cell wall/Membrane/Envelope biogenesis
- N Cell motility
- O Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
- P Inorganic ion transport and metabolism
- Q Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- R Function unknown
- S Function unknown
- T Signal transduction mechanisms
- U Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
- V Defense mechanisms
- W Extracellular structure
- Y Nuclear structure
- Z Cytoskeleton
- CDS
- tRNA
- rRNA
- Others
- GC content
- GC skew+
- GC skew-

图 1 *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 与 PC108 基因组图谱

Figure 1 Genome mapping of *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 and PC108. A: *L. plantarum* PC06. B: *L. plantarum* PC108. The information corresponding to the outer to inner circle is genome size identification, positive strand, gene information on negative strand, GC content, GC-Skew, and genome size identification.

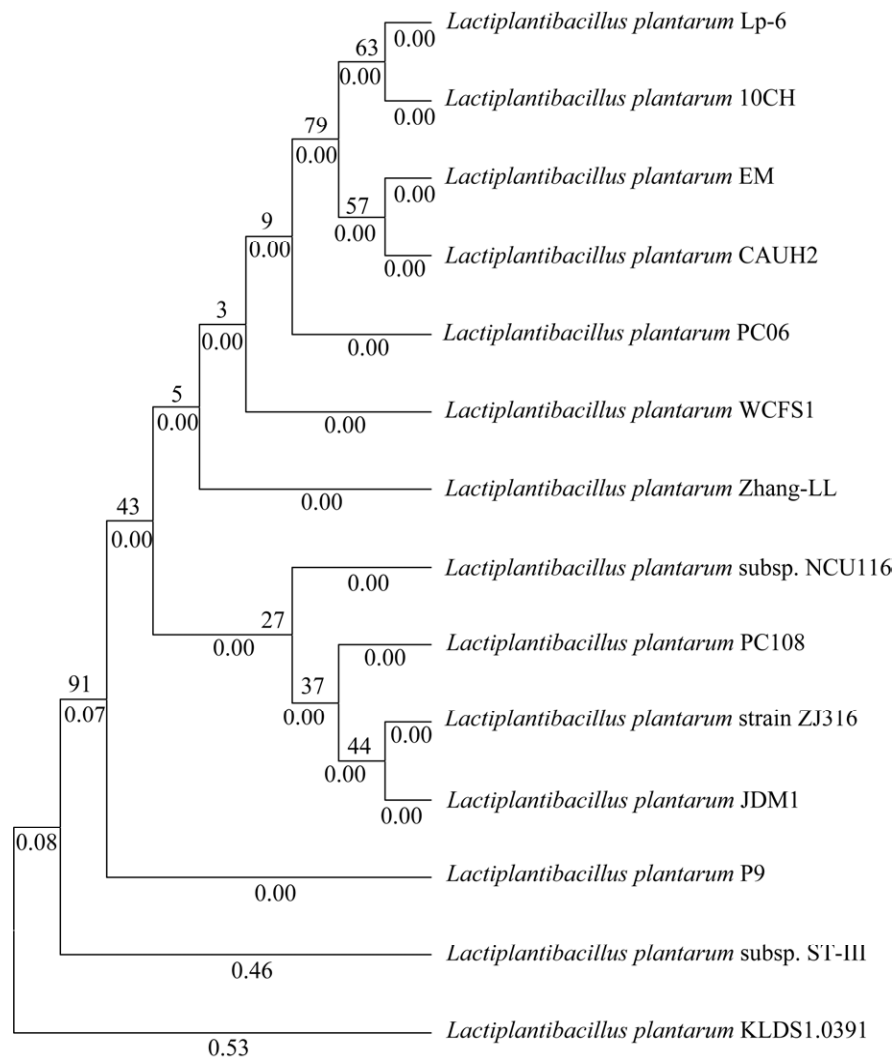


图 2 16S rRNA 基因系统发育树分析

Figure 2 Phylogenetic tree analysis of 16S rRNA gene. Above the node is the self-spreading value; Below the branch is the length of the evolutionary branch, which represents the degree of change in the evolutionary branch, the shorter the difference means the smaller the difference and the closer the evolutionary distance.

2.3 平均核苷酸一致性(ANI)分析

ANI 是基于两两基因组之间所有直系同源核苷酸/氨基酸序列比较的一个平均值, 主要用于在全基因组水平评估物种间的亲缘关系, 反映基因组之间进化距离关系, 一般认为 ANI \geq 95% 为同种^[12]。

本研究对 14 株植物乳杆菌全基因组序列

进行 ANI 分析, 并绘制了聚类热图(图 3)。结果显示全部菌株之间 ANI 均大于 98.8%, 可从基因组层面上确认 PC06 和 PC108 为植物乳杆菌, 且不同植物乳杆菌基因组间存在差异。其中 PC06 和 PC108 之间 ANI 为 99.05%; PC06 和 EM 的 ANI 最高为 99.84%; PC108 和 ZJ316 的 ANI 最高为 99.56%。

