孙娅西, 王智浩, 刘莹莹, 等. 植物乳植杆菌 WCFS1 胞外多糖生物合成基因簇鉴定及其转录组差异表达基因功能研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(2): 180−190. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120277
SUN Yaxi, WANG Zhihao, LIU Yingying, et al. Identification of Exopolysaccharide Biosynthetic Gene Clusters and Functional Transcriptome Analysis of Differentially Expressed Genes in *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(2): 180−190. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120277

·生物工程·

# 植物乳植杆菌 WCFS1 胞外多糖生物合成基因簇鉴定及其转录组差异表达基因功能研究

孙娅西[1], 王智浩[1], 刘莹莹[1], 黄淑婷[1], 赵　芳[1], 吕广萍[1], 宦海琳[2,*], 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.江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏南京 210014）

**摘　要:** 目的：本研究针对植物乳植杆菌 WCFS1 菌株，研究其不同胞外多糖合成基因簇（*cps*）的构效关系，为进一步研究乳酸菌胞外多糖（Exopolysaccharides，EPS）的菌株特异性奠定基础。方法：利用 Cre-loxP 同源重组和 CRISPR/Cas9 技术构建 WCFS1 菌株的突变株 WCFS1Δ*cps1-3* 和 WCFS1Δ*cps4*；以野生菌为对照，研究不同突变株生长、合成 EPS 产量及单糖组成等理化特性；利用转录组学分析 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株在 3 种培养条件下差异表达基因功能。结果：WCFS1Δ*cps4* 突变株菌体合成 EPS 产量下降更多，降至野生型的 62.2%，菌体生长迟缓，到达稳定期的时间由 12 h 延迟至 32 h，但生物量不变；WCFS1Δ*cps1-3* 突变株合成 EPS 单糖组成变化较大，甘露糖的组分显著上升至 32.68%，半乳糖组分显著下降至 3.83%，而鼠李糖组分则未检出；相比野生菌，改变不同培养条件，WCFS1Δ*cps1-3* 突变株显著性差异表达的基因数目仅占 MRS 培养条件下的 5.1%（上调）和 6.8%（下调），GO 和 KEGG 分析显示功能也有较大变化。结论：WCFS1 菌株不同 *cps* 簇构效关系不同，基因序列高度保守的 *cps4* 簇可能通过调控合成 EPS 的产量以保证菌体正常生长，而 *cps1-3* 簇可能通过调控 EPS 的单糖组成使菌株在环境适应性方面更具优势。

**关键词:** 植物乳植杆菌 WCFS1, 胞外多糖（EPS）, *cps* 基因簇, 基因敲除, 转录组分析
**中图分类号:** Q71　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)02−0180−11
**DOI:** 10.13386/j.issn1002-0306.2024120277
本文网刊:

# Identification of Exopolysaccharide Biosynthetic Gene Clusters and Functional Transcriptome Analysis of Differentially Expressed Genes in *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1

**SUN Yaxi[1], WANG Zhihao[1], LIU Yingying[1], HUANG Shuting[1], ZHAO Fang[1], LÜ Guangping[1], HUAN Hailin[2,*], YANG Yao[1,*]**
（1.School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China;
2.Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nangjing 210014, China）

**Abstract:** Objective: This study focused on the *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1 strain to investigate the structure–function relationship of its exopolysaccharide (EPS) biosynthesis gene clusters (*cps*), thereby laying the foundation for further research into strain-specific characteristics of lactic acid bacteria EPS. Methods: Mutant strains

**收稿日期:** 2024−12−23
**基金项目:** 江苏省自然科学基金面上项目（BK20231280）; 江苏省农业科技自主创新基金 [CX(22)2019]。
**作者简介:** 孙娅西（1999−）, 女, 硕士, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 1374611387@qq.com。
*** 通信作者:** 宦海琳（1981−）, 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 畜禽饲料、生物技术, E-mail: huanhl@126.com。
杨瑶（1981−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 益生菌生物技术, E-mail: 45220@njnu.edu.cn。

