

赵芳, 黄璐, 宦海琳, 等. 植物乳植杆菌 YZH81 胞外多糖基因簇的功能鉴定 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 118–126. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020075

ZHAO Fang, HUANG Lu, HUAN Hailin, et al. Identification of A Novel Capsular Polysaccharide Cluster in *Lactiplantibacillus plantarum* YZH81[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 118–126. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020075

· 生物工程 ·

植物乳植杆菌 YZH81 胞外多糖基因簇 的功能鉴定

赵芳¹, 黄璐², 宦海琳³, 黄淑婷¹, 张文君¹, 梁晴晴⁴, 杨瑶^{1,*}

(1. 南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏南京 210023;

2. 浙江商业职业技术学院旅游烹饪学院, 浙江杭州 310053;

3. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏南京 210014;

4. 徐州湘然农牧发展有限公司, 江苏徐州 221622)

摘要: 为了研究植物乳植杆菌胞外多糖 (EPS) 的合成机制, 本文选取一株具有较高 EPS 产量的植物乳植杆菌 YZH81 开展其 EPS 合成基因簇 (*cps*) 的研究。经全基因组测序、比对和分析, 结果确定了 YZH81 菌株基因组含有两个 *cps* 基因簇, 其中一个 *cps* 基因簇 (*cps1*) 的结构与功能尚未鉴定, 而另一个 *cps* 基因簇 (*cps2*) 与其他已报道的植物乳植杆菌同源性很高。本研究实验敲除了 *cps1* 基因簇, 与野生型 YZH81 菌株相比, YZH81Δ*cps1* 菌株的 EPS 产量降低了 52.28%, 自聚集能力加速, 粘附性降低, 且清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical, DPPH·) 能力下降了 32.42%。该结果说明 YZH81 菌株的 *cps1* 基因簇与 EPS 合成相关, 也为进一步研究该菌株 EPS 生物合成机制建立有利条件。

关键词: 植物乳植杆菌, 胞外多糖 (EPS), 荚膜多糖簇 (*cps* cluster), 粘附性, 益生菌

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)23-0118-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020075



本文网刊:

Identification of A Novel Capsular Polysaccharide Cluster in *Lactiplantibacillus plantarum* YZH81

ZHAO Fang¹, HUANG Lu², HUAN Hailin³, HUANG Shuting¹, ZHANG Wenjun¹,

LIANG Qingqing⁴, YANG Yao^{1,*}

(1. School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China;

2. School of Tourism & Culinary Arts, Zhejiang Business College, Hangzhou 310053, China;

3. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China;

4. Xuzhou Xiangran Agriculture and Animal Husbandry Development Co., Ltd., Xuzhou 221622, China)

Abstract: In order to investigate the mechanism of extracellular polysaccharide (EPS) synthesis in *Lactobacillus plantarum*, a strain of *Lactobacillus plantarum* YZH81 with high EPS production was selected for the study of extracellular polysaccharide synthesis gene cluster (*cps*). After whole-genome sequencing, alignment and analysis, it was determined that the genome of YZH81 contained two *cps* gene clusters, one of which (*cps1*) had yet to be identified in terms of structure and function, while the other (*cps2*) was highly homologous to other reported *Lactobacillus plantarum* strains. The conclusions in this study, the *cps1* gene cluster resulted 52.28% reduction in EPS production, accelerated self-aggregation,

收稿日期: 2023-02-09

基金项目: 浙江商业职业技术学院人才启动项目 3010203025 (KT21001232); 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX [22]2019); 江苏省苏北科技专项 (XZ-SZ202113)。

作者简介: 赵芳 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 729591437@qq.com。

* 通信作者: 杨瑶 (1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 益生菌生物技术, E-mail: 45220@njnu.edu.cn。

reduced adhesion and 32.42% reduction in the ability to generated 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH·) in the YZH81Δ*cpsI* strain compared to the wild-type YZH81 strain. The results suggested that the *cpsI* gene cluster of strain YZH81 was associated with EPS synthesis and established favorable conditions for further studies on the mechanism of EPS biosynthesis in this strain.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum*; exopolysaccharides (EPS); capsular polysaccharide cluster (*cps* cluster); adhesion; probiotics

胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是乳酸菌的重要代谢产物,一般包括释放到培养基中的粘液多糖(slime polysaccharide, SPS)和附着在细胞壁的荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)两类^[1]。在食品工业中,乳酸菌 EPS 是一类安全的功能性添加剂,应用范围广泛,通常用作稳定剂^[2-3]、增稠剂^[4-5]和乳化剂^[6-7],能赋予产品良好的质地、风味和口感。植物乳植杆菌作为一类食源性微生物,因其安全性高,在工业、食品和医药等重要领域占有一席之地,在众多乳酸菌 EPS 研究中,植物乳植杆菌来源的 EPS 产量高,研究报道较多,其在发酵过程中产生的 EPS 被广泛应用于食品生产^[8]、制药^[9]及化工生产等领域^[10]。

细菌 EPS 合成相关基因及其功能最先在肺炎链球菌等致病菌中得到了详细的阐述^[11]。近年来,随着许多乳酸菌菌株的全基因组序列已经公布^[12-15],EPS 合成相关基因的研究也在不断推进。乳酸菌 EPS 合成基因簇的大小通常为 15~20 kb,所含基因数不超过 30 个,这些基因往往方向相同并以单个 mRNA 的形式转录。植物乳植杆菌来源的 EPS 合成基因簇研究报道也较多,目前结果显示植物乳植杆菌的 EPS 合成基因簇类型为荚膜多糖基因簇(*cps* cluster),不同菌株基因组通常含有 1~4 个 *cps* 基因簇^[16]。一个典型的 *cps* 基因簇结构上可以分为四个功能区域,即链长调节、组装、合成和输出区域,多个基因共同完成 EPS 重复单元的合成、聚合和输出。植物乳植杆菌 WCFS1(以下简称 WCFS1)是第一个进行全基因组测序的乳酸菌,也是目前报道含 *cps* 基因簇最多的植物乳植杆菌,其基因组包含四个不同的 *cps* 基因簇(*cps1A-I*, *cps2A-J*, *cps3A-J* 和 *cps4A-J*),每个基因簇片段大小约 10 kb,包含 10 个左右负责编码调控因子或酶的基因。此外,还有一些植物乳植杆菌的 *cps* 被较多报道^[17],如 ST-III, JDM1, ZJ316 等,各菌株含 1~3 个不等的 *cps* 基因簇。目前研究显示植物乳植杆菌的 *cps* 基因簇的多样性与其菌株特异性存在一定相关性^[18],因此针对不同菌株的 *cps* 需要开展更多的功能询证实验,为更多潜在益生菌的开发利用奠定基础。