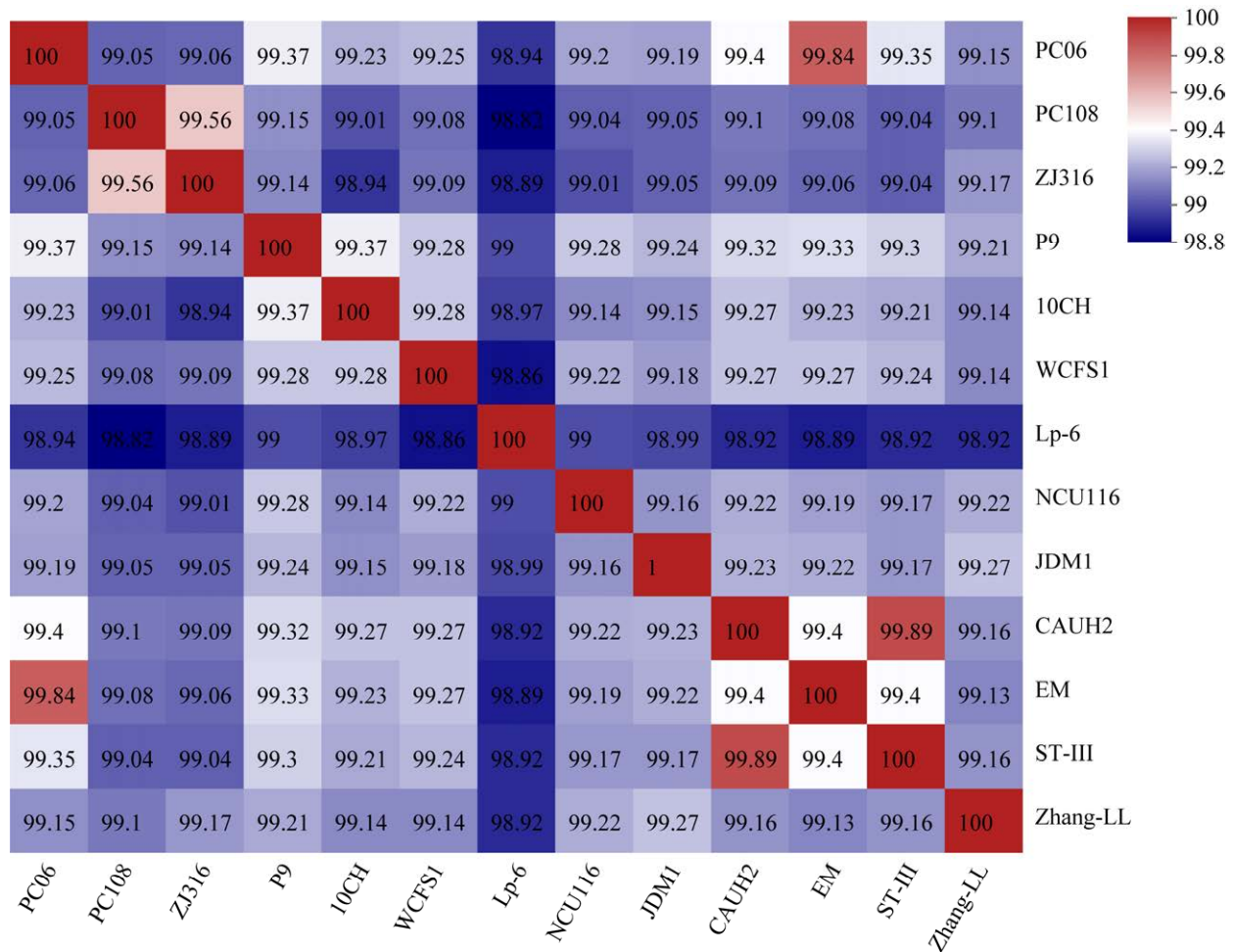


图3 14株植物乳杆菌的 ANI 分析结果

Figure 3 Results of ANI analysis of 14 strains of *Lactiplantibacillus plantarum*.

2.4 基因组功能注释与分析

2.4.1 COG 数据库注释

COG 数据库可将蛋白功能划分为 26 类, 每一类都是由直系同源序列构成。通过比对蛋白序列, 将其注释到某一 COG 分类中, 用以推测该序列的功能^[13]。 *L. plantarum* WCFS1 是目前研究最深入的植物乳杆菌之一, 有较高的参考价值, 同时其具有较强的胆盐耐受能力, 能在人体肠道存活和定殖^[14], 具有较高的益生潜力。因此, 以 *L. plantarum* WCFS1 作为参考菌株能一定程度上加深对 *L. plantarum* PC06 和

PC108 的了解。

L. plantarum PC06 和 PC108 在 COG 数据库中分别得到了 2 480 个和 2 508 个功能基因注释, 占 CDS 的 78.46% 和 78.45%。注释结果显示(表 4), *L. plantarum* PC06 碳水化合物转运和代谢(G) 相关基因得到了最多注释量, 达到 294 个; 而 *L. plantarum* PC108 转录(K) 得到的基因注释量最多, 有 262 个; 同时一般功能预测(R) 和氨基酸转运及代谢(E) 相关功能蛋白也得到了较高的基因注释量, 意味着这 2 株菌具有较强的利用碳水化合物和氨基酸的能力。除此之外, 这 2 株菌

还在细胞壁、生物膜和包膜生物发生中分别获得 172 个和 169 个基因注释量,可以辅证这 2 株菌可能具有较强的生物膜形成能力,并且防御机制的注释量分别为 73 个和 87 个,表明它们可能具有一定的抵抗外界环境潜力,但基因是否能表达需后续研究验证。

L. plantarum PC06 和 PC108 在碳水化合物转运和代谢(G)、氨基酸转运及代谢(E)和转录(K)上得到了和 *L. plantarum* WCFS1 相近的基因注释量,意味着可能在这些方面有着和

WCFS1 相似的能力。与 *L. plantarum* WCFS1 相比, *L. plantarum* PC06 和 PC108 关于前噬菌体和转座子(X)的功能蛋白得到了较多注释,这意味着 PC06 和 PC108 有获取外源基因片段的能力,而这能帮助细菌适应环境的变化或提高自身生存竞争力,从而占据优势生态位。

2.4.2 KEGG 数据库注释

KEGG 数据库整合了多方面的数据,可用于系统分析基因表达产物的功能及代谢途径^[15]。绘制的 KEGG 数据库注释结果见图 4, *L. plantarum*

表 4 三株植物乳杆菌 COG 分类详细统计表

Table 4 Detailed statistics of the COG classification of the three *Lactiplantibacillus plantarum* strains

COG code	COG annotation	PC06	PC108	WCFS1
A	RNA processing and modification	0	0	0
B	Chromatin structure and dynamics	0	0	0
C	Energy production and conversion	122	115	114
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	46	45	26
E	Amino acid transport and metabolism	223	227	267
F	Nucleotide transport and metabolism	114	114	87
G	Carbohydrate transport and metabolism	294	266	313
H	Coenzyme transport and metabolism	134	140	91
I	Lipid transport and metabolism	105	110	75
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	213	218	155
K	Transcription	268	268	305
L	Replication, recombination and repair	132	131	157
M	Cell wall/Membrane/Envelope biogenesis	172	169	156
N	Cell motility	21	16	11
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	105	105	62
P	Inorganic ion transport and metabolism	126	133	169
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	27	20	42
R	General function prediction only	226	225	421
S	Function unknown	128	124	224
T	Signal transduction mechanisms	134	131	100
U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	22	20	26
V	Defense mechanisms	73	87	60
W	Extracellular structures	4	4	0
X	Mobilome: prophages, transposons	78	117	0
Z	Cytoskeleton	3	3	0

