融合魏斯氏菌的基因组学及其安全性研究进展

刘佳琪, 张和平*

内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 农业部奶制品加工重点实验室, 内蒙古乳品生物技术与工程重点实验室, 呼和浩特 010018

* 联系人, E-mail: hepingdd@vip.sina.com

2020-12-30 收稿, 2021-03-01 修回, 2021-03-01 接受, 2021-03-02 网络版发表

现代农业(奶牛)产业技术体系(CARS-36)资助

摘要 融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*)是发酵工业中的重要乳酸菌菌种, 主要存在于新鲜果蔬和发酵制品中. *W. confusa*因其具有富产胞外多糖的特性, 常用于食品行业中以改善食品的性质. *W. confusa*还具有胆盐耐受性和抑菌效应, 可在动物和人的肠道中定植并发挥益生功能. 随着第一株*W. confusa*的全基因组测序完成, *W. confusa*的基因组研究正在兴起. 本文综述了*W. confusa*在分子水平上的分类特征和鉴定方法, 介绍了与*W. confusa*产胞外多糖、细菌素和氨基酸相关的功能基因. 此外, 本文通过已有的动物试验和体外毒理学实验, 结合其毒力基因和抗生素耐药基因, 描述了*W. confusa*目前的安全性评估现状. 最后, 对*W. confusa*在发酵工业中的应用及其作为潜在益生菌的前景作出展望, 以期为该菌株的应用奠定理论基础.

关键词 融合魏斯氏菌, 基因组学, 功能基因, 安全性

融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*)是一种发酵工业中常用的乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB), 革兰氏阳性, 过氧化氢酶阴性, 显微镜下呈短杆状或球状^[1]. *W. confusa*属于植物相关微生物, 主要存在于新鲜蔬菜、热带水果、初加工产品和发酵制品等生境中, 也能定植于人和动物的肠道, 常在人和动物的粪样中分离得到^[2]. 由于其富产胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)的特性, *W. confusa*已普遍应用于食品及医药领域中, 特别是对于改善产品的风味、质地和营养有着重要的作用^[3]. 广泛的应用范围赋予了*W. confusa*较高的经济价值.

研究发现, 鉴于*W. confusa*对人体的健康效应或可将其作为一种潜在的益生菌. 作为益生菌最重要的前提是可在肠道内的定植, 并且应克服胃部酸性条件和胆盐环境, 进而发挥调节肠道菌群平衡、激活宿主内源性微生物群或免疫活性等益生作用^[4]. 国内外研究

表明, *W. confusa*可在胆盐环境下存活, 抑制幽门螺杆菌等常见肠道病原体, 还具有体外抗氧化能力、较高的自聚集能力和较高的表面疏水性, 具备作为益生菌的潜力^[5,6].

然而, 国内外有报道因*W. confusa*引起人和动物感染的事件. 2003年, Flaherty等人^[7]报告了第一例由*W. confusa*引起的心内膜炎病例. 之后陆续发现*W. confusa*感染引起细菌血症的病例^[8]. Lee等人^[9]对10例*W. confusa*细菌血症患者进行分析, 发现了*W. confusa*的单菌致病性, 建议将*W. confusa*列入免疫缺陷宿主中引起细菌血症的生物名单. 另外在马和猴子中也发现感染*W. confusa*甚至致死的情况^[10]. 但是由*W. confusa*引起感染的报道极罕见, 且患者在感染*W. confusa*之前或有恶性肿瘤或进行过手术或接受全肠外营养等使免疫系统受到损害的因素, 分析其致病性可能与其宿主的免疫功能受到严重损害有关. *W. confusa*具有的致病性已经得

引用格式: 刘佳琪, 张和平. 融合魏斯氏菌的基因组学及其安全性研究进展. 科学通报, 2021, 66: 2920–2929

Liu J Q, Zhang H P. Advances in genomics and safety studies of *Weissella confusa* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 2920–2929, doi: [10.1360/TB-2020-1684](https://doi.org/10.1360/TB-2020-1684)

到证实, 其致病机理尚不清楚. 欧洲食品安全管理局 (European Food Safety Authority, EFSA) 暂未将其纳入安全资格认定 (qualified presumption of safety, QPS) 的列表中^[11].

随着测序技术的发展, 对 *W. confusa* 的研究开始深入到分子水平. 2015年, Amari 等人^[12] 使用 Roche 454GS FLX 高通量基因组测序系统完成了第一株融合魏斯氏

菌 *W. confusa* LBAE C39-2 的全基因组测序. 该菌株基因组由 2284024 bp 组成, 总 GC 含量为 45%, 预测到蛋白编码基因共 2156 个, 功能注释中有 1559 个基因功能经过验证, 占基因总数的 72%, 且大多数蛋白质编码基因与代谢性状有关. 随后, 越来越多的 *W. confusa* 菌的基因组得到测序, 截至目前共有 34 株 *W. confusa* 完成基因组测序(表1). 基因组大小在 1.44~2.38 Mb 之间, GC 含量在

