DOI:10.12441/spyswjs.20230105002 [文章编号] 1673-1689(2024)12-0055-09

# 干酪乳酪杆菌 Zhang 连续传代过程中的遗传稳定性研究

郑新飞[1,2] 刘凯龙[1,2] 黄 天[1,2] 姚国强[1,2] 张和平[1,2*]

(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,内蒙古 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,内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:**【目的】评估干酪乳酪杆菌 Zhang(*Lactobacillus casei* Zhang,LCZ)在连续传代培养过程中的遗传稳定性。【方法】在 MRS 液体培养基中连续培养 LCZ 100 代,分别在第 0、25、50、75、100 代取样,分析其菌体形态、碳水化合物利用情况及基因组变化。【结果】LCZ 在第 0、25、50、75、100 代的菌体形态及碳水化合物利用情况无显著差异。基因组大小和 GC 占比在不同代数与原始基因组相比均无显著差异。SNP 突变分析显示,不同代数的 LCZ 基因组高度保守,突变频率较低。平均核苷酸一致性(ANI)和系统发育树结果表明,不同代数的 LCZ 与原始基因组亲缘关系接近。不同代数的菌株所注释到的碳水化合物活性酶(CAZymes)无显著差异,表明其碳水化合物利用能力一致。【结论】LCZ 在连续传代过程中表现出较高的遗传稳定性。

**关键词:**干酪乳酪杆菌 Zhang;基因组;连续传代;MRS 液体培养基;遗传稳定性

## Genetic Stability of *Lactobacillus casei* Zhang During Continuous Passaging

*ZHENG Xinfei*[1,2] *LIU Kailong*[1,2] *HUANG Tian*[1,2] *YAO Guoqiang*[1,2] *ZHANG Heping*[1,2*]

(1. Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** [**Objective**] This study aimed to evaluate the genetic stability of *Lactobacillus casei* Zhang (LCZ) during continuous passaging. [**Method**] LCZ was continuously cultured for 100 generations in MRS liquid medium, with samples collected at generations 0, 25, 50, 75, and 100. The morphology, carbohydrate utilization, and genomic changes of LCZ were analyzed. [**Result**] No significant differences were observed in the morphology and carbohydrate utilization of LCZ across generations 0, 25, 50, 75, and 100. The genome size and GC proportion showed no significant differences compared to the original genome. SNP mutation analysis indicated that the LCZ genome was highly conserved across generations, with a low mutation frequency. Average nucleotide identity (ANI) and phylogenetic tree analyses revealed that the LCZ strains from different generations were closely related to the original genome. No significant differences were found in the annotations of the carbohydrate-active enzyme (CAZymes) among different generations, suggesting consistent carbohydrate utilization ability. [**Conclusion**] LCZ exhibited high genetic stability during continuous passaging.

**Keywords:** *Lactobacillus casei* Zhang; genome; continuous passaging; MRS liquid medium; genetic stability

益生菌这一概念由联合国粮食及农业组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)在 2001 年提出,是指可对宿主健康产生益处的活性微生物[1]。益生菌进入人体后可维持体内动态平衡、促进消化、清除毒

**基金项目:**国家自然科学基金项目(32394053);内蒙古自治区科技重大专项(2021ZD0014)。

**通信作者:**张和平(1965—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事乳酸菌资源开发与利用研究。E-mail:hepingdd@vip.sina.com

**收稿日期:**2023-01-05 **修回日期:**2023-03-09

素、舒缓压力、增强免疫力[2-6]。目前，益生菌的研究和开发大多集中在乳杆菌属和双歧杆菌属这2个菌属[7]，主要来源于健康人体的肠道和传统发酵食品[8]，并广泛应用于食品和膳食补充剂中[9]。其中干酪乳酪杆菌因其优良的益生特性，在乳制品、发酵面制品、发酵豆乳等食品及保健品中广泛应用[10]。

益生菌经过体外筛选后，一般还需要通过动物试验和临床试验进行综合评价[11]。菌株在使用过程中会出现衰退的现象，如原有形态发生改变、营养物质利用能力下降、生长速度减慢、抗逆性能减弱等[12-13]，进而表现为生产过程中连续低产和批次间重复性差。因此，对益生菌的遗传稳定性进行研究，使其保持原始菌株的生物学特征，是实现菌株产业化应用的基础[14]。目前，遗传稳定性评价一般是基于多种生理生化检测并结合分子生物学技术进行的。在菌株稳定性的定量研究中，基因组重测序技术可以有效解释不同世系菌群潜在的生理和遗传变化[15]。

LCZ于2001年分离自内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗大草原的传统发酵酸马奶[16]。经生理生化特性和16S rDNA序列分析鉴定为*Lactobacillus casei*。随着分类学的发展，最新的分子技术鉴定表明LCZ属于*Lactobacillus paracasei*。该菌株已在中国普通微生物菌种保藏中心（CGMCC1679）保藏，因此本文沿用“*Lactobacillus casei* Zhang”的菌株名。经过前期对菌株的基础特性、益生特性、安全性及临床试验评价等研究，目前LCZ是国内研究最为深入且应用较为广泛的一个菌株。因此，作者拟对LCZ连续传代过程中的表型特征进行评价，并结合基因组分析其遗传稳定性，以确保LCZ具备优良的稳定性，为其进一步的研究及应用提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