本实验室前期开展高产 EPS 乳酸菌筛选,筛选获得一株植物乳植杆菌 YZH81(简称 YZH81),其 EPS 产量为 380.00±47.16 mg/L,与现有文献报道的 EPS 产量较高的乳酸菌水平相当^[19-20]。对 YZH81 进行全基因组测序,分析其 *cps* 基因簇结构,发现其基因组上有一个 *cps* 基因簇(*cps2*)与报道菌株同源

性较高^[21]。另外,还存在一个区域含多个与 EPS 合成相关基因串联一起,推测是 YZH81 菌株的另一个 *cps* 基因簇(*cps1*)。进一步比对结果显示,*cps1* 基因簇中的很多基因也在一些植物乳植杆菌菌株中存在,推测 *cps1* 基因簇是植物乳植杆菌中普遍存在的一个 *cps* 基因簇,其结构和功能亟待鉴定。因此,本文首先利用同源重组的手段对 YZH81 菌株 *cps1* 基因簇进行敲除,从菌株生长特性、自凝集能力、粘附特性和 DPPH 自由基清除能力等不同方面开展研究,旨在揭示 *cps1* 基因簇的功能,为进一步研究 YZH81 菌株高产 EPS 的特性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

本实验所用菌株和质粒见表 1。本研究中使用的所有植物乳植杆菌均在 MRS 培养基中培养,添加的红霉素和氯霉素终浓度均为 10 μg/mL,培养温度为 37 ℃。大肠杆菌的培养用 LB 培养基,添加的红霉素或氯霉素终浓度分别为 250 和 10 μg/mL;MRS 培养基 中国青岛海博有限公司;LB 培养基 英国 Oxoid 有限公司;红霉素、氯霉素、透析袋(14 kD)、溶菌酶、PBS(磷酸缓冲盐溶液)、细菌 DNA 提取试剂盒、琼脂糖(Agarose H)、4S Red 核酸染料(4S Red Plus Nucleic Acid Stain) 生工生物工程(上海)股份有限公司;ExTaq、DNA Marker、Bacteria Genomic DNA Extraction Kit 宝生物工程(大连)有限公司;三氯乙酸、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical, DPPH·) 上海麦克林生化试剂有限公司;无水乙醇 天津市天力化学试剂有限公

表 1 菌株和质粒		
Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study		
菌株和质粒	描述*	参考文献
植物乳植杆菌		
WCFS1	人体唾液中筛选分离	[14]
YZH81	鸡的直肠组织中筛选分离	实验室保藏
YZH81Δ <i>cpsI</i>	lox66-P 32-cat-lox71代替 N7E54_08415至 N7E54_08485(N7E54_08415-08485: lox66-P 32-cat-lox71), Ery ^r	本研究
大肠杆菌		
DH10B	克隆宿主	[22]
质粒		
pNZ5319	包含lox66-P32-cat-lox71 片段	[21]
pNZ5319Δ <i>cpsI</i>	包含N7E54_08415至N7E54_08485上下游同源区域片段	本研究

*注: Ery^r为红霉素抗性。

司; 浓硫酸 哈尔滨理工化学试剂有限公司; 人结肠腺癌细胞系 Caco-2 细胞 生兴生物技术有限公司; 本实验所用的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 2)。

表 2 引物序列
Table 2 Sequence of primers

引物	5'-3'	参考文献
YZH81-Up-F	AGGACCGATAACGCGCTCGAGGTGAT TCATCAGCTTTTGGCAG	本研究
YZH81-Up-R	GGCTTCTGTTTCTATCAGGCAATACAA CATTCAAAGCCACGTT	本研究
CAT-F	GCCTGATAGAAACAGAAGCCACTGG	本研究
CAT-R	ATCTTCACGTTACTAAAGGGAAT GTAGA	本研究
YZH81-Down-F	CCCTTATAGTAACGTGAAGATAGATATA TTTATACTCAGTTACCATTTGTTTTG	本研究
YZH81-Down-R	CCCCGTCAGCTTTAGAGATCTCACCTA AAATAAGGCAGACTGAATCA	本研究
83	GCAGCAGTTGATAAAGCAATTAC	[23]
85	GTTTTTTTCTAGTCCAAGCTCACA	[23]
87	GCCGACTGTACTTTCGGATCCT	[23]
90	GCTAAAGAAGAATTTGCTTCTGC	[23]
N7E54_07200-F	CGTCTGGCAGCTACTATAGTGA	本研究
N7E54_07200-R	GTGAAATGTCCGTGATCC	本研究
N7E54_11140-F	GTGGGAAATGCTGGTGGTAA	本研究
N7E54_11140-R	CTGAGTCACCATTCACCA	本研究
N7E54_01205-F	ACAGTTACTAAGACCGCGAC	本研究
N7E54_01205-R	TTGAAGCAGTACCGACTTCG	本研究
N7E54_06005-F	TCTGATGGTAATGTGACGGC	本研究
N7E54_06005-R	AGTACCATCAGCACCTTCTG	本研究
N7E54_11140-F	GGAGACCATCATAAACGGTG	本研究
N7E54_11140-R	AGAATCAACCGTAACGCTCG	本研究
N7E54_11400-F	CACAACGACGACTGATACTG	本研究
N7E54_11400-R	GCTATCAGCAGTCCAATC	本研究
N7E54_11445-F	ATCAAGACACGACCAAGTGAAC	本研究
N7E54_11445-R	CACGTTACTCAGGTACCATTC	本研究
N7E54_03885-F	CAACACCACAAGTAACCGTG	本研究
N7E54_03885-R	AGTCGCATCTCCAATGACAG	本研究
N7E54_00975-F	GGAGTACTTGGTATCCAGGT	本研究
N7E54_00975-R	AGTTAGCAATACCGGCACTG	本研究
N7E54_00570-F	TGGCACGACATAGTAACG	本研究
N7E54_00570-R	CGGTGTAATGGGTCTTG	本研究
N7E54_05645-F	GTCAGGATGATGTCAAGCAACC	本研究
N7E54_05645-R	GGTATCCGTCGTTAATCCCA	本研究
N7E54_10785-F	CATCGGTCATCAATGGTCCT	本研究
N7E54_10795-R	GTCTCAGCATCAGTCACATC	本研究
rpoB-F	CACCGTACCCGTAAGTTATGC	[24]
rpoB-R	GGAGACCTTCATCCAAGAACCA	[24]

HE-90 型电泳仪、水平电泳槽 上海天能科技有限公司; SHP-150 型生化培养箱 上海精宏实验设备有限公司; ZQTY-70T 振荡培养箱 上海知楚仪器有限公司; MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱 日本三洋公司; XD-202 型倒置生物显微镜 江南永新光学有限公司; HH-2 型电热数显恒温水浴锅 常州亚特实验仪器有限公司; SW-CJ-ZF 型双人双面净化工作台 苏州净化设备有限公司; AG 4309 型高压脉冲电击转化仪、Personal PCR 仪、CL-22M 型高速冷冻