表 1 已完成基因组测序的融合魏斯氏菌概况

Table 1 Profiles of the *Weissella confusa* from completed genome sequencing

Strain	Assembly	Level	Size(Mb)	GC(%)	CDS
VTT E-133279	GCA_004771075.1	Complete	2.22	45.08	1955
VTT E-90392	GCA_004771295.1	Complete	2.37	44.86	2161
N17	GCA_011044335.1	Complete	2.33	44.90	2147
DSM 20196	GCA_001436895.1	Scaffold	2.22	44.80	2033
VTT E-153460	GCA_004766265.1	Contig	2.18	45.00	1957
VTT E-143403	GCA_004766395.1	Contig	2.18	45.00	1954
UC4052	GCA_014694545.1	Contig	2.33	44.50	2124
EJ61	GCA_004766195.1	Contig	2.22	44.70	2026
CCUG 30969	GCA_004766185.1	Contig	2.31	44.80	2116
VTT E-072748	GCA_004766305.1	Contig	2.38	44.60	2181
CCUG 39518	GCA_004766095.1	Contig	2.28	44.70	2115
VTT E-90393	GCA_004766425.1	Contig	2.22	44.70	2043
FS54	GCA_014332815.1	Scaffold	2.29	44.70	1809
AF03-13	GCA_003466065.1	Scaffold	2.35	44.60	2185
MGYG-HGUT-00155	GCA_902363865.1	Scaffold	2.35	44.60	2186
CCUG 37938	GCA_004766085.1	Contig	2.27	44.70	2103
32	GCA_003284505.1	Contig	2.28	44.60	2112
F71	GCA_004766205.1	Contig	2.32	44.60	2145
CCUG 36556	GCA_004766105.1	Contig	2.20	44.70	2035
CCUG 51220	GCA_004766115.1	Contig	2.23	44.70	2086
AB3E41	GCA_900166935.1	Contig	2.26	44.90	2029
CCK931	GCA_014061025.1	Scaffold	2.28	44.70	2105
EJ52	GCA_004766325.1	Contig	2.26	44.70	2068
VTT E-153457	GCA_004766405.1	Contig	2.34	44.80	2135
CCUG 61560	GCA_004766335.1	Contig	2.27	44.70	2090
EJ12	GCA_004766215.1	Contig	2.27	44.70	2092
NBRC 106469	GCA_007991875.1	Contig	2.19	44.70	2032
MBF8-1	GCA_001884305.1	Contig	2.18	44.70	1889
VTT E-163496	GCA_004766225.1	Contig	2.32	44.60	2139
718955	GCA_009906195.1	Contig	2.24	44.90	2016
LBAE C39-2	GCA_000239955.2	Contig	2.28	44.80	2104
VTT E-95616	GCA_004766355.1	Contig	2.25	44.80	1962
VTT E-062653	GCA_004766315.1	Contig	2.21	44.90	1963
UBA11342	GCA_003512765.1	Scaffold	1.44	43.90	1093

43.90%~45.08%。从分子水平上对 *W. confusa* 进行研究有利于更深入地揭示其遗传信息和生理功能, 为 *W. confusa* 的应用提供遗传学基础。

1 *W. confusa* 的分类和鉴定

最初, *W. confusa* 被归为乳杆菌属(*Lactobacillus*)或明串珠菌属(*Leuconostoc*)。随着16S rRNA基因序列分析技术的发展, *W. confusa* 逐渐从 *Lactobacillus* 和 *Leuconostoc* 中分离出来^[13,14]。1993年, *Weissella* 属首次被定义^[15], 下分16个种, 其中研究较多的是食蜜魏氏菌(*Weissella cibaria*)^[9]。*W. confusa* 在表型和分类学上与 *W. cibaria* 高度相似, 如都具有耐酸耐胆盐, 耐受溶菌酶和苯酚的特性, 具有相似的抗氧化活性, 二者在作为发酵剂时产生胞外多糖的类型和产乳酸的水平高度一致^[16,17], 且 *W. confusa* 与 *W. cibaria* 常在相同分离源中得到, 分子聚类分析表明二者的近缘关系^[18]。Björkroth 等人^[19] 从发酵食品和临床样本中分离得到一组 *Weissella* 菌, 经16S rDNA序列分析, *W. confusa* 与 *W. cibaria* 的序列相似性高达99.0%。

基于 *W. confusa* 和 *W. cibaria* 生化特性的差异, 被二者可以初步鉴别, 如大多数 *W. confusa* 的半乳糖和木糖发酵为阳性, 阿拉伯糖发酵为阴性; *W. cibaria* 则相反。Lee 等人^[20] 通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)识别培养基平板上的细菌菌落, 可在几分钟内快速鉴定 *W. confusa*。但仅基于表型的鉴定方法缺乏可靠性, 如 Kulwichit 等人^[21] 用 API 50 CHL 无法鉴别出 *W. confusa* 和 *W. cibaria*。Lee 等人^[9] 利用商业自动鉴定系统 Phoenix 和 Vitek2 对10个 *W. confusa* 分离株进行鉴定, 其中有一半被 Phoenix 系统误认为肠系膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*), 而 Vitek2 系统无法识别到种的水平。目前 *W. confusa* 的相关研究较少, *W. confusa* 和 *W. cibaria* 的系统发育和表型高度相似, 在进行种间遗传进化分析时, 从分子水平上对二者进行准确的鉴定和鉴别至关重要。

1.1 系统发育标记

目前, 16S rRNA 基因序列分析仍然是最常用的细菌鉴定方法。但该方法的缺点是在物种水平上, 特别是在遗传关系密切的菌种之间, 其分辨率往往不足。在仅使用16S rRNA进行鉴定时, *W. confusa* 容易被错误识别为 *Lactobacillus* 和 *Leuconostoc*^[22]。现代微生物分类学多

采用系统发育标记方法作为16S rRNA的补充, 能更准确地阐明种间或种内的自然系统进化关系。系统发育标记(phylogenetic markers)是表示遗传关系的基因片段, 通常表现出明显的特异性, 反映生物个体或群体基因组遗传信息的差异。该方法快速、易于实现, 可用于细菌属内密切相关物种的鉴定和鉴别^[23]。

管家基因(housekeeping genes)是一类在所有生物细胞中均能表达的基因, 其编码蛋白多与维持生命活动密切相关。由于管家基因的序列保守性、基因组结构的特异性, 以及在环境中稳定表达等特点, 常被作为内参基因应用于生物的系统进化分析中^[24]。Nel 等人^[25] 从南非甘蔗加工厂分离并鉴定到202株 *Weissella* 菌, 分别将管家基因 *PheS*、*dnaA* 和 *atpA* 作为标记进行系统发育分析。结果显示, *atpA* 仅可将分离株区分为两个簇, 而 *PheS* 和 *dnaA* 明确地将其鉴别为147株 *W. cibaria* 和55株 *W. confusa*。其中, *PheS* 的鉴别能力最好, 自举值达100%。Lee 等人^[26] 根据 *Weissella* 物种的 *recN* 基因设计特异性引物, 鉴定到包括 *W. confusa* 和 *W. cibaria* 在内的4种 *Weissella* 菌种。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记可用于检测特定的AFLP片段, 实现针对物种的特异性鉴别。2010年, Fusco 等人^[27] 利用AFLP开发了第一个物种特异性PCR方法, 用于快速、明确地鉴定 *W. confusa*。研究人员从临床和食品样本中分离出119株乳酸菌进行AFLP分析, 最终鉴定出34株 *W. confusa*、10株 *W. cibaria* 和75株系统发育密切和远距离相关的物种, 结果具有100%的特异性。