LCZ由乳品生物技术与工程教育部重点实验室保藏并提供。

MRS培养基：蛋白胨10.00 g，牛肉浸粉8.00 g，酵母浸粉4.00 g，葡萄糖20.00 g，吐温-80 1.00 g，磷酸氢二钾2.00 g，三水醋酸钠5.00 g，柠檬酸三铵2.00 g，七水硫酸镁0.20 g，五水硫酸锰0.05 g，去离子水1 L。

核酸染料（GELVIEW、6×DNA缓冲液、DL2000 DNA Marker）、琼脂糖：宝生物工程（大连）有限公司；碳水化合物鉴定（API 50CHL）试剂盒：法国生物梅里埃公司。

### 1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机：Avanti JXN-26型，美国Beckman Coulter有限公司；医用超低温保存箱：DW-86L388（J）型，青岛海尔公司；生化培养箱：LRH-250型，上海一恒科学仪器有限公司；光学显微镜：BX53型，日本OLYMPUS公司；pH计：FE28型，梅特勒托利多仪器（上海）有限公司；电泳仪：DYY-C型，北京六一仪器厂；多功能酶标仪：SpectraMax M2型，美国Molecular Devices公司；超微量紫外分光光度计：NanoDrop One型，美国Thermo Fisher Scientific公司；洁净工作台：SW-CI-2FD型，苏州安泰空气技术有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 LCZ活化及生长曲线测定

将−80 ℃超低温保存箱中保藏的原始菌种解冻后，按照体积分数1%接种于MRS液体培养基中，并置于电热恒温培养箱中于37 ℃培养（24.0±0.2）h。每隔2 h取样1次，测定$OD_{600}$值及pH并绘制生长曲线。同时，分别对接种后的初始菌悬液和到达稳定期的菌悬液进行活菌计数。

#### 1.3.2 LCZ传代培养

将−80 ℃超低温保存箱中保藏的LCZ原始菌种在MRS液体培养基活化2代，划线接种于MRS固体培养基，置于37 ℃恒温培养箱中培养（72.0±0.2）h。挑取单个菌落的50%接种于15 mL MRS液体培养基的试管中，于37 ℃恒温培养箱培养（24.0±0.2）h，剩余50%的菌落用于镜检以确认菌体形态。然后按体积分数1%的接种量进行传代培养，将LCZ的第0、25、50、75、100代培养液分别标记为A0、A25、A50、A75和A100。

#### 1.3.3 LCZ传代培养过程中菌株代数的确定

LCZ通过二分裂的方式进行增殖，将生长曲线确定的稳定期时间作为传代培养时间。菌株代数按式（1）计算[17]。

$$n=\mathrm{lb}\ (N_t/N_0) \quad (1)$$

式中：

$n$——菌株代数；

$N_0$——接种后的初始活菌数，CFU/mL；

$N_t$——菌株达到稳定初期时的活菌数，CFU/mL。

#### 1.3.4 LCZ传代培养过程中菌体形态观察

在LCZ连续传代过程中，对不同代数的培养液进行革兰氏染色，并在光学显微镜下观察菌体形态，初步判定菌株纯度并留存镜检图片。

1.3.5 LCZ传代培养过程中碳水化合物利用情况

将LCZ第0、25、50、75、100代的培养液用无菌移液吸头分别滴入API 50CHL鉴定试剂条中，用无菌石蜡封口，然后置于37 ℃恒温培养箱中培养（48.0±0.2）h，培养结束后查看显色结果。49种碳水化合物信息见表1。

表1 API 50CHL乳杆菌鉴定碳水化合物一览表

Table 1 List of carbohydrates used by *Lactobacilli* that are identified by API 50CHL

| 编号 | 代码 | 碳水化合物 | 编号 | 代码 | 碳水化合物 |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | Control | 阴性对照 | 25 | ESC | 七叶灵-柠檬酸铁 |
| 1 | GLY | 丙三醇 | 26 | SAL | 水杨苷 |
| 2 | ERY | 赤藻糖醇 | 27 | CEL | *D*-纤维二糖 |
| 3 | DARA | *D*-阿拉伯糖 | 28 | MAL | *D*-麦芽糖 |
| 4 | LARA | *L*-阿拉伯糖 | 29 | LAC | *D*-乳糖 |
| 5 | RIB | *D*-核糖 | 30 | MEL | *D*-蜜二糖 |
| 6 | DXYL | *D*-木糖 | 31 | SAC | *D*-蔗糖 |
| 7 | LXYL | *L*-木糖 | 32 | TRE | *D*-海藻糖 |
| 8 | ADO | *D*-核糖醇 | 33 | INU | 菊粉 |
| 9 | MDX | 甲基-*β*-*D*-吡喃木糖苷 | 34 | MLZ | *D*-松三糖 |
| 10 | GAL | *D*-半乳糖 | 35 | RAF | *D*-棉子糖 |
| 11 | GLU | *D*-葡萄糖 | 36 | AMD | 淀粉 |
| 12 | FRU | *D*-果糖 | 37 | GLYG | 糖原 |
| 13 | MNE | *D*-甘露糖 | 38 | XLT | 木糖醇 |
| 14 | SBE | *L*-山梨糖 | 39 | GEN | *D*-龙胆二糖 |
| 15 | RHA | *L*-鼠李糖 | 40 | TUR | *D*-土伦糖 |
| 16 | DUL | 卫矛醇 | 41 | LYX | *D*-来苏糖 |
| 17 | INO | 肌醇 | 42 | TAG | *D*-塔格糖 |
| 18 | MAN | 甘露醇 | 43 | DFUC | *D*-岩藻糖 |
| 19 | SOB | 山梨醇 | 44 | LFUC | *L*-岩藻糖 |
| 20 | MDM | 甲基-*α*-*D*-吡喃甘露糖苷 | 45 | DARL | *D*-阿拉伯醇 |
| 21 | MDG | 甲基-*α*-*D*-吡喃葡萄糖苷 | 46 | LARL | *L*-阿拉伯醇 |
| 22 | NAG | N-乙酰葡萄糖胺 | 47 | GNT | 葡萄糖酸钾 |
| 23 | AMY | 苦杏仁苷 | 48 | 2KG | 2-酮基葡萄糖酸钾 |
| 24 | ARB | 熊果苷 | 49 | 5KG | 5-酮基葡萄糖酸钾 |