WCFS1Δ*cps1-3* and WCFS1Δ*cps4* were constructed using Cre-loxP homologous recombination and CRISPR/Cas9 techniques. The growth characteristics, EPS yield, and monosaccharide composition of the mutant strains were analyzed using the wild-type strain as a control. Transcriptomic analysis was performed to examine the functional roles of differentially expressed genes in the WCFS1Δ*cps1-3* mutant under three distinct culture conditions. Results: The WCFS1Δ*cps4* mutant exhibited a greater reduction in EPS yield, dropping to 62.2% of the wild-type level. This was accompanied by slow growth, with the time to reach the stationary phase delayed from 12 h to 32 h. However, biomass remained unaffected. The monosaccharide composition of EPS showed significant changes in the WCFS1Δ*cps1-3* mutant, with mannose content increasing markedly to 32.68% and galactose content decreasing significantly to 3.83%, while rhamnose was undetectable. The number of significantly differentially expressed genes in the WCFS1Δ*cps1-3* mutant compared to that in the wild-type strain under varying culture conditions accounted for only 5.1% (upregulated) and 6.8% (downregulated) of those observed under MRS culture conditions, with GO and KEGG analyses revealing substantial functional differences. Conclusion: The structure–function relationships of the *cps* clusters in the WCFS1 strain varied. The highly conserved *cps4* cluster might regulate EPS yield to ensure normal bacterial growth. However, the *cps1-3* cluster likely modulated the monosaccharide composition of EPS, conferring greater environmental adaptability to the strain.

**Key words**: *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1; exopolysaccharides (EPS); *cps* cluster; gene knockout; transcriptome analysis

乳酸菌胞外多糖（Exopolysaccharides, EPS）是乳酸菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的多糖类化合物。研究表明乳酸菌 EPS 不仅可用于改善乳制品、烘焙食品、饮料等产品的质地和口感[1−3]，还具有多种有益功能，如调节肠道菌群[4−5]，激活动物免疫[5−6]，还有报道乳酸菌 EPS 具有抗氧化和抗肿瘤作用[7−9]。然而，乳酸菌 EPS 具有菌株特异性，即不同菌株 EPS 的结构和功能差异显著。因此，EPS 合成机制的研究是乳酸菌研究热点，是系统解析产 EPS 菌株的遗传多样性及其生物功能多样性的关键[10−12]。

乳酸菌 EPS 的生物合成较为复杂，编码 EPS 的基因往往成簇排列，因菌株不同，不同菌株基因组上通常含 1~4 个 EPS 合成基因簇（*cps* 簇）[13]，其中单一基因簇具有很高的结构相似性，大小为 15~20 kb，所含基因数不超过 30 个，由调控、决定多糖的链长、重复单位合成以及聚合与输出等 4 个区域构成[14−16]。不同乳酸菌 EPS 合成基因簇结构不同，如 Jiang 等[17] 和 Li 等[18] 将植物乳植杆菌 *cps* 簇结构归纳为四种主要类型，其中相同的是各菌株基因组上均具有一个保守的 *cps* 簇，大小为 14 kb，包含 *cps4A-J* 基因，相似性为 97%~99%，而其他 *cps* 簇的结构则具有菌株多样性，大多含 2~3 个 *cps* 簇，有的仅有一个 *cps* 簇，*cps* 簇序列相似性不高。可以预见，乳酸菌 *cps* 簇的多样性将影响乳酸菌 EPS 的产量、化学结构及生物学功能。

植物乳植杆菌 WCFS1 是一株重要的乳酸菌模式菌株，也是世界上首次完成基因组测序的菌株[19−22]。研究表明，WCFS1 菌株的 *cps* 簇较多，共有 4 个，其中 *cps1-cps3* 在基因组上串联排列，而高度保守的 *cps4* 簇则相隔较远[23−24]。基于该菌株较为清晰的 *cps* 簇结构，本文将开展其 *cps* 簇结构与功能关系研究，利用基因敲除技术构建不同Δ*cps* 突变株，以野生菌为对照，研究各突变株 EPS 的合成。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料与仪器