1.2 特异性基因簇

细菌种间的比较基因组学是研究细菌分类进化的有力工具, 可鉴定不同物种具有的特异性基因, 较准确地反映物种基因组的差异性, 有助于物种间的鉴别从而获得物种进化关系的遗传学信息^[28]。Quattrini 等人^[11] 发现, 所有的 *W. cibaria* 菌株都能利用L-阿拉伯糖, 而 *W. confusa* 菌株则不能利用。通过对23株 *W. cibaria* 和7株 *W. confusa* 菌的基因组比较分析, 在 *W. cibaria* 基因组中发现一个分解L-阿拉伯糖的特异性基因簇, 包含3个编码L-阿拉伯糖分解代谢酶的基因: 核糖激酶、L-阿拉伯糖异构酶和L-磷酸4-二聚体酶。这些酶催化L-阿拉伯糖转化为磷酸戊糖途径的中间体D-木糖-5-磷酸, 而 *W. confusa* 菌不含这种基因。另外, 研究人员发现, 编码1,4-β-木聚糖酶的基因仅存在于 *W. confusa* 基因组中。

此特性可作为鉴别两种菌的依据。

随着越来越多*W. confusa*菌基因组完成测序,利用种内比较基因组学可深入揭示其菌株间的进化差异。Dey等人^[29]采用单株*W. confusa*与NCBI已有的19株*W. confusa*的基因组进行比较,利用最大似然法(maximum likelihood, ML)推断其进化历史,菌株间显示出较强的进化相关性。Bourdichon等人^[14]对46株*W. confusa*进行比较基因组分析发现,*W. confusa*具有较高的泛基因组和较低的核心基因组,菌株间存在较高的遗传多样性。此外,研究人员在*W. confusa* BCC2384和*W. confusa* LMG11983中分别发现了1个CRISPR,其中LMG11983含有4个CRISPR相关基因(Cas),包括Cas1、Cas2和两个Csn2拷贝。CRISPR-Cas的发现有利于根据不同目的对*W. confusa*中的特定基因进行编辑,并基于此系统开发出*W. confusa*特异性的鉴定方法^[30,31]。目前,*W. confusa*的比较基因组学还处于起步阶段,基于比较基因组学对*W. confusa*的遗传历史及特异基因的研究有待进一步展开。

2 *W. confusa*重要功能基因的研究进展

根据目前的研究结果,*W. confusa*具有高产葡聚糖、果聚糖、甘露聚糖等胞外多糖和氨基酸的能力,以及由产细菌素表现的出抑菌活性^[32]。微生物的基因组中含有多种编码代谢产物的功能基因,通过鉴定、筛选和调控菌种的功能基因,利用基因工程提高*W. confusa*代谢产物的产量是未来应用于发酵工业中的技术需求^[33]。

2.1 产胞外多糖

胞外多糖是一类由微生物合成并分泌到胞外的生物大分子聚合物^[34]。研究表明,*Weissella*属具有高水平的产生葡聚糖的能力,这可能与菌株中的蔗糖酶基因表达有关。*W. confusa*产生的葡聚糖是线性的,通常具有由连续 α -(1→6)连接的D-葡聚糖基单元组成的骨架,几乎没有 α -(1→3)连接的分支^[35]。在其他已被报道为胞外多糖生产者的乳酸菌菌株中,*Weissella*属很少受到关注。2008年,Malik等人^[36]利用DegFor和DegRev作为寡核苷酸引物筛选一组产生胞外多糖的LAB,发现在*W. cibaria*的基因组上含有葡聚糖酶(glucansucrase, gtf)基因,这为之后*Weissella*菌的蔗糖酶编码基因的研究提供了基础。Gtf属于糖苷水解酶70(GH70),具有用于催化蔗糖结合和分裂的中央GH70结构域及用于潜在的

葡聚糖结合的可变C端重复区,能够从蔗糖中合成各种 α -葡聚糖,如右旋糖酐、变聚糖和交替聚糖^[37]。

2009年,Malik等人^[38]首次报告了*W. confusa*菌中存在蔗糖酶基因。通过对从印度尼西亚地区的家庭自制发酵豆制品中分离出的两株*W. confusa*菌MBF 8-1和MBF 8-2进行测序分析,并利用DegFor等6种寡核苷酸引物,设计了编码已知细菌葡聚糖酶gtf和果聚糖酶(fructansucrases, ftf)基因催化结构域的靶向区域。以大肠杆菌作为宿主,将获得的gtf和ftf基因片段克隆到XL-TOPO克隆系统中,把菌株MBF 8-1中可能的gtf基因片段与其他LAB菌的基因片段进行比对,结果显示出较高的序列同源性,证明菌株MBF 8-1含有gtf基因。后采用同样的方法证明了菌株MBF8-2含有ftf基因。该研究可为*W. confusa*的gtf/ftf基因及其胞外多糖产物的表征提供参考。2020年,Falasconi等人^[39]从高梁面粉发酵产品中分离得到的*W. confusa*中发现了3个编码聚- β -1,6-N-乙酰-D-氨基葡萄糖合成酶的基因。据报道这是一种参与生物膜形成的表面多糖,可能与在*W. confusa*发现的较高的EPS产量有关。蔗糖的存在对gtf基因的表达具有诱导作用。Koirala等人^[40]发现,蔗糖可诱导*W. confusa* VTT-E90392中gtf基因的表达,且在发酵产糖过程中观测到明显的诱导上升曲线。