离心机 德国 Eppendorf 公司; Nano-300 微量分光光度计 杭州奥盛仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 使用细菌全基因组提取试剂盒提取 YZH81 全基因组 DNA, 具体步骤参照使用说明书。取提取后的 DNA 样本进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测基因组提取质量及完整性。

1.2.2 基因组的测序与分析 YZH81 菌株 GenBank 编号为 JAODTM000000000。基因组的测序在生工生物工程(上海)股份有限公司进行, 采用 Illumina 测序技术; 基因组拼接使用 SPAdes 拼接二代测序数据, 采用 GapFiller 对拼接得到的 contig 补 GAP; 利用 PrInSeS-G 进行序列矫正, 修正拼接过程中的剪辑错误及小片段的插入缺失。使用 Blastn(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 将 YZH81 基因组的 *cps* 基因簇与 WCFS1(AL935263.2)、LP90(CP_015857)、ST-III(NC_014554) 和 JDM1(CP001617.1) 进行对比, 由 TB Tools(v1.108)进行基因组共线性分析。

1.2.3 *cps* 基因簇缺失株的构建 本研究中使用的引物列于表 2。YZH81 Δ *cpsI* 的构建基于同源重组原理进行^[21], 以 YZH81 的全基因组 DNA 为模板, 利用 YZH81-Up-F/R、YZH81-Down-F/R 和 CAT-F/R 引物通过 PCR 扩增 *cpsI* 基因簇的上游和下游侧翼区域, 先后克隆至质粒 pNZ5319 *XhoI* 和 *BglIII* 酶切位点, 构建敲除质粒 pNZ5319 Δ *cpsI*。按照电击转化法, 将质粒电转化 YZH81 感受态细胞中, 电转产物 37 ℃ 孵育 2 h 后涂布于含 10 μg/mL 氯霉素的 MRS 培养基上, 37 ℃ 静置培养 24~36 h, 阳性克隆采用菌落 PCR 验证长度约 1.7 kb 同源臂序列, 最终获得缺失 *cpsI* 基因簇的 YZH81 突变株, 命名为 YZH81 Δ *cpsI*。

为了进一步验证 *cpsI* 敲除的结果, 将 YZH81 和 YZH81 Δ *cpsI* 序列上传到 Galaxy 平台进行基因组测序。根据条形码分离来自 Illumina 测序的原始 Illumina 序列片段, 并使用 Bowtie 2 将 YZH81 Δ *cpsI* 序列的每个读数对应的核苷酸片段映射到 YZH81 基因组。参考 Zhang 等^[25]的方法, 整合基因组学查看器(IGV)使用核苷酸窗口大小对比对结果进行排序和计数, 然后对基因求和。读取映射到基因的最后 10% 被丢弃, 因为这些插入可能不会使基因功能失活。然后, 通过以下公式计算归一化读取计数 RPKM(每百万输入读取每千碱基读取数), 将每个基因的读取计数标准化为映射到每个重复中基因组的读取总数: $RPKM = (\text{映射到基因} \times \text{读取数} \times 10^6) / (\text{样本中映射的总输入读取数} \times \text{基因长度, 单位为 kb})$ 。

1.2.4 EPS 产量测定 参考李卫娜等^[26]的实验方法并做适量改动。将-80 ℃ 冰箱保藏的 YZH81 和 YZH81 Δ *cpsI* 菌种划线相应抗性的 MRS 平板, 单菌落挑取至液体 MRS 培养基活化, 活化后的种子液以 1% 接种量发酵培养, 37 ℃ 静置培养 32 h, 离心(10000×g, 4 ℃, 15 min)取上清液。向上清液中添加

入 80% 三氯乙酸至终浓度为 4%(w/v), 4 ℃ 下静置 8 h。通过离心(10000×g, 4 ℃, 15 min)除去沉淀的蛋白质。随后上清加入 3 倍体积的冷乙醇在 4 ℃ 下醇沉过夜, 离心(10000×g, 4 ℃, 20 min)取沉淀。将沉淀用适当体积去离子水溶解, 在 4 ℃ 下透析 48 h, 然后冻干, 最终获得粗 EPS 样品。采用苯酚-硫酸法测定粗 EPS 的碳水化合物含量。绘制标准曲线, 以葡萄糖含量(mg/mL)为横坐标, 吸光度($A_{490\text{ nm}}$)作为纵坐标, 建立回归方程, $y=0.014x-0.021$, $R^2=0.99$ 。

1.2.5 生长曲线及 pH 测定 参考 Yang 等^[27]的实验方法并适当改动。将-80 ℃ 冰箱保藏的 YZH81 和 YZH81Δ*cpsI* 菌种划线相应抗性的 MRS 平板, 单菌落挑取至液体 MRS 培养基活化, 活化后的种子液以 1% 接种量发酵培养, 接种后即刻混匀, 取 1 mL 于比色皿中测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 值, 作为初始零时间点值, 随后每 2 h 测定一次 $OD_{600\text{ nm}}$ 值和 MRS 液体培养基的 pH, 直至 24 h 实验结束。以时间为横坐标, $OD_{600\text{ nm}}$ 数值和 pH 为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.6 自凝集能力检测 参考 Gao 等^[28]的实验方法并做适量改动。将-80 ℃ 冰箱保藏的 YZH81 和 YZH81Δ*cpsI* 菌种划线相应抗性的 MRS 平板, 单菌落挑取至液体 MRS 培养基活化, 活化后的种子液以 1% 接种量发酵培养, 37 ℃ 静置培养 12 h, 离心收集菌体(4500×g, 15 min), 使用 PBS(pH7.2)洗涤 2 次后于 PBS 中重悬, 调整菌液浓度至 10^8 CFU/mL, 将 4 mL 等量的细胞菌悬液装入 5 mL 的离心管中, 混匀后静置于室温。自凝集测定的时间为 4 和 16 h, 每次取 0.5 mL 离心管上部菌悬液, 加入到 1.5 mL 的 PBS 中, 混匀, 测定 600 nm 下的吸光值。以 PBS 作为空白对照, 凝集率(%)的计算公式为:

$$\text{凝集率}(\%) = \left(1 - \frac{A_T}{A_0}\right) \times 100$$

注: A_0 是凝集前的上清溶液在 600 nm 下测定的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值; A_T 是凝集后的上清溶液在 600 nm 下测定的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。

1.2.7 Caco-2 细胞粘附性测定 Caco-2 细胞水浴解冻, 8000×g 离心 5 min 收集细胞, 加入 5 mL 完全培养液, 吸出上清, 保留细胞沉淀。加入 1 mL 完全培养液轻轻吹吸, 混匀并移至培养皿中。放置于 37 ℃ 培养, 每隔 2 d 更换培养液, 显微镜镜检, 待细胞培养皿上 Caco-2 的覆盖率达到 80% 后, 可进行粘附实验。