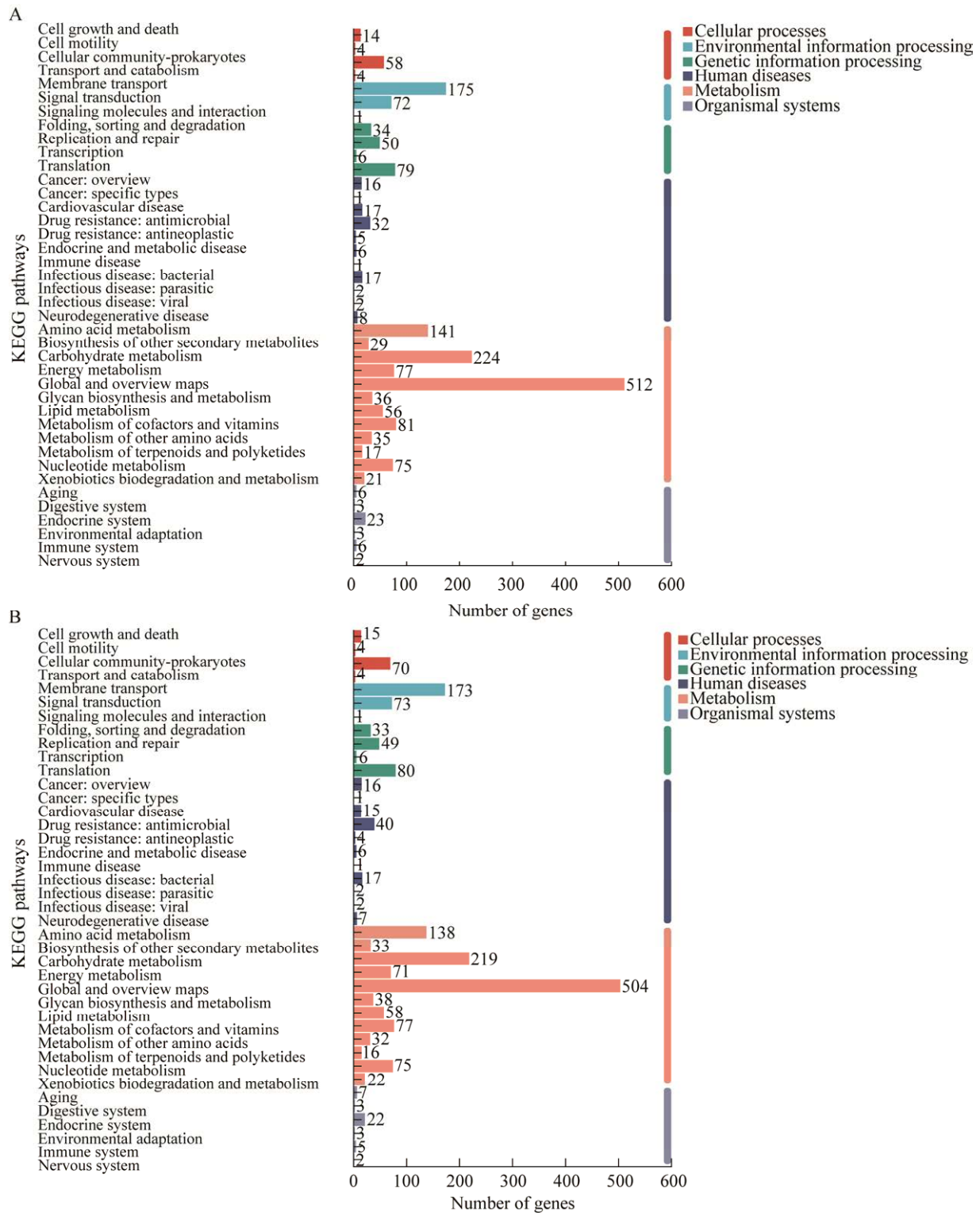


图 4 *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 与 PC108 KEGG 功能注释图

Figure 4 Annotated diagram of the KEGG function of *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 and PC108. A: *L. plantarum* PC06. B: *L. plantarum* PC108.

PC06 和 PC108 分别有 2 867 个和 2 822 个基因在 KEGG 数据库中得到功能注释。在 KEGG 注释中 PC06 和 PC108 有相似的表现, 大部分基因被注释到各个代谢通路, 主要分布于全局和概述图谱, 其次碳水化合物代谢以及氨基酸代谢, 碳水化合物代谢通路包括各种糖类的代谢通路。环境信息处理中得到最多注释的是膜运输, 主要集中于 ABC 转运蛋白、磷酸转移酶系统以及细菌分泌系统。值得一提的是, *L. plantarum* PC06 和 PC108 在人类疾病方面得到注释的基因较少, 主要是抗菌药物抗性。

2.4.3 CAZy 数据库注释

CAZy 是关于合成或分解复杂碳水化合物和糖复合物酶类的专业数据库^[16]。碳水化合物在很多生物学功能中具有重要地位, 通过研究碳水化

合物相关酶可以得到大量有意义的生物学信息。在 CAZy 注释结果中(图 5), *L. plantarum* PC06 和 PC108 在糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)上得到了最高的注释量, 分别为 43.27%和 44.76%, 其次是糖基转移酶(glycosyl transferases, GTS)。糖苷水解酶作用于含有 2 个及以上 1,4- α -D-葡萄糖基的多糖中的 1,4- α -D-葡萄糖苷键, 多糖水解过程释放大量能量, 进而支撑细菌的各种活动。糖基转移酶利用活化的供体形成糖苷键, 将糖转移到特定的受体如蛋白质、脂质或其他聚糖上, 形成新的聚合物从而参与各种生理过程^[17]。碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CEs)也得到了部分注释, 能催化各种碳水化合物底物的去酯化, 而辅助活性酶(auxiliary activity enzymes)包括一大类作用于碳水化合物的氧化还原活性酶^[18]。