乳酸菌产生的EPS被认定为GRAS(generally recognized as safe)状态^[34]。*W. confusa*产生的EPS因其良好的黏度、增稠、稳定、胶凝和乳化性能,在食品工业中极具应用前景。Tinzl-Malang等人^[41]对小麦面包中3种*W. confusa*的EPS功能进行了评价,观察到EPS对面包质地的明显改善作用,如面包体积增加、碎屑凝固减少。冻融循环(freeze-thaw cycles, FTC)是冷冻面团工业中普遍的水分反复冷冻溶解的现象,会引起水分损失面筋结构破坏和水的流动性改变等不良影响。Tang等人^[42]在冷冻面团中加入*W. confusa* QS813生产的EPS后,有效地延缓了面筋的脱水和FTC诱导的水分再分配,保持了面筋的结构完整性,表明这种EPS适合作为面筋冷冻食品的冷冻保护剂。除其工艺性能外,由*W. confusa*产生的EPS已被证明是有效的免疫调节、免疫刺激、抗肿瘤、抗炎和抗氧化药物^[43]。研究还发现,EPS可增强益生菌在动物和人的胃肠道中定植,促进了它们作为益生菌的作用^[44]。

2.2 产生细菌素

细菌素(bacteriocins)是革兰氏阳性和阴性细菌均

可合成的一种抗菌肽,由G⁺菌产生的细菌素大多数来自乳酸菌,因此,LAB-细菌素常应用于食品生产中发挥抑菌作用,以延长食品保质期^[45].研究表明,*W. confusa*具有产生细菌素的能力.Malik等人^[46]从发酵豆制品中分离得到的*W. confusa* MBF 8-1中发现了第一个与产生细菌素有关的质粒,并将其命名为pWc MBF8-1.在其细菌素生物合成位点中检测到3个相关基因,共同参与编码3种抗菌肽,其中包括两个特异性编码细菌素转运复合物的基因^[47].*W. confusa* A3含有编码生成V族大肠杆菌素的基因,翻译后得到与*W. confusa* LBAEC39-2产生的V族大肠杆菌素完全相同的蛋白序列^[48].

*W. confusa*细菌素具有作为抑菌剂和杀精剂的潜力^[47].例如,Tenea和Lara^[49]发现,*W. confusa* Cys2-2菌株产生的细菌素对大肠杆菌(*E. coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)和志贺氏菌(*Shigella*)具有明显的抑制作用.*W. confusa*产生的细菌素与其他细菌素的作用机理相似,都是通过破坏靶细胞膜的完整性而发挥杀菌作用,从而导致细胞死亡^[48].然而,目前对*W. confusa*产细菌素的相关研究较少,与广泛研究的广谱细菌素Nisin相比,已被揭示的菌株抑菌谱较窄,还不能被广泛应用^[47].未来需要结合基因组学筛选更多抑菌谱广、细菌素产量大的*W. confusa*菌株.

2.3 产生氨基酸

*W. confusa*作为工业菌株,可用于生产多种氨基酸.Rakhimuzzaman等人^[50]发现,一株从番泻叶花中分离得到的*W. confusa* K-28在MRS培养基中产生高水平的鸟氨酸和瓜氨酸,且在添加精氨酸的条件下会明显增加鸟氨酸产量.经引物步行法发现,*W. confusa* K-28中存在精氨酸脱亚胺酶(ADI)基因簇.Bourdichon等人^[14]在来自食品及临床的42株*W. confusa*的基因组中均注释到精氨酸脱敏酶编码基因(*arcA*)和鸟氨酸卡莫酰转移酶(*arcB*)的拷贝.以上研究证实了*W. confusa*产生鸟氨酸和精氨酸是由ADI途径诱导的.尽管目前已有多株*W. confusa*被证实具有氨基酸产生能力,但相关编码基因仍有待进一步检测.

2.4 功能基因的异源表达

尽管微生物的功能基因可诱导其产生相应的天然物质以应用于工业生产,然而受到生产菌株本身生产性能的影响,这种生产途径往往存在生产周期长、生

产速率慢、产量低等问题,甚至有些功能基因在原始菌株中不表达.基因工程技术可将目的生物合成基因簇克隆至不同的异源宿主中进行表达,即功能基因的异源表达^[51].良好的异源表达的宿主应具有回收和纯化容易、不易受表达产物干扰等特点,常选用大肠埃希氏菌、枯草芽孢杆菌、乳酸乳球菌等作为异源宿主.Malik等人^[52]从印度尼西亚地区传统饮料中分离出*W. confusa* MBFCNC2-(1)菌株,首次报道了*W. confusa*的果糖酶(*ftf*)基因在枯草芽孢杆菌中的异源表达.利用PCR技术,从其基因组上获得2.5 kb的产果糖酶相关基因*ftfCNC-1(1)*片段,将其克隆到大肠杆菌载体PHY300pLK中,并在枯草芽孢杆菌中成功表达.Nisin诱导表达系统是在革兰氏阳性菌中应用最广泛的表达系统之一.Kajala等人^[53]鉴定和克隆了来自*W. confusa* VTTE-90392的右旋糖酶基因*WcE392-DSR*,以乳酸乳球菌NZ9800作为宿主,用Nisin诱导表达载体pN Z8037进行异源表达,发现由异源宿主*L. lactis*产生的葡聚糖与天然*W. confusa*产生的葡聚糖具有很高的光谱及结构相似性.Shukla等人^[54]通过PCR扩增了以酸菜为分离源的*W. confusa* Cab3中编码天然 α -葡聚糖酶*WcCab3-DSR*的基因,并将其克隆到Nisin诱导表达系统中,在乳酸乳球菌中表达和分泌重组 α -葡聚糖酶*WcCab3-rDSR*,纯化后测得其比活性由1.5 U/kg提高到6.1 U/kg.该研究对*W. confusa*的基因水平研究提供了新的思路,以揭示独特的功能基因信息,以及其产生胞外多糖的能力对细菌生物聚合物的进一步发展具有重要意义,对其在制药和食品工业中的未来应用具有重要意义.