菌株和质粒　如表 1 所示；所使用的植物乳植杆菌株于 MRS 培养基或 SDM 培养基中培养，所添加的红霉素或氯霉素的终浓度均为10 μg/mL，培养温度 37 ℃；所使用的大肠杆菌于 LB 培养基中培养，所添加的红霉素（Ery）、氯霉素（Cm）的终浓度分别为 250、10 μg/mL，培养温度 37 ℃，含有 pHS02 及其衍生质粒的大肠杆菌培养温度为 30 ℃；引物　如表 2 所示，引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成；MRS 培养基、LB 培养基、细菌琼脂粉　中国北京陆桥技术股份有限公司；SDM 培养基　自配[25]，配方中 Bacto casitone购自美国 BD 公司；Ex Taq、DNA Marker、割胶回收试剂盒　宝生物工程（大连）有限公司；细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖（Agarose H）、4S Red 核酸染料　生工生物工程（上海）股份有限公司；胆盐　上海希格玛高技术有限公司；低聚半乳糖（Galactooligosaccharides, GOS 纯

表 1　菌株和质粒

Table 1　Strains and plasmids

| 菌株和质粒 | 描述 | 来源及参考文献 |
|---|---|---|
| 植物乳植杆菌 | | |
| WCFS1 | 模式菌株 | 荷兰NIZO研究所赠送[20] |
| WCFS1Δ*cps1-3* | 利用Cre-loxP法构建 | 本研究 |
| WCFS1Δ*cps4* | 利用CRISPR/Cas9方法构建 | 本研究 |
| 大肠杆菌 | | |
| DH10B | 克隆宿主 | 本实验室保藏[26] |
| 质粒 | | |
| pNZ5319 | 质粒载体 | 本实验室保藏[27] |
| pNZ5319Δ*Wcps1-3* | WCFS1菌株*cps1-3*敲除质粒 | 本研究 |
| pLH01 | 含有RecT基因序列 | 上海理工大学赠送[28] |
| pHS02 | 含有Cas9基因序列 | 上海理工大学赠送[28] |
| pSH02Δ*cps2* | YZH81菌株*cps2*敲除质粒 | 本实验室保藏[28] |
| pSH02Δ*Wcps4* | WCFS1菌株*cps4*敲除质粒 | 本研究 |

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

| 引物 | 5'~3' | 参考文献 |
|---|---|---|
| CPS1UP-F | ggagtatgttaatcaatttgccg | 本研究 |
| CPS1UP-R | agtctcaacgcccaacc | 本研究 |
| CPS3DOWN-F | gacccatttttaacg | 本研究 |
| CPS3DOWN-R | cttgcgtatctcatcatccgagc | 本研究 |
| CPS1UP-F2 | gaggcggctttgcgtggtaaac | 本研究 |
| CPS3DOWN-R2 | gcatgctaaagttaccttgttgcc | 本研究 |
| CmF | tcaaatacagcttttagaactgg | 本研究 |
| CmR | accatcaaaaattgtataaagtggc | 本研究 |
| lp2099-F | agatctatcatcaggacggc | [28] |
| lp2099-R | gtgcgaaaaccaatctagccg | [28] |
| lp2108-F | tattacttgctccattccacacg | [28] |
| lp2108-R | tgatgaagctgcatcgaccc | [28] |
| sgRNA-F | cccactagtctcaaaaaaagcac | [28] |
| sgRNA-R | tgctctagatgagatgctcgaacaaacgc gttttagagctagaaatagc | 本研究 |
| CPS4S-F2 | ccggtaatcacgacttga | [28] |
| CPS4X-R2 | ggcttttgaccactctcat | [28] |

度≥70%） 上海源叶生物科技有限公司；其他生化试剂 南京化学试剂有限公司。

Nano-300 微量分光光度计 杭州奥盛仪器有限公司；HE-90 型电泳仪、HE-120 水平电泳槽 上海天能科技有限公司；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。