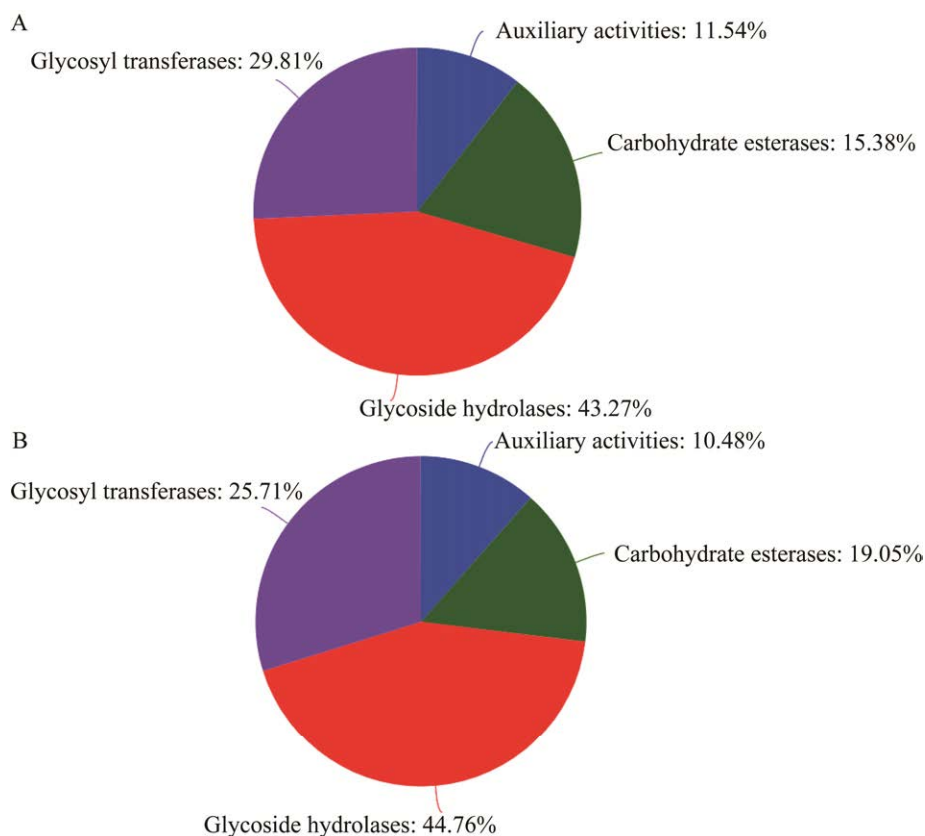


图 5 *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 与 PC108 CAZy 注释结果

Figure 5 Result of *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 and PC108 CAZy annotations. A: *L. plantarum* PC06. B: *L. plantarum* PC108.

2.4.4 VFDB 数据库注释

VFDB 是全面的一体化的病原菌毒力因子信息管理网络数据库。来源于微生物, 并对微生物自身侵染和引起特定宿主疾病具有促进作用的物质称为毒力因子, 主要包括细菌毒素、调节细菌黏附作用的细胞表面蛋白、对细菌本身具有保护作用的蛋白、细胞表面碳水化合物以及具有细菌致病性的水解酶等^[19]。

使用严格标准在 VFDB 数据库中比对后未发现毒力因子。使用一般标准时, *L. plantarum* PC06 和 PC108 分别得到 99 个和 97 个有明确分类的基因注释量(图 6), 其中主要涉及铁离子摄取系统、细菌黏附与定殖和抗吞噬。铁是绝大多数细菌生存所必需的营养物质, 2 株菌均在铁离子摄取系统中得到了大量的基因注释, 意味着 PC06 和 PC108 可能有着较强的铁离子吸收利用能力以提升其生存能力。*L. plantarum* PC06 和 PC108 在抗吞噬作用上也得到了较多的注释量, 抗吞噬的毒力因子能够帮助细菌对抗宿主免疫防御系统从而免于清除^[20]。同时与定殖相关的基因也得到了较多注释, 例如在 *L. plantarum* PC06 和 PC108 中找到了 3 种与黏附性有关的基因(VF0349、VF0327 和 VF0014), 而这些基因在细菌中广泛存在, 同源基因比对结果发现植物乳杆菌 WCFS1、NL42 等菌株均有以上基因^[14,21], 而这些基因使菌株拥有与其他细胞黏附或让细胞相互黏附的能力, 并非具有毒力效应。值得一提的是, 在 PC108 中存在 2 个 VF0014 基因, 位于不同的基因片段上, 这可能会导致 PC108 的自聚性强于 PC06, 与团队之前的研究结果相吻合^[22]。事实上这些基因在毒力因子数据库中被鉴定为毒力因子, 因为它们也参与敌对/宿主环境中的致病细菌适应、存活或附着。然而, 如果无其他发病机制, 这些基因可以被认为是对细菌有益的, 因为它们增加了细菌适应性, 并且在需

要细胞存活能力的情况下是可被接受的(例如增殖培养益生菌等)。

此外, 在这些基因中检测出了毒力因子溶血素 III (VFG038904) 和 β -溶血素(CVF171), 事实上该基因在几种商业益生菌中也有报道, 例如批准的公认安全(generally regarded as safe, GRAS) 益生菌菌株植物乳杆菌 299 V, 中国广泛使用的商业益生菌植物乳杆菌 JDM1, 泡菜益生菌植物乳杆菌 ST-III 等, 但团队前期研究证明 *L. plantarum* PC06 和 PC108 不具有溶血性^[22]。

2.4.5 CARD 数据库注释

CARD 广泛包含来自各种生物体、基因组、质粒的抗生素抗性相关的参考基因, 可用于指导环境、人体、动物菌群耐药组和抗生素抗性机制研究^[23]。

L. plantarum PC06 与 PC108 从 CARD 数据库中共计得到了 154 个和 156 个抗生素抗性基因注释。结果显示(图 7), *L. plantarum* PC06 与 PC108 对大环内酯类抗生素、四环素类抗生素和氟喹诺酮类抗生素具有较多的基因得到注释, 说明它们对这 3 种抗生素可能具有较高的抗性, 与

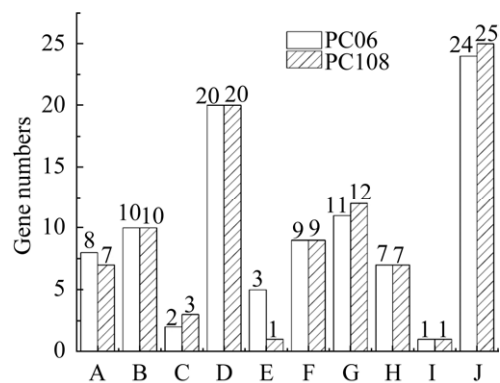


图 6 *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 与 PC108 VFDB 注释结果

Figure 6 Results of *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 and PC108 VFDB annotations. A–J: Secretion system, toxin, invasion, adherence, serum resistance, stress protein, antiphagocytosis, regulation, magnesium uptake system, iron uptake system.