质粒对基因异源表达过程至关重要,原始菌株的基因簇往往通过质粒转移到异源宿主中进行表达^[55].目前发现的>Weissella属的质粒大多数都属于*W. cibaria*,其他菌种中可能也存在.如前所述,研究人员在*W. confusa*中发现了第一个与细菌素有关的质粒pWc MBF 8-1^[46].序列分析显示,该质粒包括两个ORF编码质粒分配和动员蛋白,表明pWc MBF 8-1可转移到其他宿主.这个发现可为下一步探索将免疫基因引入细菌素敏感宿主进行异源表达提供基础依据.2016年,王海娟等人^[56]首次从湖南泡菜中分离得到的*W. confusa* QJ012菌株中鉴定到一个新质粒PQJ012.经序列注释和保守序列分析,将质粒PQJ012归为隐蔽质粒,复制方式为滚环复制,属于PT181家族.*W. confusa*中质粒的发现对该菌的遗传学研究和在分子水平上构建表达载体都具有重要意义.

3 *W. confusa*的安全性

益生菌的选择在具备功能性和加工特性的基础上必须符合安全性,所以对益生菌的风险评估至关重要。益生菌的安全性评估包括非致病菌、来源于健康人体肠道、具有一定的胆盐耐受能力,以及不携带可转移的抗生素耐受基因等标准^[57]。之前有临床报道*W. confusa*可感染人和动物,引起细菌血症等疾病。研究表明,*W. confusa*具有万古霉素、磷霉素和甲硝唑耐药性^[58]。目前*W. confusa*并未正式被认定为益生菌,美国临床和实验室标准研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)也没有提出这些物种的最小抑菌抗生素特异性断点(MIC-specific breakpoints)^[59]。由于*W. confusa*的致病性机理尚不明确,关于其安全性有待进一步研究。

3.1 动物试验

动物试验对评价微生物的安全性具有重要的临床意义。2019年,Rakhimuzzaman等人^[50]利用*W. confusa* K-28菌株对Wistar雄性大鼠(5周龄)进行了急性口服毒性试验,试验没有观察到明显的活性变化或与摄入*W. confusa* K-28有关的疾病或死亡。在组织学分析中,动物的任何器官都没有出现炎症症状和明显的差异。*W. confusa* DD_A7的无细胞上清液CFCS(cell-free culture supernatant)作为一种有效的抗菌剂,可拮抗大肠杆菌等多种病原菌^[60]。为了研究CFCS在宿主体内的毒性作用,Dey等人^[29]用CFCS对幼龄斑马鱼进行处理,与对照组相比,CFCS处理的幼龄斑马鱼组的发育形态和存活率并无显著变化。此外,幼龄斑马鱼经细菌毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理后,斑马鱼出现脊髓弯曲和存活率降低的现象,在CFCS治疗后恢复。由此验证了CFCS对宿主细胞的无毒作用,并支持其进一步用于提供健康福利。

3.2 致突变性试验

体外致突变试验可用于评价微生物对细胞引起的诱变性。研究人员使用Umulac AT测试试剂盒对*W. confusa* K-28培养液进行诱变性测试(Umu试验)^[50]。在试剂盒中,umu基因的诱导是由umuC-lacZ融合基因在血清伤寒沙门氏菌NM2009中的表达,计算DNA损伤作为评价标准。如果样品在背景上增强 β -半乳糖苷酶的活性超过两倍,则认为样品在给定浓度下表现出致突变

性。Umu试验表明,K-28菌株的培养液没有引起任何诱变。该研究证实了*W. confusa* K-28是一种安全可靠的细菌。

3.3 毒力基因

细菌的毒力基因,包括编码溶血素、胶原黏附素等。如已鉴定的溶血素基因在LAB中普遍存在。Quattrini等人^[11]对从发酵玉米麸皮中分离得到的7株*W. confusa*进行了比较基因组分析,搜索到3个可能编码溶血素样蛋白的基因,分别是hlyⅢ、hlyC和tlyA,以及一个编码纤维连接蛋白结合蛋白的基因。序列分析显示,*W. confusa*的hlyⅢ与致病菌李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)具有41%的同源性,而在*W. confusa*的TlyA和致病性微生物的TlyA之间没有发现同源性,hlyC编码的蛋白则表现出类似Co转运蛋白的特征。此研究表明一些黏附素的存在,被认为是致病微生物中的一种毒力因子,但其在益生菌与肠道黏膜的结合中起作用,或有利于益生菌在肠道中的定植。

3.4 抗生素耐药基因

在之前的研究中已证实,*W. confusa*对万古霉素、磷霉素和甲硝唑具有内在耐药性,但与之相关的耐药基因还未被检测到。Falasconi等人^[39]用肉汤微稀释法测定了3株从高粱中分离到的*W. confusa*对氨苄西林、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、新霉素、四环素、红霉素、克林霉素和氯霉素的敏感性,所得结果与欧洲食品安全管理局提出的截止值进行了比较。为了证实表型分析得到的药敏谱,采用PCR检测抗生素耐药基因。具体检测3个氨基糖苷类修饰酶基因:aph-Ⅲ、aac和ant。除卡那霉素外,所有菌株的MIC均低于规定的断点,MIC值为64 $\mu\text{g/mL}$,EFSA断点为32 $\mu\text{g/mL}$ 。然而,在这3个基因组中都没有检测到抗生素耐药决定因素。根据EFSA断点分析,这3株*W. confusa*是安全的。

4 总结与展望

*W. confusa*作为一种重要的发酵工业菌种,有着良好的商业价值。特别是其产生胞外多糖的功能显著,已广泛应用于食品及医药领域。*W. confusa*可耐受胆盐、耐酸,能定植于人和动物的肠道中发挥益生性能,表明*W. confusa*具有作为益生菌的潜力。但近年来国内外有关*W. confusa*对人造成感染导致细菌血症等疾病的临