细胞粘附实验参照 Yang 等^[27]的方法。将 YZH81 和 YZH81Δ*cpsI* 的菌悬液(已稀释调整至菌浓度为 1×10^8 CFU/mL), 于 12000×g 离心 1 min, 弃上清, 菌体经无菌 PBS 缓冲液(pH7.2)清洗 3 次, 然后重悬于不完全 DMEM 培养液。待细胞培养皿中的细胞长至单层时, 用无菌 PBS 缓冲液(pH7.2)清洗后, 添加 1 mL 含有 1×10^8 CFU/mL 重组乳酸菌的 DMEM 培养物, 于二氧化碳培养箱中孵育 2 h; PBS 洗涤去除未粘附细菌, 随后加入 0.5% Triton X-100

处理 5 min, 使粘附细菌从细胞脱落, 收集孔内液体。用细胞粘附数表示粘附性, 公式如下:

$$\text{粘附数}(\text{CFU}/\text{cell}) = \frac{\text{粘附菌株细胞数}}{\text{Caco-2 细胞数}}$$

1.2.8 粘附蛋白的表达量 将活化后的 YZH81 和 YZH81Δ*cpsI* 菌株分别转接于相应的 MRS 培养基中, 37 ℃ 培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 吸光度为 0.8~1。根据试剂盒说明书提取 YZH81 和 YZH81Δ*cpsI* 的总 RNA, 使用带有 gDNA 的 PrimeScript™ RT 试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 检测粘附蛋白的表达。然后, 以 *rpoB* mRNA 为参考基因^[24], 采用 $2^{-\Delta\Delta C}$ 相对定量方法计算各组基因表达, 用于 RT-qPCR 的引物如表 2 所示。

1.2.9 DPPH 自由基清除实验 取 2 mL 的 DPPH 无水乙醇溶液(400 μmol/L), 加入 2 mL 待测菌液混匀, 室温避光静置 30 min, 8000×g 离心 10 min, 测定上清液在 517 nm 的吸光度值。DPPH 自由基清除率计算公式为:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0}\right] \times 100$$

注: A_0 为等体积无水乙醇代替样品的吸光度值; A_1 为实验组吸光度值; A_2 为等体积无水乙醇代替 DPPH 乙醇溶液的吸光度值。

1.3 数据处理

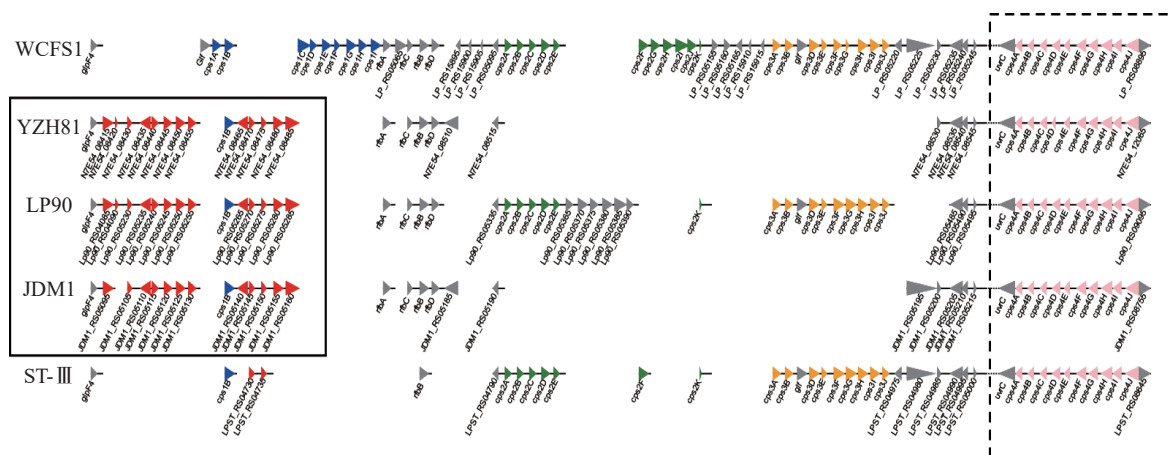
每组实验重复 3 次, 实验结果为 3 次重复的平均值, 采用 SPSS 22.0 软件进行实验数据的统计与分析。检测水准为 0.05, 运用最小显著差异(Least significant difference, LSD)法比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。实验作图均采用 Prism 8.0 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 YZH81 菌株 *cps* 基因簇分析

YZH81 菌株经全基因组测序, 与 *cps* 基因簇研究最为深入的 WCFS1 菌株进行比对, 结果显示如图 1。YZH81 基因组上除基因 N7E54_08460 与 WCFS1 的 *cpsI/B* 基因有相似性(36.94%)以外, 比对获得一个基因簇(自 N7E54_12115 至 N7E54_12070), 含 10 个基因, 其基因组成、功能、大小及排列与 WCFS1 菌株 *cps4* 基因簇高度相似, 单个基因序列同源性很高, 为 94.75%~99.62%, 故推测该基因簇是 YZH81 的一个完整的 *cps* 基因簇。

然而, 与其他植物乳植杆菌比对的结果显示 YZH81 基因组上还存在一些连续排列的基因(共计 14 个, 含上述基因 N7E54_08460), 其功能注释与植物乳植杆菌 *cps* 基因簇的功能基因相符, 如编码糖基转移酶、多糖生物合成蛋白、翻转酶等, 检索比对的基因功能注释和与其他代表性植物乳植杆菌基因相似性分析结果列于表 3。因此, 推测其为 YZH81 另一个 *cps* 基因簇。

图1 YZH81 菌株 *cps* 基因簇的功能对比图示Fig.1 Comparative illustration of *cps* gene clusters of *L. plantarum* YZH81

注: 比对的植物乳植杆菌参考基因组 accession number 如下: YZH81 (AL935263.2; N7E54_08410~08485), LP90 (CP_015857; Lp90_RS04080~RS09095), JDM1 (NC_012984; JDM1_JDM1_RS05090~RS08755) and ST-III (NC_014554; LPST_LPST_RS04720~LPST_RS08645), 实线框表示 YZH81 的 *cps1* 基因簇, 推测为植物乳植杆菌新的 *cps* 基因簇, 虚线框表示 YZH81 的高同源性的 *cps2* 基因簇。

表3 YZH81 菌株 *cps1* 基因簇功能比对Table 3 Functional alignment of *cps1* gene clusters of YZH81 strain