团队之前的研究结果相同^[22]。

通过分析 *L. plantarum* PC06 与 PC108 耐药基因所在位置发现, 2 株菌的质粒上均存在少量耐药基因(表 5)。其中 PC06 存在 6 种不同的耐药基因, 分别分布在质粒 A、质粒 B 和质粒 C 上, 而 PC108 仅在质粒 B 和质粒 C 上存在 3 种耐药基因。从 ARO 描述来看, 2 株菌质粒上携带的耐药基因都是非植物乳杆菌特有的, 可能来

自环境中其他细菌。研究表明, 大多数益生菌对抗生素的耐药性是固有抗性, 是非转移性的, 但有质粒的益生菌会存在与结合质粒相关的耐药性发生转移的可能性^[24]。因此, 由于 *L. plantarum* PC06 与 PC108 的质粒上存在少量耐药基因, 理论上存在发生耐药基因转移的可能性, 但确切关于菌株耐药性是否有转移风险以及其可能性大小的讨论需进一步研究论证。

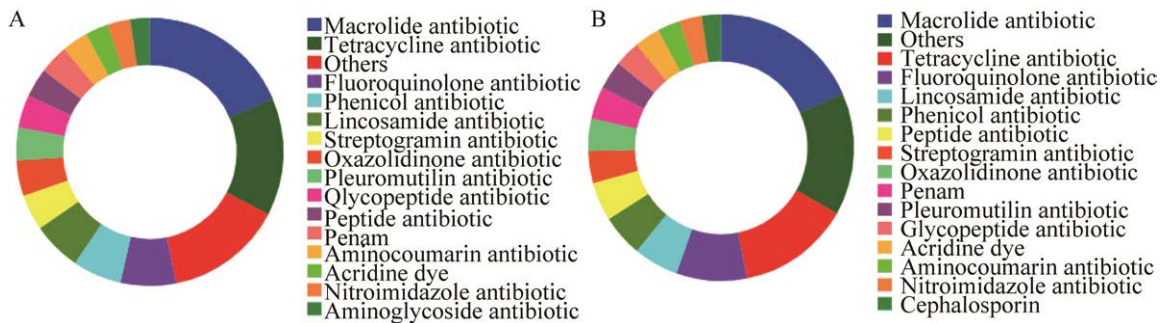


图 7 *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 与 PC108 CARD 注释结果

Figure 7 Results of *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 and PC108 CARD annotations. A: *L. plantarum* PC06. B: *L. plantarum* PC108.

表 5 *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 与 PC108 中位于质粒上的耐药基因统计

Table 5 Statistics of drug resistance genes located on plasmids in *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 and PC108

Name	Location	ARO name	ARO description	Drug class	Resistance mechanism
PC06	PlasmidA	vanHM	vanHM is a vanH variant in the vanM gene cluster	Glycopeptide antibiotic	Antibiotic target alteration
PC06	PlasmidA	mepR	MepR is an upstream repressor of MepA in <i>Staphylococcus aureus</i> . It is part of the mepRAB operon	Glycylcycline; Tetracycline antibiotic	Antibiotic efflux
PC06	PlasmidB	<i>Acinetobacter baumannii</i> AbaF	Expression of abaF in <i>E. coli</i> resulted in increased resistance to fosfomycin	Fosfomycin	Antibiotic efflux
PC06	PlasmidB	cmrA	cmrA is a transposon-encoded chloramphenicol exporter that is found in <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Phenicol antibiotic	Antibiotic efflux
PC06	PlasmidC	vanHM	vanHM is a vanH variant in the vanM gene cluster	Glycopeptide antibiotic	Antibiotic target alteration
PC06	PlasmidC	macB	MacB is an ATP-binding cassette (ABC) transporter that exports macrolides with 14- or 15-membered lactones. It forms an antibiotic efflux complex with MacA and TolC. macB corresponds to 1 locus in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 and 1 locus in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58	Macrolide antibiotic	Antibiotic efflux
PC108	PlasmidB	lfrA	lfrA is involved in the active efflux of quinolones and is found in <i>Mycobacteroides abscessus</i>	Fluoroquinolone antibiotic	antibiotic efflux
PC108	PlasmidB	<i>Acinetobacter baumannii</i> AbaF	Expression of abaF in <i>E. coli</i> resulted in increased resistance to fosfomycin	Fosfomycin	antibiotic efflux
PC108	PlasmidC	tetA(58)	TetA (58) is a tetracycline efflux pump described in <i>Paenibacillus</i> sp. LC231	Tetracycline antibiotic	antibiotic efflux

2.5 胆盐水解酶相关基因

能在肠道内生存是益生菌在人体内发挥作用的重要指标之一。益生菌在通过胃后会到达十二指肠,在那里将会遇到各种压力条件,包括结合胆汁盐的存在。胆汁盐不仅能分散和吸收脂肪,还能作为表面活性剂破坏细胞膜的完整性,同时还能产生自由基降低细胞内的 pH^[25],而胆汁盐能被胆盐水解酶(*Bsh*)解偶联并在结肠中重新吸收^[26]。

L. plantarum WCFS1 被证实有较好的胃肠道存活能力,有报道指出其在体外胃肠道存活模型中暴露 1 h 后,活细胞减少了 3 个数量级^[27]。研究表明 *L. plantarum* WCFS1 中有 4 个被注释为胆盐水解酶的基因(*Bsh1*、*Bsh2*、*Bsh3* 和 *Bsh4*)^[26],通过基因目的片段查找发现 *L. plantarum* PC06 与 PC108 同样存在这 4 个胆盐水解酶基因,并且通过 KEGG 数据库注释到 2 个通路类别(表 6)。说明这 2 株菌可能具有与 *L. plantarum* WCFS1 相似的胃肠道存活能力,同时有报道指出胆盐水解酶与胆固醇清除能力有关^[28],可通过减少肠道胆固醇重吸收来降低甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇,有助于控制心血管疾病患者的高胆固醇^[29],但这 2 株菌的胆固醇降解能力和对于心血管疾病的帮助需进一步验证。

2.6 两株植物乳杆菌在细菌素合成基因簇比较结果

为了适应环境和生存,植物乳杆菌会对其他共生或竞争的微生物作出反应,这种反应称为群体感应,取决于细胞密度的基因表达,这对细菌的存活有着重要意义。细菌素是一种由细菌核糖体合成的具有抗菌活性的多肽,其中,植物乳杆菌素是由植物乳杆菌产生的细菌素,相关抗菌蛋白由 *pln* 基因簇编码^[30]。

以 *L. plantarum* WCFS1 为例,其细菌素得到了充分的研究。该菌细菌素合成基因簇包含 5 个操纵子的 *pln* 基因座,*plnABCD* 编码称为细菌素 A (*plnA*),操纵子 *plnEFI* 和 *plnJKLR* 用它们各自的免疫蛋白编码细菌素 EF 和 JK,细菌素随后由操纵子 *plnGHSTUVWXY* 编码的 ABC 转运蛋白和辅助蛋白(*PlnGH*)转运和分泌^[31-32]。

与 *L. plantarum* WCFS1 相比, *L. plantarum* PC06 在 *plnJ* 和 *plnN* 之间插入了 1 个 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白(与 *L. plantarum* ZJ316 相似度为 95.83%),在 *plnJKLR* 操纵子中多了 1 个 IS3 家族转座酶和 1 个转座酶 *InsN*,这可能是其他基因片段的转座子带来的,而 COG 数据库中得到较多转座子相关注释也能进一步佐证,但这对细菌素 JK 合成是否有影响尚未可知,同时还发现了 1 个包含 67 个氨基酸的未知功能假设蛋白,