床报道,而*W. confusa*的感染病例极为罕见,根据以往的研究推测,可能是由于宿主免疫系统遭到严重损害导致*W. confusa*对机体的侵染。

目前,对*W. confusa*的基因组学研究较少,随着高通量测序技术的发展,更多*W. confusa*的基因组序列得到测定,遗传学分析已逐渐从属水平深入到种的水平,未来的研究有待发现更精确的特异性标记基因,用于种间的鉴别和系统发育分析*W. confusa*菌株间的进化差异。在*W. confusa*未来功能基因组学的研究中,识别与其耐酸耐胆盐、产胞外多糖等相关的功能基因,以及应用基因工程技术对功能基因进行异源表达,

对实现*W. confusa*在发酵过程中的定向调控,筛选高效的优良菌株具有重要意义。*W. confusa*的致病原因尚不明确,已有研究表明,其具有万古霉素等抗生素耐药性,但相关耐药基因一直未被发现。国内外对*W. confusa*在食品工业中应用的相关规定尚缺失,未来需要对*W. confusa*进行更多的安全性评估,包括体内外毒性试验和从分子水平上检测其毒力因子。*W. confusa*基因组的研究成果将进一步揭示*W. confusa*的分子生物信息,提高其在工业应用中的发酵效率,评价其自身的安全性,以及将其作为潜在益生菌的前景奠定基础。

参考文献

- Jeong H S, Doo I K, Hye R K, et al. Severe infective endocarditis of native valves caused by *Weissella confusa* detected incidentally on echocardiography. *J Infect*, 2007, 54: e149–e151
- Harlan N P, Kempker R R, Parekh S M, et al. *Weissella confusa* bacteremia in a liver transplant patient with hepatic artery thrombosis. *Transpl Infect Dis*, 2011, 13: 290–293
- Katina K, Maina N H, Juvonen R, et al. *In situ* production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiol*, 2009, 26: 734–743
- Zhang J C, Guo Z, Sun Z H, et al. The effect of probiotics on intestinal flora—Take *Lactobacillus casei* Zhang study as an example (in Chinese). *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2011, 11: 58–68 [张家超, 郭壮, 孙志宏, 等. 益生菌对肠道菌群的影响——以*Lactobacillus casei* Zhang研究为例. 中国食品学报, 2011, 11: 58–68]
- Xiong L C, Ni X Q, Niu L L, et al. Isolation and identification of a giant panda source of prebiotic *Weissella confusa* from China (in Chinese). In: The Fifth Thirteenth National Symposium on Animal Microecology, Chinese Society of Animal Science and Veterinary Medicine, 2018. 154 [熊律晨, 倪学勤, 牛李莉, 等. 一株大熊猫源益生融合魏斯氏菌的分离与鉴定. 见: 中国畜牧兽医学会动物微生物生态学分会第五届第十三次全国学术研讨会, 2018. 154]
- Nam H, Ha M, Bae O, et al. Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 4642–4645
- Flaherty J D, Levett P N, Dewhirst F E, et al. Fatal case of endocarditis due to *Weissella confusa*. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 2237–2239
- Salimnia H, Alangaden G J, Bharadwaj R, et al. *Weissella confusa*: An unexpected cause of vancomycin-resistant gram-positive bacteremia in immunocompromised hosts. *Transplant Infect Dis*, 2011, 13: 294–298
- Lee M R, Huang Y T, Liao C H, et al. Bacteraemia caused by *Weissella confusa* at a university hospital in Taiwan, 1997–2007. *Clin Microbiol Infection*, 2011, 17: 1226–1231
- Lawhon S D, Lopez F R, Joswig A, et al. *Weissella confusa* septicemia in a foal. *J Vet Diagn Invest*, 2014, 26: 150–153
- Quattrini M, Korcari D, Ricci G, et al. A polyphasic approach to characterize *Weissella cibaria* and *Weissella confusa* strains. *J Appl Microbiol*, 2020, 128: 500–512
- Amari M, Laguerre S, Vuillemin M, et al. Genome sequence of *Weissella confusa* LBAE C39-2, isolated from a wheat sourdough. *J Bacteriol*, 2012, 194: 1608–1609
- Choi H J, Cheigh C I, Kim S B, et al. *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52: 507–511
- Bourdichon F, Patrone V, Fontana A, et al. Safety demonstration of a microbial species for use in the food chain: *Weissella confusa*. *Int J Food Microbiol*, 2021, 339: 109028
- Collins M D, Samelis J, Metaxopoulos J, et al. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: Description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J Appl Bacteriol*, 1993, 75: 595–603
- Rizzello C G, Coda R, Wang Y, et al. Characterization of indigenous *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc kimchii*, *Weissella cibaria* and *Weissella confusa* for faba bean bioprocessing. *Int J Food Microbiol*, 2019, 302: 24–34
- Lakra A K, Domdi L, Hanjon G, et al. Some probiotic potential of *Weissella confusa* MD1 and *Weissella cibaria* MD2 isolated from fermented