## 1.4 LCZ连续传代过程中的基因组分析

1.4.1 LCZ基因组DNA提取

不同代数的LCZ菌株的全基因组提取采用经典的STE法进行，使用Qubit荧光定量测定DNA质量浓度。用超微量紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测样本DNA的纯度和完整度，所有样本在满足测序要求后，使用Illumina Novaseq及Nanopore测序平台进行全基因组测序。

1.4.2 LCZ基因组的组装及环化

基于Nanopore三代测序得到的原始数据，通过NextDenovo软件进行组装[18]，组装后使用Circlator软件将二代数据进行环化[19]。通过Pilon软件用二代数据对三代数据进行校正[20-21]，最终获得不同代数的LCZ的全基因组序列。

1.4.3 ANI值的计算

参考Goris等[22]的方法对15株不同代数的LCZ菌株的基因组与原始基因组进行ANI值计算。使用Perl脚本比较各菌株的ANI值，并利用TBtools软件绘制ANI聚类热图[23]。

1.4.4 SNP位点分析

以LCZ的原始菌株序列作为参考基因组，用Mummer软件对菌株不同代数的SNP位点进行识别分析，并利用Soapsnp软件对SNP位点进行检测验证[24]。

1.4.5 构建系统发育树

以LCZ的原始序列作为参考基因组，基于不同代数LCZ的SNP序列，使用邻接法构建系统发育树[25]。

#### 1.4.6　CAZymes 注释及分析

使用 CAZymes 数据库对不同代数 LCZ 菌株的全基因组进行 CAZymes 功能基因的注释。然后借助 TBtools 软件对注释结果中潜在的 CAZymes 家族进行可视化分析，以便进一步探索这些功能基因在不同代数菌株中的分布和变化。

### 1.5　统计分析

数据统计分析使用 IBM SPSS 25.0 软件，显著性水平设为 $P<0.05$，采用平均值±标准差表示。图表绘制使用 Origin 2021 和 TBtools 等软件完成。

## 2　结果与讨论

### 2.1　LCZ 的生长曲线

LCZ 培养过程中的 $OD_{600}$ 值和 pH 结果见图 1。在 0~4 h 内 LCZ 处于适应期，其代谢系统需要适应新的环境，$OD_{600}$ 值呈缓慢上升趋势；4 h 后进入对数生长期，$OD_{600}$ 值明显上升，pH 值下降幅度增大；12 h 后，$OD_{600}$ 值增幅下降，曲线趋于平缓，说明 LCZ 的生长已经进入稳定期。这与白梅[26]和邵玉宇[27]对 LCZ 生长特性的研究结果基本一致。

### 2.2　LCZ 菌株连续培养周期的确定

微生物具有较快的繁殖速度和短暂的生长周期，其生长过程通常可分为 4 个阶段：适应期、对数期、稳定期和衰亡期。不同生长时期的细胞生理状态差异很大，对外界环境条件的反应也不同。处于对数期或稳定初期的微生物细胞酶系活跃、代谢旺盛、细胞群体的形态与生理特性一致、抗不良环境的能力强。因此，菌种传代和保藏宜使用处于对数生长末期或稳定初期的细胞[28]。根据 LCZ 在 MRS 液体培养基的生长曲线，对生长初期及对数末期的 LCZ 培养液进行活菌计数，以计算菌株的代数。在 LCZ 的生长初始，活菌数为（101.50±12.00）×$10^6$ CFU/mL，到达对数生长末期时活菌数增加至（109.50±9.09）×$10^8$ CFU/mL。根据 1.3.3 中菌株代数的计算方法，LCZ 到达对数期末期的菌株为 6.75 代。因此，若以培养 24 h 为传代周期，在此期间 LCZ 生长 6.75 代，连续传代 100 代大约需要 15 d。