表 6 两株植物乳杆菌胆盐水解酶(*Bsh*)相关基因和 KEGG 注释

Table 6 Bile salt hydrolase (*Bsh*)-related genes and KEGG description of two *Lactiplantibacillus plantarum* strains

Strains	Gene	Identify (%)	EC	KEGG path description
PC06	<i>bsh1</i>	98.6	3.5.1.24	Secondary bile acid biosynthesis; Primary bile acid biosynthesis
PC06	<i>bsh2</i>	98.6	3.5.1.11	Penicillin and cephalosporin biosynthesis
PC06	<i>bsh3</i>	98.6	3.5.1.11	Penicillin and cephalosporin biosynthesis
PC06	<i>bsh4</i>	98.6	3.5.1.11	Penicillin and cephalosporin biosynthesis
PC108	<i>bsh1</i>	98.6	3.5.1.24	Secondary bile acid biosynthesis; Primary bile acid biosynthesis
PC108	<i>bsh2</i>	98.6	3.5.1.11	Penicillin and cephalosporin biosynthesis
PC108	<i>bsh3</i>	98.6	3.5.1.11	Penicillin and cephalosporin biosynthesis
PC108	<i>bsh4</i>	98.6	3.5.1.11	Penicillin and cephalosporin biosynthesis

其功能有待进一步研究。*L. plantarum* PC108 的细菌素合成簇则与 *L. plantarum* WCFS1 有较大不同, 操纵子 *plnJKLR* 是相对保守的操纵子, 但 PC108 缺失了 *plnJ* 和 *plnO* (糖基转移酶 GlyS) 的相关基因片段, 这可能会影响细菌素 JK 的合成。同时, PC108 的操纵子 *plnJKLR* 上多出了 1 个包含 61 个氨基酸的核心肽, 通过 UniRef90 比对发现这是 1 个具有双胍氨酸前导的 IIb 类细菌素 lactobin A。有研究报道指出 lactobin A 首次被发现是由 *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139 产生, 其抑菌谱较窄, 对 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. 最有效^[33]。除此之外, PC108 的编码蛋白 *plnG* 有一部分发生了氨基酸突变, 突变区域与正常 *plnG* 的相似度为 97.682%, 由其中基因编码蛋白功能可知, 此操纵子功能与细菌素的转运有关, 这可能会影响细菌素的转运功能(图 8)。

2.7 两株植物乳杆菌益生特性相关基因

L. plantarum PC06 和 PC108 的潜在益生特性在团队前期的研究中得到证实^[22], 同时在全基因组分析数据中得到了支持。本研究中检测与酸耐受性相关的基因 F0F1 ATP 合成酶与胆盐抗性相关的胆盐水解酶(BSH)的基因(表 7)。益生菌在工业化生产过程中可能会遭受高/低温胁迫, 暴露与高温环境中可诱导保守的热休克蛋白(HSPs)的表达, 例如 GroES、GroEL、GrpE、DnaK 和 DnaJ。在多种微生物中都发现了冷休克蛋白相关基因, 并且这些基因与细菌在低温下存活的适应过程相关^[34], 在 *L. plantarum* PC06 和 PC108 染色体上发现了 CSP 家族的冷休克蛋白基因。此外, *L. plantarum* PC06 和 PC108 全基因组中还检测出过氧化氢酶相关基因、硫基过氧化酶相关基因和谷胱甘肽过氧化酶相关基因, 这些酶可以防止氧化应激。

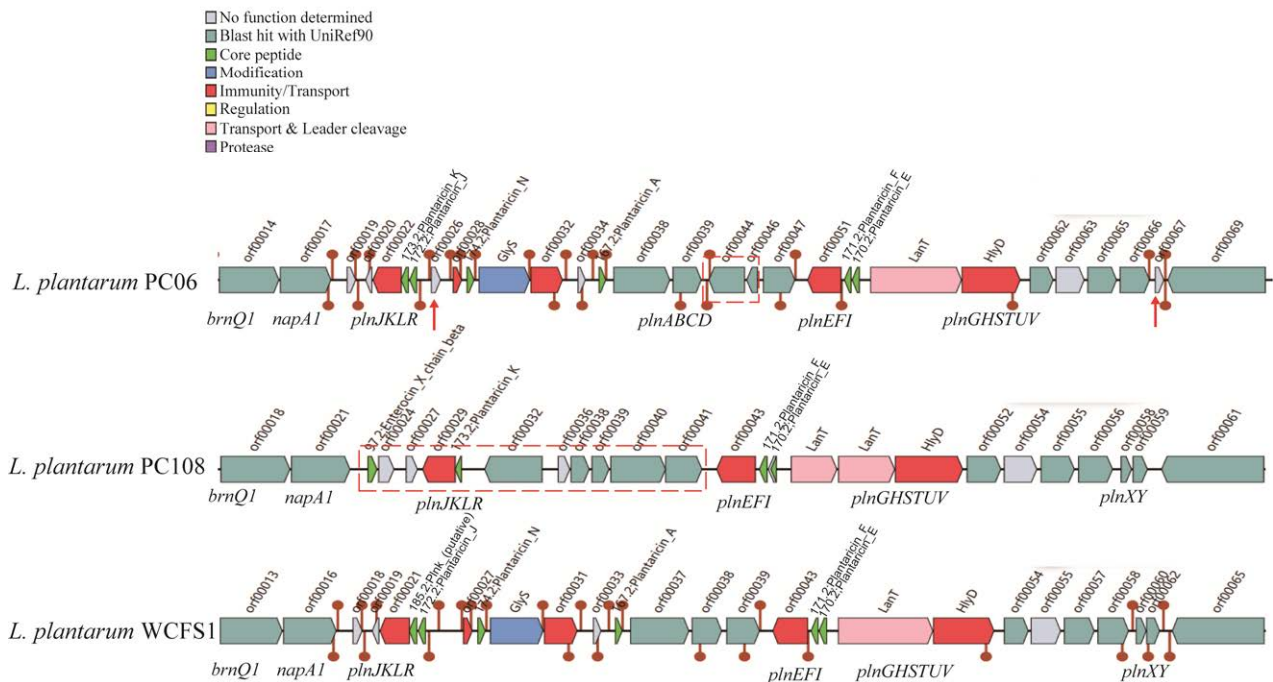


图 8 三株植物乳杆菌细菌素合成基因簇

Figure 8 Cluster of bacteriocin synthesis genes in three strains of *Lactobacillus plantarum*.