- batter. *LWT*, 2020, 125: 109261
- 18 Säde E, Lassila E, Björkroth J. Lactic acid bacteria in dried vegetables and spices. *Food Microbiol*, 2016, 53: 110–114
 - 19 Björkroth K J, Schillinger U, Geisen R, et al. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52: 141–148
 - 20 Lee W, Cho S M, Kim M, et al. *Weissella confusa* bacteremia in an immune-competent patient with underlying intramural hematomas of the aorta. *Ann Lab Med*, 2013, 33: 459–462
 - 21 Kulwichit W, Nilgate S, Chatsuan T, et al. Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: A comparison of API systems and conventional phenotypic assays. *BMC Infect Dis*, 2007, 7: 69
 - 22 Lee M R, Tsai C J, Teng S H, et al. Identification of *Weissella* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1246
 - 23 Tian X N, Liu G H, Liu B, et al. Application of phylogenetic marker genes in classification and identification of *Bacillus* (in Chinese). *Wuyi Sci J*, 2011, 27: 43–49 [田潇娜, 刘国红, 刘波, 等. 系统发育标记基因在芽孢杆菌分类鉴定中的应用. 武夷科学, 2011, 27: 43–49]
 - 24 Wei K, Ma L. Development of home-holding gene definitions in the era of high-throughput sequencing (in Chinese). *Hereditas*, 2017, 39: 127–134 [魏凯, 马磊. 高通量测序时代下持家基因定义的发展. 遗传, 2017, 39: 127–134]
 - 25 Nel S, Davis S B, Endo A, et al. Phylogenetic analyses of *pheS*, *dnaA* and *atpA* genes for identification of *Weissella confusa* and *Weissella cibaria* isolated from a South African sugarcane processing factory. *Curr Microbiol*, 2019, 76: 1138–1146
 - 26 Lee M, Cho K H, Han E S, et al. Development and application of PCR-based *Weissella* species detection method with *recN* gene targeted species-specific primers. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 2011, 39: 70–76
 - 27 Fusco V, Quero G M, Stea G, et al. Novel PCR-based identification of *Weissella confusa* using an AFLP-derived marker. *Int J Food Microbiol*, 2011, 145: 437–443
 - 28 Chen P, Yan Z, Li H Y. Advances in genomics of *thiobacillus ferrooxidans* (in Chinese). *Prog Microbiol Immunol*, 2017, 45: 83–88 [陈朋, 晏政, 李红玉. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌基因组学研究进展. 微生物学免疫学进展, 2017, 45: 83–88]
 - 29 Dey D K, Koo B G, Sharma C, et al. Characterization of *Weissella confusa* DD_A7 isolated from kimchi. *LWT*, 2019, 111: 663–672
 - 30 Knott G J, Doudna J A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 2018, 361: 866–869
 - 31 Li Y, Li S, Wang J, et al. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. *Trends Biotechnol*, 2019, 37: 730–743
 - 32 Lakra A K, Domdi L, Tilwani Y M, et al. Physicochemical and functional characterization of mannan exopolysaccharide from *Weissella confusa* MD1 with bioactivities. *Int J Biol Macromol*, 2020, 143: 797–805
 - 33 Wu Q Q, Sun M, Chen Y, et al. Strategies and advances in functional genomics of *Aspergillus oryzae* (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2019, 35: 186–192 [吴琴琴, 孙敏, 陈雨, 等. 米曲霉功能基因组研究策略和进展. 生物技术通报, 2019, 35: 186–192]
 - 34 Kavitate D, Devi P B, Singh S P, et al. Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food. *Int J Biol Macromol*, 2016, 86: 681–689
 - 35 Devi P B, Kavitate D, Shetty P H. Physico-chemical characterization of galactan exopolysaccharide produced by *Weissella confusa* KR780676. *Int J Biol Macromol*, 2016, 93: 822–828
 - 36 Malik A, Ariestanti D M, Nurfachtiyani A, et al. Glucosyltransferase gene screening in exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. *Sciences*, 2008, 12: 1–6
 - 37 Zeng L, Burne R A. Comprehensive mutational analysis of sucrose-metabolizing pathways in *Streptococcus mutans* reveals novel roles for the sucrose phosphotransferase system permease. *J Bacteriol*, 2013, 195: 833–843
 - 38 Malik A, Radji M, Kralj S, et al. Screening of lactic acid bacteria from Indonesia reveals glucansucrase and fructansucrase genes in two different *Weissella confusa* strains from soya. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 300: 131–138
 - 39 Falasconi I, Fontana A, Patrone V, et al. Genome-assisted characterization of *Lactobacillus fermentum*, *Weissella cibaria*, and *Weissella confusa* strains isolated from sorghum as starters for sourdough fermentation. *Microorganisms*, 2020, 8: 1388–1403
 - 40 Koirala P, Maina N H, Nihtilä H, et al. Brewers' spent grain as substrate for dextran biosynthesis by *Leuconostoc pseudomesenteroides* DSM20193 and *Weissella confusa* A16. *Microb Cell Fact*, 2021, 20: 23
 - 41 Tinzl-Malang S K, Rast P, Grattepanche F, et al. Exopolysaccharides from co-cultures of *Weissella confusa* 11GU-1 and *Propionibacterium freudenreichii* JS15 act synergistically on wheat dough and bread texture. *Int J Food Microbiol*, 2015, 214: 91–101
 - 42 Tang X, Zhang B, Huang W, et al. Hydration, water distribution and microstructure of gluten during freeze thaw process: Role of a high molecular weight dextran produced by *Weissella confusa* QS813. *Food Hydrocolloids*, 2019, 90: 377–384
 - 43 Jin H, Jeong Y, Yoo S H, et al. Isolation and characterization of high exopolysaccharide-producing *Weissella confusa* VP30 from young children's feces. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 110–120
 - 44 Siwames N, Suwanna N, Duangkamon S, et al. Characterization and rheological behavior of dextran from *Weissella confusa* R003. *Int J Polym Sci*, 2018, 10: 1–10