YZH81	功能注释	JDM1	LP90
N7E54_08415	glycosyltransferase	RS05095 [100]	RS04085 [100]
N7E54_08420	transposase	RS05100 [100]	RS04090 [100]
N7E54_08430	transposase	RS05105 [100]	RS05230 [99.45]
N7E54_08435	hypothetical protein	RS05110 [100]	RS05235 [99.75]
N7E54_08440	glycosyltransferase	RS05115 [100]	RS05240 [100]
N7E54_08445	capsular biosynthesis protein	RS05120 [100]	RS05245 [100]
N7E54_08450	glycosyltransferase	RS05125 [100]	RS05250 [99.71]
N7E54_08455	glycosyltransferase	RS05130 [100]	RS05255 [99.35]
N7E54_08460	glycosyltransferase family 4 protein	RS05135 [100]	RS05260 [98.99]
N7E54_08465	Wzy	RS05140 [100]	RS05265 [100]
N7E54_08470	polysaccharide biosynthesis protein	RS05145 [100]	RS05270 [100]
N7E54_08475	CpsD/CapB family tyrosine-protein kinase (Wze)	RS05150 [100]	RS05275 [100]
N7E54_08480	serine hydrolase	RS05155 [100]	RS05280 [100]
N7E54_08485	oligosaccharide flippase family protein (Wzx)	RS05160 [100]	RS05285 [100]

注: 比对的植物乳植杆菌参考基因组 accession number 如下: YZH81, AL935263.2; LP90, CP_015857; JDM1, NC_012984; “[] ”中数字为与 YZH81 同源蛋白基因序列相似性。

综上所述, YZH81 菌株推测含有两个 *cps* 基因簇, 分别命名为 *cps1* 和 *cps2*, 其中 *cps1* 是尚未报道的植物乳植杆菌 *cps* 基因簇, 遂开展对 YZH81 菌株 *cps1* 的功能鉴定研究。

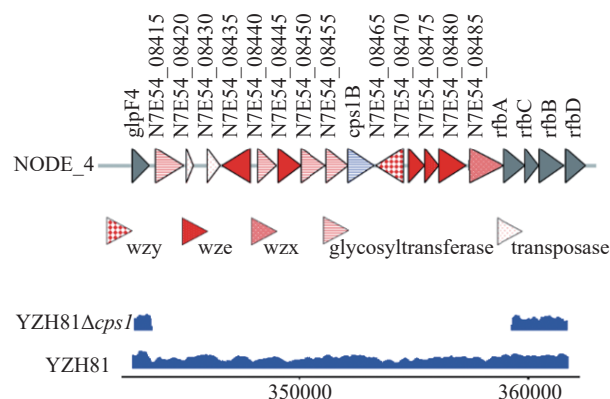
2.2 YZH81Δ*cps1* 的构建

根据方法 1.2.3, 构建带有 YZH81Δ*cps1* 基因簇上下游侧翼序列的敲除质粒 pNZ5319Δ*cps1*, 电击转化 YZH81 感受态细胞, 利用红霉素和氯霉素双抗性 MRS 平板筛选, 经 PCR 验证, 获得阳性菌株 YZH81Δ*cps1*。

由于敲除的 *cps1* 基因簇片段较长, 为了验证敲除 *cps1* 的完整性, 对 YZH81Δ*cps1* 的基因组进行了测序, 与野生型 YZH81 进行比对, 使用 IGV 进行定位, 如图 2 所示, 显示整个 *cps1* 簇在基因水平上被完全去除。

2.3 *cps1* 对 YZH81 产 EPS 的影响

根据方法 1.2.4, 对 YZH81 和 YZH81Δ*cps1* 的

图2 YZH81Δ*cps1* 的 *cps1* 基因簇完整敲除Fig.2 YZH81Δ*cps1* complete knockout of *cps1* gene cluster

注: 上图为 YZH81 多糖生物合成的 *cps1* 基因簇, 下图为 IGV 图, YZH81 和 YZH81Δ*cps1* 基因组的比较。

EPS 产量进行测定, 结果如图 3。结果显示 YZH81Δ*cps1* 的 EPS 产量为 181.33±22.03 mg/L, 相比野生型 YZH81 的 380.00±47.16 mg/L, EPS 产量显著下

降了 52.28% ($P < 0.05$)。该结果表明 *cpsI* 基因簇与菌株 EPS 的产量非常相关。

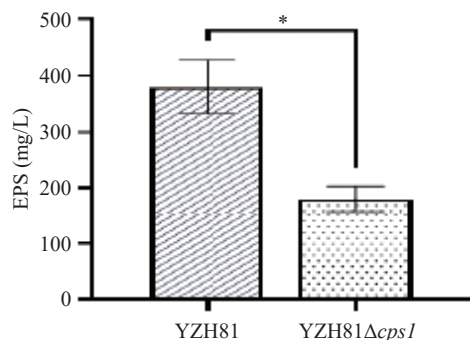


图 3 YZH81Δ*cpsI* 的 EPS 产量

Fig.3 EPS production of YZH81Δ*cpsI*

注: *表示差异显著 ($P < 0.05$); 图 5、图 6、图 8 同。

2.4 *cpsI* 对 YZH81 生长的影响

YZH81 和 YZH81Δ*cpsI* 分别在相应的 MRS 培养基中培养 24 h, 每 2 h 测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 绘制生长曲线, 结果如图 4 所示。从 $OD_{600\text{ nm}}$ 数值来看, YZH81Δ*cpsI* 生长不如 YZH81, 培养 24 h 的 $OD_{600\text{ nm}}$ 吸光值差异显著 ($P < 0.05$)。然而, 从培养基 pH 数据来看, 这两种菌株没有显著差异 ($P > 0.05$), 随后对两个菌 24 h 发酵液进行菌落平板计数, 结果为 YZH81 和 YZH81Δ*cpsI* 的菌落数分别为 $(9.57 \pm 0.40) \times 10^9$ 和 $(9.53 \pm 0.25) \times 10^9$ CFU/mL, 无明显差异 ($P > 0.05$), 该结果与 pH 结果一致。因此, 本研究最终结果表明虽然吸光值 $OD_{600\text{ nm}}$ 有显著 ($P < 0.05$) 下降, 但 *cpsI* 缺失没有影响菌株 YZH81 的生长量。