## 1.2 实验方法

1.2.1 利用同源重组法构建 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株 构建 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株参考赵芳等[29]方法，作适当修改。以 WCFS1 菌株基因组 DNA 为模板，利用引物 CPS1UP-F/CPS1UP-R 和 CPS3DOWN-F/CPS3DOWN-R，分别扩增 WCFS1 菌株的 *cps1* 簇上游和 *cps3* 簇下游各 1 kb 左右的同源臂片段，扩增条件为：94 ℃ 预变性 5 min，94 ℃ 变性 30 s，退火 60 ℃ 45 s，72 ℃ 90 s，30 个循环，72 ℃ 延伸 10 min。上游同源臂用 XhoI 和 SwaI，下游同源臂用 SacI 和 BglII 分别酶切、回收处理，再与相同处理的载体 pNZ5319 连接，转化 DH10B 菌株，用带有红霉素和氯霉素抗性的 LB 培养基筛选出阳性克隆，提取质粒，经质粒酶切大小和测序鉴定，成功构建的敲除质粒命名为 pNZ5319Δ*Wcps1-3*。上述敲除质粒经电击转化到 WCFS1 的感受态细胞中，37 ℃ 孵育 16 h，涂布添加红霉素和氯霉素抗性的 MRS 培养基进行筛选。对双抗平板长出的阳性克隆先后使用 CPS1UP-F2/CmR、CmF/CPS3DOWN-R2 和 CPS1UP-F2/CPS3DOWN-R2 引物进行 PCR 验证，目的片段均为 1 kb，最终获得缺失 *cps1-3* 簇的 WCFS1 突变株，命名为 WCFS1Δ*cps1-3*。

1.2.2 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 WCFS1Δ*cps4* 突变株 构建 WCFS1Δ*cps4* 突变株参考 Huang 等[30]的实验方法，作适当修改。以 pSH02Δ*cps2*[28] 为模板，利用引物 lp2099-F/lp2108-R扩增 *cps4* 基因簇的上下游融合片段。以质粒 pSH02 为模板，利用引物 sgRNA-F/R 扩增 sgRNA 片段，长度约为 130 bp，扩增条件为：94 ℃ 预变性 5 min，94 ℃ 变性 30 s，退火 60 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，30 个循环，72 ℃ 延伸 10 min，扩增产物经胶回收试剂盒回收。利用 ClonExpress® Ultra One Step Cloning Kit将上下游融合片段连同 sgRNA 片段克隆至 pSH02 载体的 ApaI 和 XbaI 酶切位点，连接液转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞，涂布含 Ery 抗性的 LB 平板。平板长出的阳性克隆菌株经菌落 PCR 验证其插入序列，经测序插入片段正确的载体命名为 pSH02Δ*Wcps4*。将 pSH02Δ*Wcps4* 质粒电转化至含 pLH01的 WCFS1 感受态细胞 WCFS1::pLH01 中[29]，涂布含红霉素和氯霉素的 MRS 双抗性平板进行筛选。对阳性克隆使用 CPS4S-F2/CPS4X-R2 引物 PCR 验证，目的片段长度约 2 kb，经测序确认完整缺失 *cps4*基因簇的 WCFS1 突变株，命名为 WCFS1Δ*cps4*。

1.2.3 产 EPS 菌株生长曲线的绘制 生长曲线的测定参考张甜等[31]实验方法，并作适当修改。将 −80 ℃ 冰箱保藏的菌株 WCFS1、WCFS1Δ*cps1-3* 和 WCFS1Δ*cps4* 分别划线无抗性、Ery 和 Cm 双抗、Ery 和 Cm 双抗的 MRS 平板，挑取单菌落至上述相应抗性 MRS 培养基得到单菌种子液，将单菌种子液按照 1% 转接到 MRS 液体培养基中培养，混匀之后，在比色皿中加入 1 mL 菌液测定其 $OD_{600\ nm}$ 值，作为初始零时间点值，接着每 2 h 测定一下 $OD_{600\ nm}$ 值，每 4 h 测定一下发酵液的 pH，到第 36 h 结束实验。以时间为横坐标，$OD_{600\ nm}$ 数值和发酵液 pH 为纵坐标绘制菌株生长曲线。