表 7 植物乳杆菌 PC06 和 PC108 重要的益生相关基因信息

Table 7 Important genes of probiotic-related in *Lactiplantibacillus plantarum* PC06 and PC108

Strains	Gene name	Product	EC	Stress response
PC06/PC108	AtpA	ATP synthase subunit alpha	7.1.2.2	Acid stress
PC06/PC108	AtpD	ATP synthase subunit delta	7.1.2.2	Acid stress
PC06/PC108	AtpC	ATP synthase epsilon chain	3.6.3.14	Acid stress
PC06/PC108	AtpG	ATP synthase gamma chain	3.6.3.14	Acid stress
PC06/PC108	AtpH	ATP synthase subunit delta	3.6.3.14	Acid stress
PC06/PC108	AtpB	ATP synthase subunit a	–	Acid stress
PC06/PC108	AtpF	ATP synthase subunit b	3.6.3.14	Acid stress
PC06/PC108	AtpE	ATP synthase subunit c	3.6.3.14	Acid stress
PC06/PC108	Bsh1	Choloylglycine hydrolase	3.5.1.24	Bile tolerance
PC06/PC108	Bsh2	Choloylglycine hydrolase	3.5.1.11	Bile tolerance
PC06/PC108	Bsh3	Choloylglycine hydrolase	3.5.1.11	Bile tolerance
PC06/PC108	Bsh4	Choloylglycine hydrolase	3.5.1.11	Bile tolerance
PC06/PC108	GroES	Heat shock protein 60 family co-chaperone	–	Temperature stress
PC06/PC108	GroEL	Heat shock protein 60 family chaperone	–	Temperature stress
PC06/PC108	DnaJ	Chaperone protein	–	Temperature stress
PC06/PC108	DnaK	Chaperone protein	–	Temperature stress
PC06/PC108	CSP	Cold shock protein of CSP family	–	Temperature stress
PC06/PC108	KatE	Catalase KatE	1.11.1.6	Oxidative stress
PC06/PC108	Gpx	Glutathione peroxidase	1.11.1.9	Oxidative stress
PC06/PC108	Tpx	Thiol peroxidase, Tpx-type	1.11.1.15	Oxidative stress
PC06	YfeX	DYP peroxidase	1.11.1.-	Oxidative stress
PC108	YfeX	Presumptive dye decolorization peroxidase (DyP)	1.11.1.-	Oxidative stress
PC06/PC108	ArsC	Arsenate reductase (thiorandoxin)	1.20.4.4	Oxidative stress
PC06/PC108	Trx	Thioredoxin family proteins	–	Oxidative stress

– indicates no EC number.

3 讨论与结论

四川泡菜是一个天然的微生物资源库,有大量有价值的微生物值得研究。本研究收集了四川多代泡菜母水样本,从中分离筛选出 13 株具有潜在益生特性的植物乳杆菌,其中包括 *L. plantarum* PC06 和 PC108。在前期筛选阶段发现这 2 株菌表现出了较好的耐酸耐胆盐、胃肠液耐受性和自聚集共聚集能力,并且具有较好的安全性^[22]。在此基础上对这 2 株菌进行的全基因组测序和基因组功能解析。通过系统发育树和 ANI

分析结果发现, *L. plantarum* PC06 和 PC108 基因组存在差异, ANI 为 99.08%, 在系统发育树中分支距离较远。

使用 CAZy、KEGG 和 COG 数据库注释结果表明, *L. plantarum* PC06 和 PC108 得到了相近的基因注释数量,并且 2 株菌在碳水化合物利用、氨基酸利用和糖基转移酶等功能上得到了大量的注释,这意味着其可能具有较强的碳水化合物利用能力,为菌株在各种环境中的生存能力提供了基础; VFDB 和 CARD 数据库比对结果表明,大部分得到注释的基因并非能够直接导致人

体致病的相关基因,其中仅有的2种与溶血性相关的基因也在前期研究中证实并未表达,而PC06与PC108的质粒上带有极少量的耐药基因,理论上存在转移的可能性,需后续研究严重。除此之外,*L. plantarum* PC06和PC108均携带了4个与胆盐水解酶(Bsh)相关的基因片段,比对相似度均为98.6%,这意味着这2株菌具有耐受胃肠液的潜力。另外,我们还发现这2株菌均有完整的细菌素合成基因簇,其中*L. plantarum* PC06与*L. plantarum* WCFS1的细菌素合成基因比较相似,而*L. plantarum* PC108的缺失了合成*plnJK*的部分基因片段,但有一个IIb类细菌素lactobin A的相关基因嵌入到了操作子*plnJKLR*中,这意味着*L. plantarum* PC108产生的细菌素可能与PC06和WCFS1有差异,具体功能有待进一步研究。最后,我们汇总了*L. plantarum* PC06和PC108中与各种胁迫相关的基因,为其在人体内发挥益生特性提供了基础。

综上所述,本研究通过分离筛选与全基因组测序得到了2株泡菜源植物乳杆菌的全基因组信息,并且通过与*L. plantarum* WCFS1的比较分析,发现了与胆盐水解酶和与具有抗菌活性的细菌素合成基因簇,说明这2株菌能够作为具有潜在益生特性的益生菌菌株,具体益生功能还需进行进一步研究,如转录组学和蛋白质组学研究,将使我们能够阐明所鉴定的基因在细菌存活、宿主定殖和抗菌活性等的生理学重要性。本研究从基因层面揭示了*L. plantarum* PC06和PC108的潜在益生机理,为今后筛选优良益生菌菌株和基因层面上益生特性评价提供遗传学基础。

参考文献

- [1] la FATA G, WEBER P. Probiotics and the gut immune system: indirect regulation[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(1): 11-21.
- [2] SIEZEN RJ, van HYLCKAMA VLIEG JET. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(Suppl 1): S3.
- [3] CHOI EA, CHANG HC. Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 62(1): 210-217.
- [4] WANG Y, SHANG N, QIN YX, ZHANG Y, ZHANG JL, LI PL. The complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LPL-1, a novel antibacterial probiotic producing class IIa bacteriocin[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 266: 84-88.
- [5] 刘超楠, 蔡熙姮, 张新宇, 刘晗璐. 植物乳杆菌基因组学研究进展[J]. *食品科技*, 2020, 45(11): 1-7. LIU CN, CAI XH, ZHANG XY, LIU HL. Progress in genomics of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(11): 1-7 (in Chinese).
- [6] EVANOVICH E, de SOUZA MENDONÇA MATTOS PJ, GUERREIRO JF. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum*: an overview[J]. *International Journal of Genomics*, 2019, 2019: 1-11.
- [7] KIM E, CHANG HC, KIM HY. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* EM, A putative probiotic strain with the cholesterol-lowering effect and antimicrobial activity[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(8): 1871-1882.
- [8] WICK RR, JUDD LM, GORRIE CL, HOLT KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. *PLoS Computational Biology*, 2017, 13(6): e1005595.
- [9] GRISSA I, VERGNAUD G, POURCEL C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(suppl_2): W52-W57.
- [10] BUCHFINK B, XIE C, HUSON DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(1): 59-60.
- [11] CHOKESAJJAWATEE N, SANTIYANONT P, CHANTARASAKHA K, KOCHARIN K, THAMMARONGTHAM C, LERTAMPAIPORN S, VORAPREEDA T, SRISUK T, WONGSURAWAT T, JENJAROENPUN P, NOOKAEW I, VISESSANGUAN W. Safety assessment of a nham