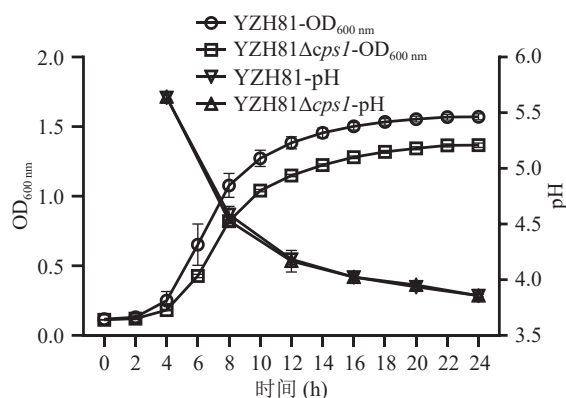


图 4 YZH81Δ*cpsI* 的生长曲线及 pH 测定

Fig.4 Growth curve and pH determination of YZH81Δ*cpsI*

2.5 *cpsI* 对菌株自凝集的影响

菌株的自凝集是指同一种菌间相互凝集形成多细胞簇的现象, 与菌株表面结构相关^[28]。YZH81 和 YZH81Δ*cpsI* 的自凝集结果见图 5。在 4 h 时, YZH81 和 YZH81Δ*cpsI* 的自凝集率分别是 26.30%±3.22%、38.90%±2.31%; 在 16 h 时, YZH81 和 YZH81Δ*cpsI* 的凝集速率分别是 52.07%±2.03%、68.90%±3.14%。YZH81Δ*cpsI* 在 4 h 和 16 h 的自凝集率均显著高于 YZH81 ($P < 0.05$), 分别是 YZH81 的 1.48 和 1.32 倍。

该结果说明 *cpsI* 基因簇的缺失加速了菌株自凝集, 分析其原因可能由于 EPS 的减少改变了菌株表面分子的相互作用力。自凝集速率的增加可能是导致 YZH81Δ*cpsI* 菌株生长时 $OD_{600\text{ nm}}$ 值降低的原因。

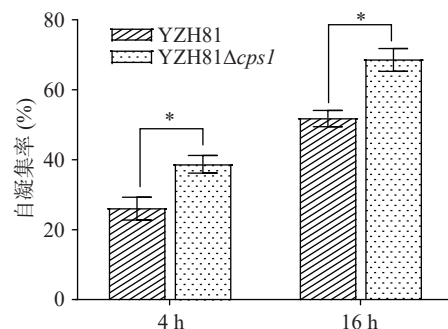


图 5 YZH81Δ*cpsI* 在 4 h 和 16 h 的自凝集率

Fig.5 Bacterial aggregation of YZH81Δ*cpsI* strains at 4 h and 16 h

2.6 *cpsI* 对菌株粘附性的影响

粘附性是乳酸菌发挥益生作用的前提, 与菌体细胞表面结构相关^[29]。为了研究 *cpsI* 基因簇在 YZH81 粘附肠上皮细胞的作用, 选择肠上皮细胞系 (Caco-2 细胞) 为研究对象, 对 YZH81Δ*cpsI* 的粘附性进行了测定。如图 6 所示, YZH81Δ*cpsI* 的粘附性为 8.52 ± 0.20 CFU/cell, 显著低于 YZH81 的粘附性 21.50 ± 1.80 CFU/cell, 该结果与 Gao 等^[28] 的实验结果一致, 即 *cpsWC* 可以促进植物乳植杆菌在 Caco-2 细胞上粘附。

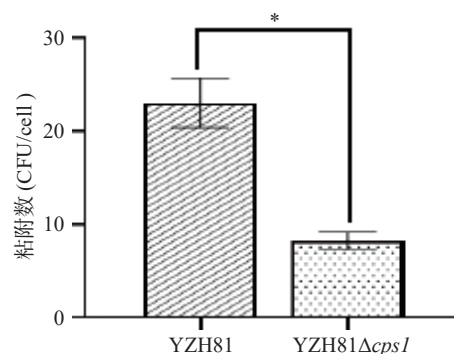


图 6 YZH81Δ*cpsI* 粘附 Caco-2 细胞的数量

Fig.6 Adhesion of YZH81Δ*cpsI* strains to Caco-2 cells

此外, 实验研究了 YZH81 菌株可能的粘附蛋白基因表达情况。首先, 根据 YZH81 基因组序列与 WCFS1 的比对结果, 检索获得 YZH81 菌株中有 12 个与 WCFS1 粘附蛋白^[14] 同源的粘附蛋白基因 (表 4)。结果显示, 除基因 N7E54_11140 外, 其余 11 个粘附蛋白基因序列与 WCFS1 菌株同源性较高, 相似性高于 75%。通过 RT-qPCR 研究 *cpsI* 的缺失对 YZH81 粘附蛋白表达的影响, 如图 7 所示, YZH81Δ*cpsI* 菌株的 12 个粘附蛋白基因中有 10 个基因的转录水平显著低于野生型 YZH81 表达水平 (Fold change 比 ≥ 1.5), 该结果表明 *cpsI* 基因簇可能通过影响 YZH81 中粘附蛋白的表达, 最终导致该

表 4 粘附蛋白基因
Table 4 Adhesion protein genes

编号	WCFS1	功能注释	YZH81	相似性(%)
1	LP_RS04070	Internalin-J precursor	N7E54_07200	85.26
2	LP_RS05225	mannose-specific adhesin, LPXTG-motif cell wall anchor	N7E54_11140	30.87
3	LP_RS07025	MucBP domain protein	N7E54_01205	98.51
4	LP_RS10640	Internalin-J precursor	N7E54_06005	98.79
5	LP_RS12860	IgA FC receptor precursor	N7E54_11140	98.53
6	LP_RS13100	MucBP domain protein	N7E54_11400	79.03
7	LP_RS13150	Internalin-J precursor	N7E54_11445	95.90
8	LP_RS00795	Collagen adhesin precursor	N7E54_03885	97.74
9	LP_RS07255	GlcNAc-binding protein A precursor	N7E54_00975	99.01
10	LP_RS07650	hypothetical protein	N7E54_00570	99.30
11	LP_RS10955	Cna protein B-type domain protein	N7E54_05645	96.88
12	LP_RS12445	Collagen binding domain protein	N7E54_10785	91.59

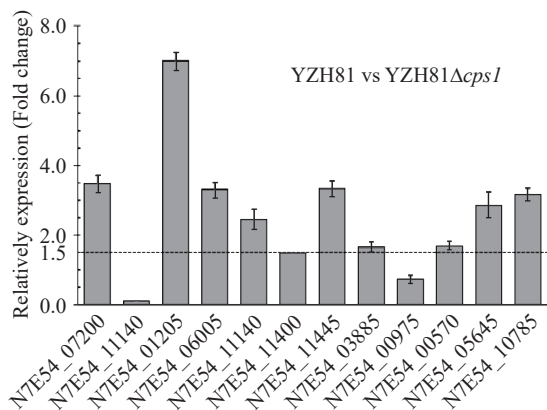


图 7 粘附蛋白的基因表达差异

Fig.7 Expression of genes coding adhesion proteins

菌株与 Caco-2 细胞的粘附性显著下降。

2.7 YZH81ΔcpsI 对 DPPH 自由基清除活性的影响

YZH81 和 YZH81ΔcpsI 清除 DPPH 自由基能力如图 8 所示, 两株菌株均有一定的清除 DPPH 自由基的能力。但是, YZH81 的 DPPH 自由基清除率是 $46.82\% \pm 1.95\%$, 显著高于 YZH81ΔcpsI, 清除率为 $31.64\% \pm 1.97\%$ ($P < 0.05$)。乳酸菌的 DPPH 自由基清除能力与其分泌到菌体表面和代谢产物中的 EPS 有关, 这些多糖类物质通过氢原子和电子转移中和 DPPH 自由基^[30]。因此, 推测 YZH81 菌株 cpsI 的缺失引起的 EPS 产量的降低, 影响了 YZH81 对 DPPH