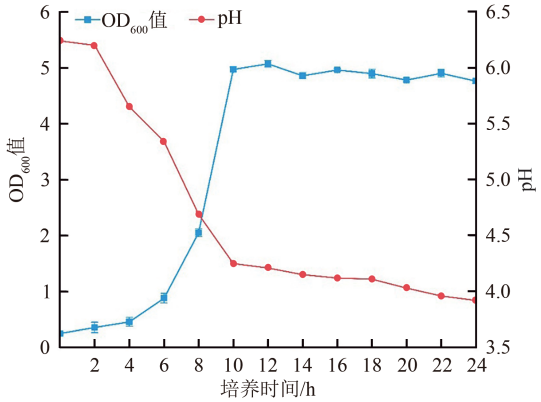



图 1　LCZ 原始菌株生长曲线和 pH

Fig. 1　Growth curve and pH of the original strain of LCZ

### 2.3　LCZ 在连续传代过程中的表型结果

#### 2.3.1　LCZ 连续传代过程中的菌体形态

对 LCZ 连续传代过程中不同代数的菌体进行革兰氏染色并观察菌体形态的变化，结果见图 2。在 LCZ 连续培养 100 代过程中，菌体形态始终保持该菌株的典型形态，基本呈现为不分离的短杆状，且不同代数的菌体形态和大小无明显差异。

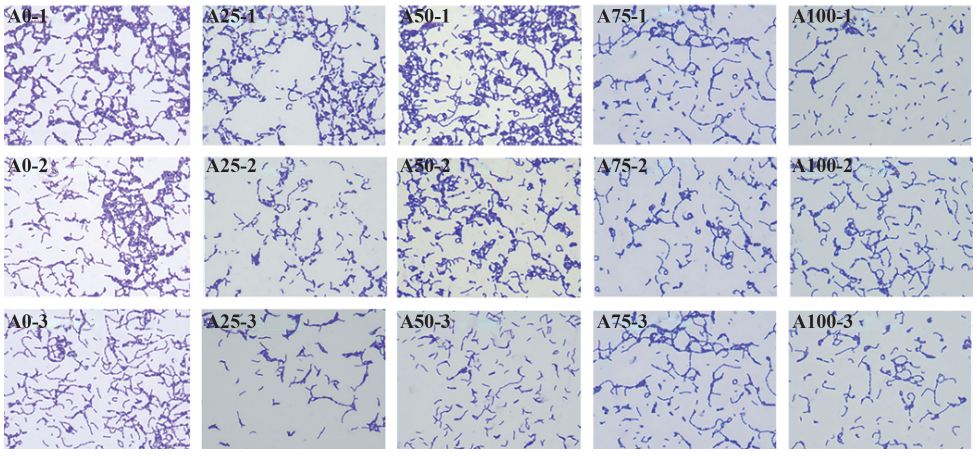



图 2　不同代数 LCZ 菌体形态（1 000×）

Fig. 2　Cell morphology of LCZ in different generations（1 000×）

2.3.2　菌株连续传代过程中的碳水化合物利用情况

由于菌株具有特有的酶系统，因此不同菌株对糖的分解代谢能力各不相同，根据这一特点，可以通过检测菌株对碳水化合物的代谢产物来鉴别菌株种属[29]。梅里埃碳水化合物鉴定试剂盒是一个由49种碳水化合物试验条组成的培养基，可用于检测菌株利用不同碳水化合物的能力。当菌株利用碳水化合物产生酸导致培养基pH下降时，指示剂会变色。显色反应结果构成了菌株的糖代谢能力图谱，并用于菌株鉴定或分型。LCZ可利用23种碳水化合物。且不同代数LCZ的碳水化合物利用情况无显著差异（$P$>0.05），见表2。