- starter culture *Lactobacillus plantarum* BCC9546 via whole-genome analysis[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 10241.
- [12] 宋宇琴. 德氏乳杆菌保加利亚亚种的群体遗传学和功能基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2018.
SONG YQ. Study on population genetics and functional genomics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [13] TATUSOV RL, GALPERIN MY, NATALE DA, KOONIN EV. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 33-36.
- [14] van den NIEUWBOER M, van HEMERT S, CLAASSEN E, de VOS WM. *Lactobacillus plantarum* WCFS₁ and its host interaction: a dozen years after the genome[J]. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(4): 452-465.
- [15] OGATA H, GOTO S, SATO K, FUJIBUCHI W, BONO H, KANEHISA M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(1): 29-34.
- [16] NGUYEN STC, FREUND HL, KASANJIAN J, BERLEMONT R. Function, distribution, and annotation of characterized cellulases, xylanases, and chitinases from CAZy[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(4): 1629-1637.
- [17] GILFIX BM. Congenital disorders of glycosylation and the challenge of rare diseases[J]. *Human Mutation*, 2019, 40(8): 1010-1012.
- [18] WARDMAN JF, BAINS RK, RAHFELD P, WITHERS SG. Carbohydrate-active enzymes (CAZymes) in the gut microbiome[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(9): 542-556.
- [19] CHEN LH, YANG J, YU J, YAO ZJ, SUN LL, SHEN Y, JIN Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(suppl_1): D325-D328.
- [20] 孙杰, 沈敏, 吴恬菲, 伦永志. 人肠源植物乳杆菌 PUM1785 全基因组测序分析与功能挖掘[J]. *微生物学杂志*, 2021, 41(5): 69-79.
SUN J, SHEN M, WU TF, LUN YZ. Whole genome sequencing analysis and function mining of *Lactobacillus plantarum* PUM1785 from human intestine[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 41(5): 69-79 (in Chinese).
- [21] ZHANG B, ZUO FL, YU R, ZENG Z, MA HQ, CHEN SW. Comparative genome-based identification of a cell wall-anchored protein from *Lactobacillus plantarum* increases adhesion of *Lactococcus lactis* to human epithelial cells[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14109.
- [22] 史梅莓, 伍亚龙, 杨恺, 吕鹏军, 汪冬冬, 唐焜, 王勇, 张其圣. 四川泡菜中潜在益生性植物乳杆菌的筛选及安全性评价[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(22): 165-172.
SHI MM, WU YL, YANG K, LÜ PJ, WANG DD, TANG Y, WANG Y, ZHANG QS. Screening and safety evaluation of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* in Sichuan Paocai[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(22): 165-172 (in Chinese).
- [23] ALCOCK BP, RAPHENYA AR, LAU TTY, TSANG KK, BOUCHARD M, EDALATMAND A, HUYNH W, NGUYEN AL V, CHENG AA, LIU SH, MIN SY, MIROSHNICHENKO A, TRAN HK, WERFALLI RE, NASIR JA, OLONI M, SPEICHER DJ, FLORESCU A, SINGH B, FALTYN M, et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D517-D525.
- [24] DEGIROLAMO C, RAINALDI S, BOVENGA F, MURZILLI S, MOSCHETTA A. Microbiota modification with probiotics induces hepatic bile acid synthesis via downregulation of the fxr-Fgf15 axis in mice[J]. *Cell Reports*, 2014, 7(1): 12-18.
- [25] BRON PA, MARCO M, HOFFER SM, van MULLEKOM E, de VOS WM, KLEEREBEZEM M. Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters *in vitro* and *in situ* in the gastrointestinal tract[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(23): 7829-7835.
- [26] LAMBERT JM, BONGERS RS, de VOS WM, KLEEREBEZEM M. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS₁[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4719-4726.
- [27] van BOKHORST-VAN de VEEN H, LEE IC, MARCO ML, WELS M, BRON PA, KLEEREBEZEM M.

- Modulation of *Lactobacillus plantarum* gastrointestinal robustness by fermentation conditions enables identification of bacterial robustness markers[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e39053.
- [28] KUMAR R, GROVER S, KAUSHIK JK, BATISH VK. IS30-related transposon mediated insertional inactivation of bile salt hydrolase (*bshI*) gene of *Lactobacillus plantarum* strain Lp20[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(7/8): 553-560.
- [29] COSTABILE A, BUTTARAZZI I, KOLIDA S, QUERCIA S, BALDINI J, SWANN JR, BRIGIDI P, GIBSON GR. An *in vivo* assessment of the cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0187964.
- [30] SÁENZ Y, ROJO-BEZARES B, NAVARRO L, DÍEZ L, SOMALO S, ZARAZAGA M, RUIZ-LARREA F, TORRES C. Genetic diversity of the *pln* locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 134(3): 176-183.
- [31] STURME MHJ, FRANCKE C, SIEZEN RJ, de VOS WM, KLEEREBEZEM M. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS₁[J]. *Microbiology* (Reading, England), 2007, 153(Pt 12): 3939-3947.
- [32] DIEP DB, STRAUME D, KJOS M, TORRES C, NES IF. An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*[J]. *Peptides*, 2009, 30(8): 1562-1574.
- [33] de VUYST L, AVONTS L, NEYSENS P, HOSTE B, VANCANNEYT M, SWINGS J, CALLEWAERT R. The lactobin A and amylovorin L471 encoding genes are identical, and their distribution seems to be restricted to the species *Lactobacillus amylovorus* that is of interest for cereal fermentations[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 90(1): 93-106.
- [34] KIM WS, KHUNAJAKR N, REN J, DUNN NW. Conservation of the major cold shock protein in lactic acid bacteria[J]. *Current Microbiology*, 1998, 37(5): 333-336.