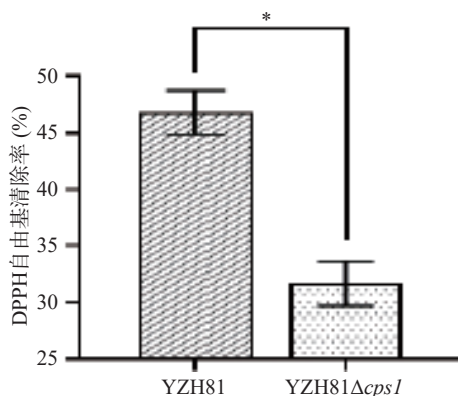


图 8 YZH81ΔcpsI 的 DPPH 自由基清除率

Fig.8 DPPH· scavenging rate of YZH81ΔcpsI

自由基清除的能力。本实验的结果与 Zhang 等^[31] 对植物乳植杆菌 C88 EPS 抗氧化活性分析的结果一致。

3 讨论

乳酸菌广泛应用于生产发酵乳制品, 很多菌株被报道可以产生 EPS。目前, 植物乳植杆菌来源的 EPS 研究较为广泛, 而且, 由于相对简单的基因操作, 如成熟的异源表达载体、成功的基因敲除方法^[21] 和简单的电转化方法, 现阶段对植物乳植杆菌的 EPS 合成基因簇(cps 簇)研究报道较多^[32-33]。本实验室前期从鸡的直肠中分离获得一株高产 EPS 的乳酸菌, 经鉴定为植物乳植杆菌, 命名为 YZH81, 其 EPS 产量为 380 mg/L, 本研究开展了该菌株 cps 基因簇的研究, 为进一步了解该菌株的 EPS 生产特性奠定基础。

植物乳植杆菌基因组通常含有 1~4 个 EPS 合成基因簇即 cps 基因簇。典型的 cps 基因簇通常包含 EPS 合成基因(wzd, wze, wzh)、翻转酶(wzx)和聚合酶(wzy)等相关功能基因, 单向转录。WCFS1 菌株是植物乳植杆菌中 cps 簇研究最为透彻的菌株, 也是被报道含有最多 cps 簇的菌株^[18]。因此, 本文首先将 YZH81 菌株与 WCFS1 进行比对, 结果显示 YZH81 的基因组仅含 1 个 cps 基因簇, 与 WCFS1 cps4 基因簇高度相似(单个基因相似度高达 94.75%~99.62%)。但是, 与其他植物乳植杆菌(LP90 和 JDM1)比对结果显示, YZH81 基因组上还有一个区域聚集一连串与 EPS 合成相关基因, 功能分别为 wze, wxz, wzy 和一些编码糖基转移酶家族蛋白的基因, 与典型的产 EPS 的基因簇结构一致。因此, 推测 YZH81 具有一个尚未鉴定的 cps 基因簇, 根据基因组上的物理顺序命名为 cpsI 基因簇。

为了鉴定 cpsI 基因簇的功能, 本研究构建了 cpsI 敲除菌 YZH81ΔcpsI, 并随即开展了该菌株 EPS 产量、菌株生长量、菌株自凝集特性和菌株粘附性的体外实验。结果表明, 与野生型 YZH81 相比, YZH81ΔcpsI 的 EPS 产量下降, 细胞自聚集加速, 且粘附性降低。以上结果不仅说明了 cpsI 基因簇参与了 YZH81 菌株的 EPS 合成, 更为重要的是由于 cpsI

的缺失造成了 EPS 的减少,也显著影响了菌株的表面结构,导致了自凝集的加剧和粘附性的降低。考虑到 EPS 产量并不是影响菌株粘附性的唯一因素,本文进一步研究了 YZH81 $\Delta cps1$ 粘附蛋白的表达情况。经检索比对获得的 12 个 YZH81 菌株粘附蛋白中,与野生型相比, $cps1$ 的缺失导致了 10 个粘附蛋白基因表达量显著下降,其余 2 个无明显变化。该结果说明了 YZH81 菌株的 $cps1$ 基因簇可能通过生产的 EPS 产量和调节粘附蛋白表达两个方面的作用来共同影响菌株的粘附性。在此基础上,本研究继续测定了 $cps1$ 缺失后 DPPH 自由基清除效果,结果显示野生型菌株具有一定的抗氧化活性,但 $cps1$ 基因簇敲除后 DPPH 自由基清除率下降了 32.42%。该结果显示 $cps1$ 基因簇的缺失造成 EPS 的产量下降影响了菌株的抗氧化功能。

综上所述,YZH81 菌株基因组上发现一个尚未鉴定的 EPS 合成基因簇 $cps1$,本研究结果显示该基因簇可影响菌株 EPS 的产量,造成菌株粘附性和抗氧化性的改变,为深入研究该菌株 EPS 的生物学功能奠定了一定的理论基础。乳酸菌 EPS 的合成产生是一个复杂的过程,相关基因簇的调控可能涉及各种调控机制。本研究发现了一个新的 $cps1$ 基因簇,其功能与 EPS 的产生和菌株的功能相关。在此基础上,需要进一步地研究单一 cps 簇的基因结构与功能以及不同 cps 簇在 EPS 合成中的互作关系,从而深入揭示其合成 EPS 的分子机制。

4 结论

本研究针对一株高产 EPS 的植物乳植杆菌 YZH81 的 EPS 合成基因簇(cps cluster)开展研究,对其中一个 cps 基因簇($cps1$)的结构与功能进行初步鉴定。利用同源重组方法,构建 pNZ5319 $\Delta cps1$ 敲除质粒并成功构建了 $cps1$ 敲除菌 YZH81 $\Delta cps1$ 。结果显示,与野生型 YZH81 菌株相比,YZH81 $\Delta cps1$ 的 EPS 产量显著降低,自聚集能力加速,粘附性降低,且清除 DPPH 自由基能力明显下降。本研究证明了 YZH81 菌株的 $cps1$ 基因簇在 EPS 合成中的重要作用,也为进一步研究该菌株 EPS 合成基因簇及其作用机制建立有利条件。

参考文献

[1] 王烁,姜静,杜仁鹏,等.乳酸菌胞外多糖的生物合成、特性和应用[J].生物技术,2022,32(3):394-401. [WANG S, JIANG J, DU R P, et al. Biosynthesis, characterization and application of exopolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. Biotechnology, 2022, 32(3): 394-401.]