表2　不同代数LCZ的碳水化合物利用情况

Table 2　Utilization of carbohydrates by LCZ in different generations

| 编号 | 代码 | 碳水化合物 | A0 | A25 | A50 | A75 | A100 | 编号 | 代码 | 碳水化合物 | A0 | A25 | A50 | A75 | A100 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | Control | 阴性对照 | − | − | − | − | − | 25 | ESC | 七叶灵-柠檬酸铁 | + | + | + | + | + |
| 1 | GLY | 丙三醇 | − | − | − | − | − | 26 | SAL | 水杨苷 | + | + | + | + | + |
| 2 | ERY | 赤藻糖醇 | − | − | − | − | − | 27 | CEL | *D*-纤维二糖 | + | + | + | + | + |
| 3 | DARA | *D*-阿拉伯糖 | − | − | − | − | − | 28 | MAL | *D*-麦芽糖 | + | + | + | + | + |
| 4 | LARA | *L*-阿拉伯糖 | − | − | − | − | − | 29 | LAC | *D*-乳糖 | − | − | − | − | − |
| 5 | RIB | *D*-核糖 | + | + | + | + | + | 30 | MEL | *D*-蜜二糖 | − | − | − | − | − |
| 6 | DXYL | *D*-木糖 | − | − | − | − | − | 31 | SAC | *D*-蔗糖 | + | + | + | + | + |
| 7 | LXYL | *L*-木糖 | − | − | − | − | − | 32 | TRE | *D*-海藻糖 | + | + | + | + | + |
| 8 | ADO | *D*-核糖醇 | − | − | − | − | − | 33 | INU | 菊粉 | + | + | + | + | + |
| 9 | MDX | 甲基-*β*-*D*-吡喃木糖苷 | − | − | − | − | − | 34 | MLZ | *D*-松三糖 | + | + | + | + | + |
| 10 | GAL | *D*-半乳糖 | + | + | + | + | + | 35 | RAF | *D*-棉子糖 | − | − | − | − | − |
| 11 | GLU | *D*-葡萄糖 | + | + | + | + | + | 36 | AMD | 淀粉 | − | − | − | − | − |
| 12 | FRU | *D*-果糖 | + | + | + | + | + | 37 | GLYG | 糖原 | − | − | − | − | − |
| 13 | MNE | *D*-甘露糖 | + | + | + | + | + | 38 | XLT | 木糖醇 | − | − | − | − | − |
| 14 | SBE | *L*-山梨糖 | − | − | − | − | − | 39 | GEN | *D*-龙胆二糖 | + | + | + | + | + |
| 15 | RHA | *L*-鼠李糖 | − | − | − | − | − | 40 | TUR | *D*-土伦糖 | + | + | + | + | + |
| 16 | DUL | 卫矛醇 | + | + | + | + | + | 41 | LYX | *D*-来苏糖 | − | − | − | − | − |
| 17 | INO | 肌醇 | − | − | − | − | − | 42 | TAG | *D*-塔格糖 | + | + | + | + | + |
| 18 | MAN | 甘露醇 | + | + | + | + | + | 43 | DFUC | *D*-岩藻糖 | − | − | − | − | − |
| 19 | SOB | 山梨醇 | + | + | + | + | + | 44 | LFUC | *L*-岩藻糖 | − | − | − | − | − |
| 20 | MDM | 甲基-*α*-*D*-吡喃甘露糖苷 | − | − | − | − | − | 45 | DARL | *D*-阿拉伯醇 | − | − | − | − | − |
| 21 | MDG | 甲基-*α*-*D*-吡喃葡萄糖苷 | − | − | − | − | − | 46 | LARL | *L*-阿拉伯醇 | − | − | − | − | − |
| 22 | NAG | N-乙酰葡萄糖胺 | + | + | + | + | + | 47 | GNT | 葡萄糖酸钾 | + | + | + | + | + |
| 23 | AMY | 苦杏仁苷 | + | + | + | + | + | 48 | 2KG | 2-酮基葡萄糖酸钾 | − | − | − | − | − |
| 24 | ARB | 熊果苷 | + | + | + | + | + | 49 | 5KG | 5-酮基葡萄糖酸钾 | − | − | − | − | − |

注：“+”表示可利用；“−”表示不可利用。

2.4　LCZ连续传代培养过程中基因组分析

2.4.1　基因组信息

基于全基因组测序得到的原始数据，15株不同代数的LCZ菌株的基因组大小为2.9 Mb，GC占比为（46.40±0.01）%，且每株菌株均存在一个质粒，具体结果见表3。LCZ原始菌株的基因组大小为2.9 Mb，GC占比为46.40%。比较其基因组信息发现，传代过程中不同代数的15株菌与原始菌株基因组无显著差异（$P$>0.05）。

2.4.2　GTDB基因组数据库比对

将组装、校正后5个代数的LCZ序列与GTDB数据库[30]比对，结果显示该菌株属于副干酪乳酪杆菌（*Lacticaseibacillus paracasei*），并且在传代及测序过程中样本没有污染，可用于后续结果分析。

2.4.3　ANI值结果

ANI常用于细菌基因组的鉴定，通过比对基因组序列判断是否为同一种或者亚种，是鉴定

表 3　LCZ 基因组信息

Table 3　Genome information of LCZ

| 菌株 | 序列数 | 基因组大小/Mb | GC 占比/% |
|---|---|---|---|
| LCZ | 2 | 2.9 | 46.40 |
| A0-1 | 2 | 2.9 | 46.42 |
| A0-2 | 2 | 2.9 | 46.39 |
| A0-3 | 2 | 2.9 | 46.40 |
| A25-1 | 2 | 2.9 | 46.39 |
| A25-2 | 2 | 2.9 | 46.40 |
| A25-3 | 2 | 2.9 | 46.39 |
| A50-1 | 2 | 2.9 | 46.39 |
| A50-2 | 2 | 2.9 | 46.43 |
| A50-3 | 2 | 2.9 | 46.41 |
| A75-1 | 2 | 2.9 | 46.41 |
| A75-2 | 3 | 2.9 | 46.41 |
| A75-3 | 2 | 2.9 | 46.40 |
| A100-1 | 2 | 2.9 | 46.37 |
| A100-2 | 2 | 2.9 | 46.40 |
| A100-3 | 2 | 2.9 | 46.41 |

细菌基因组种内关系的黄金方法。当 ANI 值大于 95% 时，可判定为同一种或亚种[31-32]。作者计算了 LCZ 的 5 个代数菌株之间的 ANI 值，并与参考菌株进行了比较，使用 TBtools 软件对 ANI 值进行了可视化，结果见图 3。各代数菌株之间的相似度极高，所有 ANI 值均大于 99.88%，表明 LCZ 在传代过程中的所有菌株均属于同一物种。