- 45 Belguesmia Y, Hazime N, Kempf I, et al. New bacteriocins from *Lactocaseibacillus paracasei* CNCM I-5369 adsorbed on alginate nanoparticles are very active against *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 8654
- 46 Malik A, Sumayyah S, Yeh C W, et al. Identification and sequence analysis of pWcMBF8-1, a bacteriocin-encoding plasmid from the lactic acid bacterium *Weissella confusa*. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363: 279–285
- 47 Sartono G, Rizqiyah I, Asmarinah I, et al. Three bacteriocin peptides from a lactic acid bacterium *Weissella confusa* MBF8-1 with spermicidal activity. *Curr Pharm Biotechnol*, 2019, 20: 766–771
- 48 Goh H F, Philip K. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Weissella confusa* A3 of dairy origin. *PLoS One*, 2015, 10: e0140434
- 49 Tenea G N, Lara M I. Antimicrobial compounds produced by *Weissella confusa* Cys2-2 strain inhibit gram-negative bacteria growth. *CyTA-J Food*, 2019, 17: 105–111
- 50 Rakhimuzzaman M, Noda M, Danshiitsoodol N, et al. Development of a system of high ornithine and citrulline production by a plant-derived lactic acid bacterium, *Weissella confusa* K-28. *Biol Pharmaceutical Bull*, 2019, 42: 1581–1589
- 51 Du D X. Advances in heterologous expression of microbial secondary metabolites biosynthetic gene clusters (in Chinese). *Chin J Antibiot*, 2012, 37: 568–574, 598 [杜东霞. 微生物次级代谢产物生物合成基因簇异源表达研究进展. 中国抗生素杂志, 2012, 37: 568–574, 598]
- 52 Malik A, Hapsari M T, Ohtsu I, et al. Cloning and heterologous expression of the *ftfCNC-2(1)* gene from *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) as an extracellular active fructansucrase in *Bacillus subtilis*. *J Biosci Bioeng*, 2015, 119: 515–520
- 53 Kajala I, Shi Q, Nyysölä A, et al. Cloning and characterization of a *Weissella confusa* dextranase and its application in high fibre baking. *PLoS One*, 2015, 10: e0116418
- 54 Shukla S, Verma A K, Kajala I, et al. Structure modeling and functional analysis of recombinant dextranase from *Weissella confusa* Cab3 expressed in *Lactococcus lactis*. *Prep Biochem Biotechnol*, 2016, 46: 822–832
- 55 He A L, Li W G, Liang C C. Construction, identification and expression of the recombinant plasmid pGEX-PopB derived from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* (in Chinese). *Int J Lab Med*, 2020, 41: 2709–2712 [何爱琳, 李文桂, 梁诚诚. 铜绿假单胞菌重组质粒pGEX-PopB的构建、鉴定及其在大肠埃希菌中的表达效率. 国际检验医学杂志, 2020, 41: 2709–2712]
- 56 Wang H J, Dai Y K, Su S S, et al. Complete DNA sequence analysis of a cryptic plasmid isolated from *Weissella confusa* (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2016, 32: 217–221 [王海娟, 戴雨珂, 苏森森, 等. 一个融合魏斯氏菌隐蔽质粒的序列分析. 生物技术通报, 2016, 32: 217–221]
- 57 Chen X. Safety evaluation, physiological function efficacy and whole genome sequence of potential probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 (in Chinese). Doctor Dissertation. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010 [陈霞. 具有益生功能的*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9的安全性评估、生理功效及其全基因组学研究. 博士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010]
- 58 Krishnan M, Dey D K, Sharma C, et al. Antibacterial activity of *Weissella confusa* by disc diffusion method. *Bangladesh J Pharmacol*, 2019, 14: 117–122
- 59 Olano A, Chua J, Schroeder S, et al. *Weissella confusa* (basonym: *Lactobacillus confusus*) bacteremia: A case report. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 1604–1607
- 60 Sturino J M. Literature-based safety assessment of an agriculture- and animal-associated microorganism: *Weissella confusa*. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2018, 95: 142–152

Summary for “融合魏斯氏菌的基因组学及其安全性研究进展”

Advances in genomics and safety studies of *Weissella confusa*

Jiaqi Liu & Heping Zhang^{*}

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

^{*} Corresponding author, E-mail: hepingdd@vip.sina.com

Weissella confusa is an important species of lactic acid bacteria in the fermentation industry, primarily presents in fresh fruits, vegetables and fermented products. Nowadays, *W. confusa* is often used to improve the textural properties of food products in the food industry because it is rich in extracellular polysaccharides. *W. confusa* is resistant to bile salts and exhibits bacteriostatic effects; in addition, it can colonise the intestines of animals and humans, thereby fulfilling probiotic functions. However, previous studies have reported that *W. confusa* is possibly pathogenic on animals and humans, although case reports are rare. It also showed resistance to some antibiotics, especially vancomycin. The safety of this strain is still unclear and it is not included in the list of QPS (Qualified Presumption of Safety) by the EFSA (European Food Safety Authority) for the time being. With the completion of the first whole-genome sequence of *W. confusa*, LBAE C39-2, genome research on this species is emerging. Presently, complete genome sequences are available for 34 *W. confusa*. The genome sizes are between 1.44 and 2.38 Mb and the GC contents are between 43.90% and 45.08%. In this review, we first summarise the taxonomic profile and identification methods of *W. confusa* at the genomic level, emphasising its high similarity to *W. cibaria* at the phenotypic and phylogenetic levels. The identification methods include housekeeping genes, amplified fragment length polymorphism (AFTP) and specific gene clusters. Then, the important functional genes of the *W. confusa* genome are introduced, such as *gtf* genes and *fif* genes, which have a close relationship to the characteristics of extracellular polysaccharides. Subsequently, heterologous expression of functional genes has also been shown through several previous studies, and bacterial plasmids play a crucial role in this process. Furthermore, some functional genes associated with the production of bacteriocin and amino acids were also found in *W. confusa*. We describe the current status of safety assessment for *W. confusa*, animal tests and in vitro toxicological experiments with further analysis of virulence and antibiotic resistance genes, which confirmed that some strains of *W. confusa* are nontoxic. Finally, this review summarises the current research on the genomics of *W. confusa*. More attention must be paid to identify more accurate specific marker genes for interspecific identification and phylogenetic analysis of evolutionary differences among *W. confusa* strains. In the future, genetic engineering technology, such as heterologous gene expression, should be used to improve the fermentation efficiency of *W. confusa* in industrial applications. On the basis of current studies on the safety of *W. confusa*, corresponding MIC-specific breakpoints of this species need to be designated. Further research should be established to identify additional virulence factors and resistance genes to lay a theoretical foundation for the application of *W. confusa*.

***Weissalla confusa*, genomics, functional gene, safety**

doi: [10.1360/TB-2020-1684](https://doi.org/10.1360/TB-2020-1684)