[2] PRETE R, ALAM M K, PERPETUINI G, et al. Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: A sustainable tool for functional foods[J]. Foods, 2021, 10(7): 1653.

[3] 张丽,张兰威,韩雪.乳酸菌胞外多糖的研究进展[J].食品工业科技,2012,33(17):378-381,387. [ZHANG L, ZHANG L W, HAN X. Research and development of lactic acid bacteria exopolysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(17): 378-381,387.]

[4] 钱超.乳酸菌产胞外多糖及其在食品中的应用[J].现代食品,2022,28(17):18-22. [QIAN C. Production of exopolysaccharide by lactic acid bacteria and its application in food[J]. Modern Food, 2022, 28(17): 18-22.]

[5] 邓凯波.乳酸菌胞外多糖的功能及在食品工业中的应用[J].食品安全导刊,2009(7):49-50. [DENG K B. The function of *Lactobacillus* extracellular polysaccharide and its application in food industry[J]. China Food Safety Magazine, 2009(7): 49-50.]

[6] POURJAFAR H, ANSARI F, SADEGHI A, et al. Functional and health-promoting properties of probiotics' exopolysaccharides; isolation, characterization, and applications in the food industry[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022.

[7] XU Y M, CUI Y L, YUE F F, et al. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*: Structures, physicochemical functions and applications in the food industry[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94: 475-499.

[8] 曹永强,张健,赵雯,等.植物乳植杆菌胞外多糖的分离纯化及其乳化特性[J].食品科学,2016,37(17):7-13. [CAO Y Q, ZHANG J, ZHAO W, et al. Isolation, purification and emulsifying properties of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*[J]. Food Science, 2016, 37(17): 7-13.]

[9] 兰冬雪,瞿茜楠,黄天,等.益生菌活性代谢产物的研究及应用进展[J].食品工业科技,2022,43(24):11-20. [LAN D X, QU X N, HUANG T, et al. Research and application progress of the active metabolites of probiotics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 11-20.]

[10] 朱玉婷,文欣,向俊,等.植物乳植杆菌胞外多糖的单糖组成及抗氧化活性[J].乳业科学与技术,2022,45(6):7-11. [ZHU Y T, WEN X, XIANG J, et al. Monosaccharide composition and antioxidant activity of exopolysaccharides of *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2022, 45(6): 7-11.]

[11] KAWAI Y, MARLES W J, CLEVERLEY R M, et al. A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins[J]. The EMBO Journal, 2011, 30(24): 4931-4941.

[12] ZHANG Z Y, LIU C, ZHU Y Z, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(15): 5020-5021.

[13] WANG Y Y, CHEN C, AI L Z, et al. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus plantarum* ST-III[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(1): 313-314.

[14] KLEEREBEZEM M, BOEKHORST J, VAN K R, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(4): 1990-1995.

[15] LAMONTANARA A, CAGGIANIELLO G, ORRÙ L, et al. Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* Lp90 isolated from wine[J]. Genome Announcements, 2015, 3(2): e00097-15.

[16] 田佳乐,刘洋,李嘉雯,等.产胞外多糖嗜热链球菌 eps 基因簇的表达及生物信息学分析[J].中国食品学报,2021,21(11):244-251. [TIAN J L, LIU Y, LI J W, et al. Expression of eps gene cluster in *Streptococcus thermophilus* exopolysaccharide and bioinformatics analysis[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(11): 244-251.]

[17] ZEIDAN A A, POULSEN V K, JANZEN T, et al. Polysaccharide production by lactic acid bacteria: From genes to industrial applications[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(Supp_1): S168-S200.

[18] JIANG Y Y, YANG Z N. A functional and genetic overview

- of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 47: 229–240.
- [19] OLEKSY M, KLEWICKA E. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(3): 450–462.
- [20] UMMUGULSUM T, BUSRA A, BELMA A, et al. The relationship between the structural characteristics of *Lactobacilli*-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells *in vitro*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1–14.
- [21] REMUS D M, VAN KRANENBURG R, VAN SWAM I I, et al. Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11(1): 149.
- [22] DURFEE T, NELSON R, BALDWIN S, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(7): 2597–2606.
- [23] 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.
- [24] MARCO M L, BONGERS R S, DE VOS W M, et al. Spatial and temporal expression of *Lactobacillus plantarum* genes in the gastrointestinal tracts of mice[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(1): 124–132.
- [25] ZHANG X, PRIETO A, MAAT V D, et al. Fitness determinants of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during growth in human serum[J]. *BioMed Central*, 2017, 18(1): 893.
- [26] 李卫娜, 赵波, 柳陈坚, 等. 副干酪乳杆菌胞外多糖抗氧化活性分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(24): 34–39. [LI W N, ZHAO B, LIU C J, et al. Antioxidant activity analysis of exopolysaccharide from *Lactobacillus paracasei* strains[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(24): 34–39.]
- [27] YANG Y, ZHANG W J, HUAN H L, et al. Construction of an integrated mCherry red fluorescent protein expression system for labeling and tracing in *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 690270–690270.
- [28] GAO Y Q, NIU M Z, YU X H, et al. Horizontally acquired polysaccharide-synthetic gene cluster from *Weissella cibaria* boosts the probiotic property of *Lactiplantibacillus plantarum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 692957–692957.
- [29] LEE I-C, CAGGIANIELLO G, VAN SWAM I I, et al. Strain-specific features of extracellular polysaccharides and their impact on *Lactobacillus plantarum*-host interactions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3959–3970.
- [30] 高云云, 李宝坤, 卢士玲, 等. 新疆传统乳品中产胞外多糖乳酸菌的筛选及益生特性的研究[J]. *中国酿造*, 2020, 39(5): 28–34. [GAO Y Y, LI B K, LU S L, et al. Screening and probiotic characteristics of extracellular polysaccharide-producing lactic acid bacteria from traditional dairy products in Xinjiang[J]. *China Brewing*, 2020, 39(5): 28–34.]
- [31] ZHANG L, LIU C H, LI D, et al. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 54: 270–275.
- [32] 代安娜尔, 乔少婷, 孙思霖, 等. 嗜热链球菌 IMAU20246 胞外多糖基因簇及其表达分析[J]. *微生物学报*, 2023, 63(1): 403–418. [DAI A, QIAO S T, SUN S L, et al. Identification and expression profiling of exopolysaccharide gene cluster in *Streptococcus thermophilus* IMAU20246[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(1): 403–418.]
- [33] 李敏, 李伟程, 刘亚华, 等. 乳酸乳球菌乳酸亚种 IMAU11823 全基因组测序及胞外多糖基因簇分析[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(4): 256–266. [LI M, LI W C, LIU Y H, et al. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IMAU11823 and analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene cluster[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(4): 256–266.]