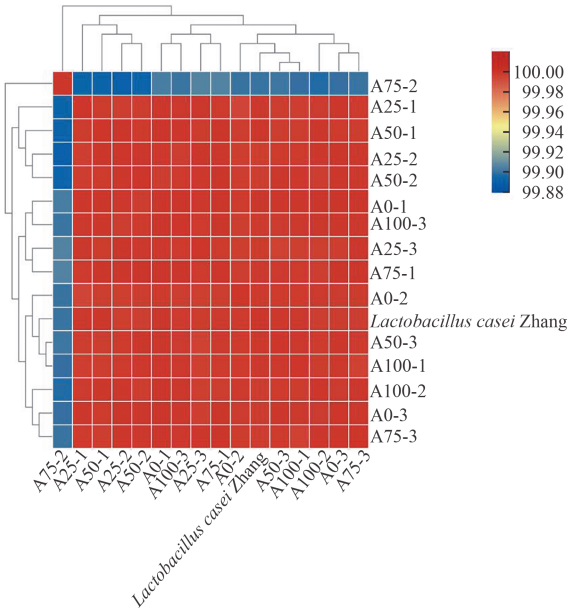



图 3　不同代数 LCZ 菌株间的 ANI 值

Fig. 3　ANI values of LCZ in different generations

### 2.4.4　SNP 分析结果

以 LCZ 原始基因组序列为参考，识别并分析传代过程中不同代数菌株的 SNP 变化。结果表明，在不同代数菌株中共鉴定到 37 个 SNP 位点。结合 GFF 注释文件，得到了与 SNP 突变相关的基因，见表 4。其中包括 4 个同义突变，1 个无义突变，32 个非同义突变。同义突变、非同义突变、无义突变均位于 *ISL3* 家族转座酶（*ISL3* family transposase）的基因上，同时，这些突变均未发生在与碳水化合物利用相关的基因上。

表 4　SNP 突变位点及其注释信息

Table 4　SNP mutation sites and their annotation information

| 起始位点 | 终止位点 | SNP 数量/个 | 基因编号 | 突变类型 |
|---|---|---|---|---|
| 1 505 100 | 1 506 344 | 1 | LCAZH_RS07810 | nonsense |
| 1 505 100 | 1 506 344 | 5 | LCAZH_RS07810 | nonsyn |
| 1 899 212 | 1 900 456 | 7 | LCAZH_RS09825 | nonsyn |
| 2 772 415 | 2 773 659 | 8 | LCAZH_RS14265 | nonsyn |
| 713 403 | 714 647 | 12 | LCAZH_RS03725 | nonsyn |
| 1 505 100 | 1 506 344 | 1 | LCAZH_RS07810 | syn |
| 1 899 212 | 1 900 456 | 2 | LCAZH_RS09825 | syn |
| 713 403 | 714 647 | 1 | LCAZH_RS03725 | syn |

注：syn 表示同义突变；nonsyn 表示非同义突变；nonsense 表示无义突变。

有研究表明 SNP 数量<21 时，可将其鉴定为同一物种[33]。结合二代和三代测序数据，对连续培养 100 代过程中的突变位点进行分析，结果显示 LCZ 不同代数的菌株突变位点均少于 21 个，表明这些菌株可以鉴定为同一物种。此外，5 个代数 LCZ 菌株的 SNP 位点呈随机分布。

从第0~25代、第26~50代、第51~75代、第76~100代的菌株中，均未发现能够稳定遗传的突变位点，如图4所示。因此，LCZ在MRS液体培养基的连续传代过程中表现出良好的遗传稳定性。

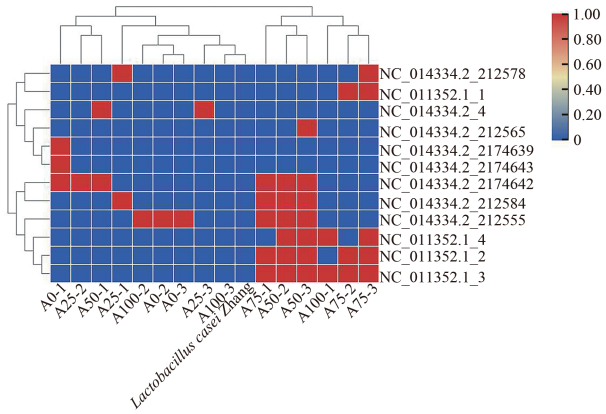



图4　LCZ原始菌株和不同代数的15株菌基因组的SNP热图

Fig. 4　Heatmap of SNPs in the genomes of the original strain of LCZ and 15 strains in different generations

### 2.4.5　系统发育树结果

系统发育树能够将同一群体内不同个体的遗传距离与进化关系可视化，是研究物种群体结构与进化的重要工具[34]。为进一步评估LCZ各代数菌株的遗传距离，基于不同代数LCZ的SNP序列，以LCZ原始基因组序列作为参考，采用邻接法构建了系统发育树，见图5。结果显示，15株不同代数的菌株分为2个主要分支，除A0-2菌株外，其余菌株与LCZ原始菌株均聚在同一分支，表明这些菌株的亲缘关系和遗传距离非常接近。