1.2.4 粗 EPS 的提取及产量测定 EPS 的提取参照 CERNING 等[32]和赖田甜等[33]实验方法。WCFS1、WCFS1Δ*cps1-3* 和 WCFS1Δ*cps4* 经平板活化，将单菌种子液按照 1% 转接到 100 mL MRS 液体培养基培养，在 37 ℃ 条件下培养 32 h。在 10000×g，4 ℃ 条件下，离心 15 min，吸取上清液。在得到的上清液中加入 80% 三氯乙酸，使其终浓度为 4%(w/v)，4 ℃ 冰箱中放置 8 h。在 10000×g，4 ℃ 条件下，离心 15 min 后，得到上清以除去蛋白质。接着在上清中加入其 3 倍体积的冷乙醇，在 4 ℃ 冰箱中过夜。10000×g，4 ℃，离心 20 min 后，弃上清，用适当体积去离子水溶解沉淀，在 4 ℃ 条件下透析 48 h 后，冻干，获得粗 EPS 样品。利用苯酚-硫酸法测定粗 EPS 的质量浓度[33]。

1.2.5 粗 EPS 单糖组成分析 EPS 的单糖组成分析参考王慧阳等[34]的实验方法，并作适当改动。称取菌株粗多糖样品各 4 mg 于样品瓶中，各加入适量现配的 2 mol/L 三氟乙酸(Trifluoroacetic acid，TFA)溶液，于 85 ℃ 中水浴水解 3 h。同时分别称取 4 mg

核糖（Rib）、木糖（Xyl）、阿拉伯糖（Ara）、岩藻糖（Fuc）、鼠李糖（Rha）、甘露糖（Man）、葡萄糖（Glc）和半乳糖（Gal）标准品，分别加入 1 mL 吡啶和 10 mg 盐酸羟胺，涡旋混匀，于 80 ℃ 水浴 2 h，反应结束后冷却至室温，加入 1 mL 乙酸酐，于 80 ℃ 水浴 2 h。反应结束后，冷却至室温，吹干后，复溶于 1 mL 甲醇中，一分为二，根据上述单糖衍生物制备的方法分别做酮糖和醛糖衍生物。最终反应物经吹干后复溶，经 0.22 μm 滤膜过滤后 GC-MS 分析。

GC-MS 的工作条件：色谱柱为 HP-5 毛细管柱（30 mm×0.25 mm, 0.25 μm）；载气为氦气；气体流速为 1 mL/min；进样量为 2 μL；分流比为 1∶20；程序升温：柱初始温度 160 ℃，以 6 ℃/min 升至 200 ℃，保持 6 min；汽化室温度为 250 ℃；检测器温度为 240 ℃。

1.2.6　转录组测序样品的制备　转录组测序样品为以下 6 个实验组：A1，WCFS1Δ*cps1-3* 在 MRS 培养基（碳源为葡萄糖，含量 2%）中生长；A2，WCFS1 在 MRS 培养基中生长；A3，WCFS1Δ*cps1-3* 在以 2% 低聚半乳糖（GOS）替代了葡萄糖的 MRS 培养基中生长；A4，WCFS1 在以 2% 低聚半乳糖（GOS）替代了葡萄糖的 MRS 培养基中生长；A5，WCFS1Δ*cps1-3* 在含有 0.07%（W/V）胆盐的 MRS 培养基中生长；A6，WCFS1 在含有 0.07%（W/V）胆盐的 MRS 培养基中生长；每组培养温度均为 37 ℃，培养 32 h，每组 3 个平行。

1.2.7　转录组测序　转录组测序样品送生工生物工程（上海）股份有限公司 Illumina 平台测序；选择 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ 和 $P \leq 0.05$ 作为筛选差异显著基因（DEGs）的标准；GO 分析使用数据库（https://geneontology.org/），KEGG 分析使用 KEGG 数据库（hyyp://www.kegg.jp）；火山图绘制使用SangerBox 工具。

### 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。使用 Microsoft Excel 2021 进行统计分析，实验作图采用软件 Graphpad Prime 8.0 和软件 Snapgene 绘制。