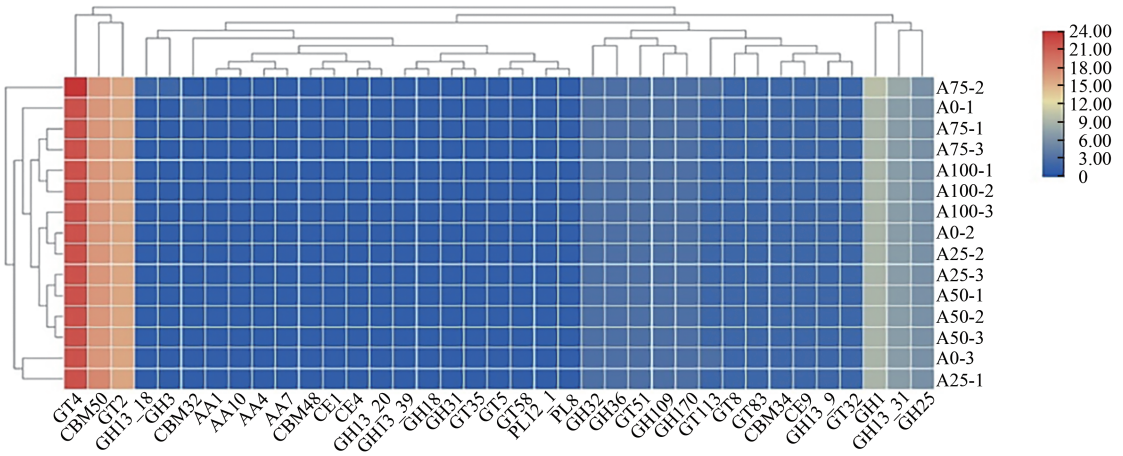
### 2.4.6　CAZymes注释结果

碳水化合物不仅为微生物合成细胞物质和代谢物质提供原料，还为其运动、生长和繁殖提供能量，是维持其生命活动的重要物质保障。为了在基因组水平上了解LCZ对碳水化合物的利用能力，使用CAZymes数据库[35]对LCZ的CAZymes功能基因进行分析，见图6。共注释到6大类碳水化合物活性酶的63个小类基因家族，其中糖苷转移酶类（GT）和糖苷水解酶类（GH）基因较为丰富。LCZ的不同代数菌株所注释到的CAZymes类别之间未表现出显著差异（$P$>0.05），这与其对碳水化合物利用




图5　基于SNP位点的系统发育树

Fig. 5　Phylogenetic tree based on SNP sites




GH—糖苷水解酶类；GT—糖苷转移酶类；CBM—碳水化合物结合模块；CE—糖酯酶类；PL—多糖裂解酶类；AA—辅助氧化还原酶类。

图6　碳水化合物活性酶基因注释热图

Fig. 6　Heatmap of annotated carbohydrate-active enzymes gene

的表型特征相符。上述结果表明，LCZ的不同代数菌株的遗传稳定性较好，在编码碳水化合物利用功能基因方面较为保守。

## 3 结论

通过对LCZ连续培养100代，并对第0、25、50、75、100代的菌株进行表型特征研究及基因组稳定性评估。结果表明，LCZ在连续培养过程中，各代数菌体形态无明显变化，不同代数的LCZ碳水化合物利用无显著变化。LCZ的15株不同代数菌株的基因组大小和GC占比与原始菌株差异不显著。系统发育树和ANI值的结果均表明这15株菌株与原始基因组之间具有较为接近的亲缘关系。通过识别SNP位点发现，在连续传代过程中SNP位点较少，且不存在影响碳水化合物利用等表型的基因突变。此外，不同代数菌株的CAZymes注释结果未显示出显著差异。因此，LCZ在MRS液体培养基中连续培养100代过程中具有良好的遗传稳定性。该研究旨在确保LCZ具备优良的稳定性，为其进一步研究及产业化提供理论依据。

## 参考文献


[1] GIBSON G R, HUTKINS R, SANDERS M E, et al. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2017, 14(8): 491-502.

[2] SAADAT Y R, KHOSROUSHAHI A Y, GARGARI B P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 217: 79-89.

[3] DUCROTTÉ P, SAWANT P, JAYANTHI V. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome[J]. World Journal of Gastroenterology, 2012, 18(30): 4012-4018.

[4] MAGRO D O, DE OLIVEIRA L M, BERNASCONI I, et al. Effect of yogurt containing polydextrose, *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* HN019: a randomized, double-blind, controlled study in chronic constipation[J]. Nutrition Journal, 2014, 13: 75.

[5] MATSUBARA V H, BANDARA H M, MAYER M P, et al. Probiotics as antifungals in mucosal candidiasis[J]. Clinical Infectious Diseases, 2016, 62(9): 1143-1153.

[6] DIB R, PERIYASAMY A G, BARROS J L, et al. Probiotics for the treatment of depression and anxiety: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Clinical Nutrition ESPEN, 2021, 45: 75-90.

[7] HILL C, GUARNER F, REID G, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2014, 11(8): 506-514.

[8] 李雅迪，柳陈坚，龚福明，等. 具有降胆固醇功能益生菌的筛选及其体外降胆固醇机制初探[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(2)：153-159.
LI Y D, LIU C J, GONG F M, et al. *In vitro* screening of probiotics with cholesterol-reducing potential abilities and study on its cholesterol-reducing mechanism[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(2): 153-159. (in Chinese)

[9] 马赛荣，王新明，崔艳，等. 益生菌产业的发展和趋势[J]. 生物产业技术，2019(3)：99-104.
MA S R, WANG X M, CUI Y, et al. Development and trends of the probiotics industry[J]. Biotechnology & Business, 2019(3): 99-104. (in Chinese)

[10] 迟珺曦，刘孝芳，雷文平，等. 干酪乳杆菌的益生特性及在食品中应用研究进展[J]. 农产品加工，2020(18)：70-74，83.
CHI J X, LIU X F, LEI W P, et al. Advances in probiotics and application of *Lactobacillus casei* in food[J]. Farm Products Processing, 2020(18): 70-74, 83. (in Chinese)

[11] 耿爽，肖红利，王斯佳. 食用益生菌体外功能筛选研究进展[J]. 食品科技，2020，45(5)：19-23.
GENG S, XIAO H L, WANG S J. Advances in functional screening of edible probiotics [J]. Food Science and Technology, 2020, 45(5): 19-23. (in Chinese)

[12] SAARELA M, VIRKAJÄRVI I, ALAKOMI H L, et al. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(12): 1477-1482.

[13] SANDERS M E, KLAENHAMMER T R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84(2): 319-331.

[14] 张文羿，白梅，张和平. 益生乳酸菌遗传稳定性研究进展[J]. 微生物学报，2014，54(4)：361-366.

ZHANG W Y，BAI M，ZHANG H P. Genetic stability of probiotic lactic acid bacteria：a review［J］. Acta Microbiologica Sinica，2014，54（4）：361-366.（in Chinese）

［15］Bentley D R. Whole-genome re-sequencing[J]. Current Opinion in Genetics & Development，2006，16（6）：545-552.

［16］张和平，武婷. 干酪乳酪杆菌Zhang的益生特性及其在发酵乳制品中的应用研究[J]. 中国食品学报，2022，22（5）：1-7.
ZHANG H P，WU T. Beneficial properties of *lacticaseibacillus casei* Zhang and its application in fermented dairy products［J］. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2022，22（5）：1-7.（in Chinese）

［17］BACHMANN H，STARRENBURG M J C，MOLENAAR D，et al. Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution[J]. Genome Research，2012，22（1）：115-124.

［18］HU J，FAN J P，SUN Z Y，et al. NextPolish：a fast and efficient genome polishing tool for long-read assembly[J]. Bioinformatics，2020，36（7）：2253-2255.

［19］HUNT M，SILVA N D，OTTO T D，et al. Circlator：automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads[J]. Genome Biology，2015，16：294.

［20］KUSCH S，LARROUY J，IBRAHIM H M M，et al. Transcriptional response to host chemical cues underpins the expansion of host range in a fungal plant pathogen lineage［J］. The ISME Journal，2022，16：138-148.

［21］MEINDERS R I，MENDOZA M，DICKEY A N，et al. Complete genome sequences of six lactobacilli isolated from American quarter horses［J］. Microbiology Resource Announcements，2020，9（47）：00997-20.

［22］GORIS J，KONSTANTINIDIS K T，KLAPPENBACH J A，et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities［J］. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，2007，57（1）：81-91.

［23］CHEN C J，CHEN H，ZHANG Y，et al. TBtools：an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant，2020，13（8）：1194-1202.

［24］YU X Q，SUN S Y. Comparing a few SNP calling algorithms using low-coverage sequencing data［J］. BMC Bioinformatics，2013，14：274.

［25］CRISCUOLO A，GASCUEL O. Fast NJ-like algorithms to deal with incomplete distance matrices［J］. BMC Bioinformatics，2008，9：166.

［26］白梅. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang长期连续传代过程中遗传稳定性研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学，2012.

［27］邵玉宇. 干酪乳杆菌和植物乳杆菌耐药分子机制的研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学，2015.

［28］PELEG M，CORRADINI M G. Microbial growth curves：what the models tell us and what they cannot[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2011，51（10）：917-945.

［29］何国庆，贾英民，丁立孝. 食品微生物学[M]. 北京：中国农业大学出版社，2021.

［30］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.

［31］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，2018，9：5114.

［32］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，2018.

［33］PIGHTLING A W，PETTENGILL J B，LUO Y，et al. Interpreting whole-genome sequence analyses of foodborne bacteria for regulatory applications and outbreak investigations［J］. Frontiers in Microbiology，2018，9：1482.

［34］李东宇，李伟程，康小红，等. 母乳源乳双歧杆菌Probio-M8的遗传特征及基因组差异比较分析[J]. 微生物学报，2022，62（7）：2768-2781.
LI D Y，LI W C，KANG X H，et al. Genetic characteristics and functional genes of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probio-M8 from breast milk[J]. Acta Microbiologica Sinica，2022，62（7）：2768-2781.（in Chinese）

［35］王帅，陈冠军，张怀强，等. 碳水化合物活性酶数据库（CAZy）及其研究趋势[J]. 生物加工过程，2014，12（1）：102-108.
WANG S，CHEN G J，ZHANG H Q，et al. Carbohydrate-active enzyme（CAZy）database and its new prospect[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering，2014，12（1）：102-108.（in Chinese）

（责任编辑：刘冬梅）