## 2　结果

### 2.1　利用同源重组法构建 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株

敲除质粒 pNZ5319Δ*cps1-3*（图 1A）经电转化 WCFS1 感受态细胞，抗性平板上长出了 15~20 个单菌落，图 1B 是 PCR 的验证示意图，图 1C 是 4 个单菌落的 PCR 鉴定结果，只有菌落 4 的 PCR 结果显示利用 CPS1UP-F2/CmR 和 CmF/CPS3DOWN-R2 两对引物均扩增出相应的 *cps1-3* 基因簇左右侧序列与插入的氯霉素抗性基因左右侧序列，各长约 1 kb 的目的片段（泳道 7 和 8），进而将利用 CPS1UP-F2/CPS3DOWN-R2 引物扩增出的目标 2 kb 片段（泳道 9）测序，结果显示，*cps1-3* 簇片段完整缺失，将该突变株命名为 WCFS1Δ*cps1-3*。

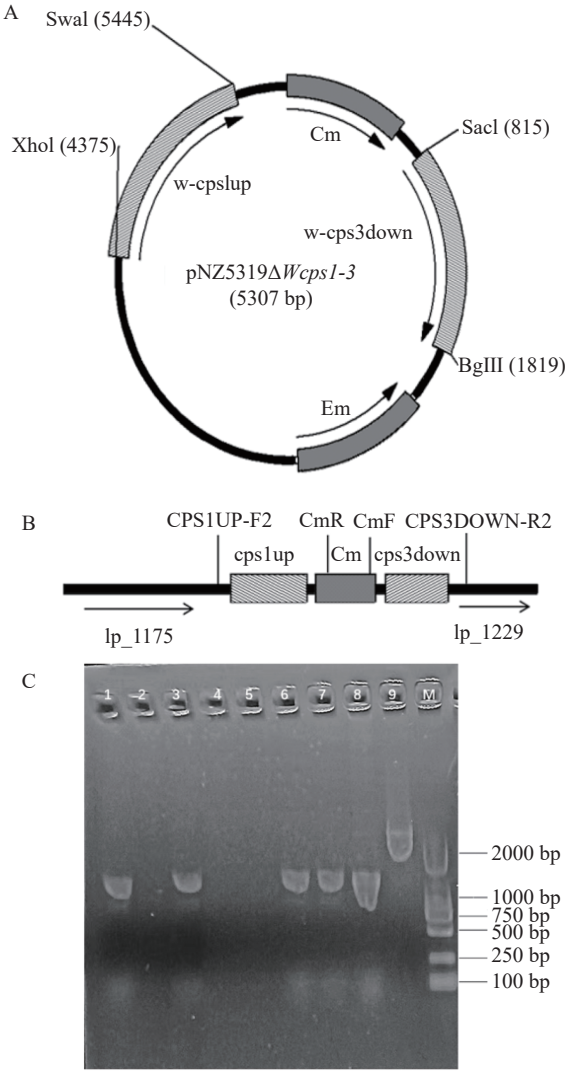



图 1　WCFS1Δ*cps1-3* 突变株的构建及 PCR 结果

Fig.1　Results of WCFS1Δ*cps1-3* mutant strain construction protocol and PCR validation

注：A. 敲除质粒 pNZ5319Δ*cps1-3* 图谱；B. *cps1-3* 突变株 PCR 验证示意图；C. 泳道 1~8 依次是对 4 个不同阳性克隆分别使用引物 CPS1UP-F2/CmR、CmF/CPS3DOWN-R2 的 PCR 成对验证结果；泳道 9 是使用 CPS1UP-F2/CPS3DOWN-R2 引物 PCR 扩增结果；DL2000 Marker：2000、1000、750、500、250、100 bp。

### 2.2　利用 CRISPR/Cas9 技术构建 WCFS1Δ*cps4* 突变株

敲除质粒 pSH02Δ*Wcps4*（图 2A）电转化至含 pLH01 的 WCFS1 感受态细胞 WCFS1::pLH01 中，含红霉素和氯霉素的 MRS 双抗性平板上长出了 5个单菌落，对上述阳性克隆使用 CPS4S-F2/CPS4S-R2 引物 PCR 验证（图 2B），将扩增到目标 2 kb 左右片段的测序比对，最终获得完整缺失 *cps4* 簇的 WCFS1 突变株 WCFS1Δ*cps4*（图 2C）。

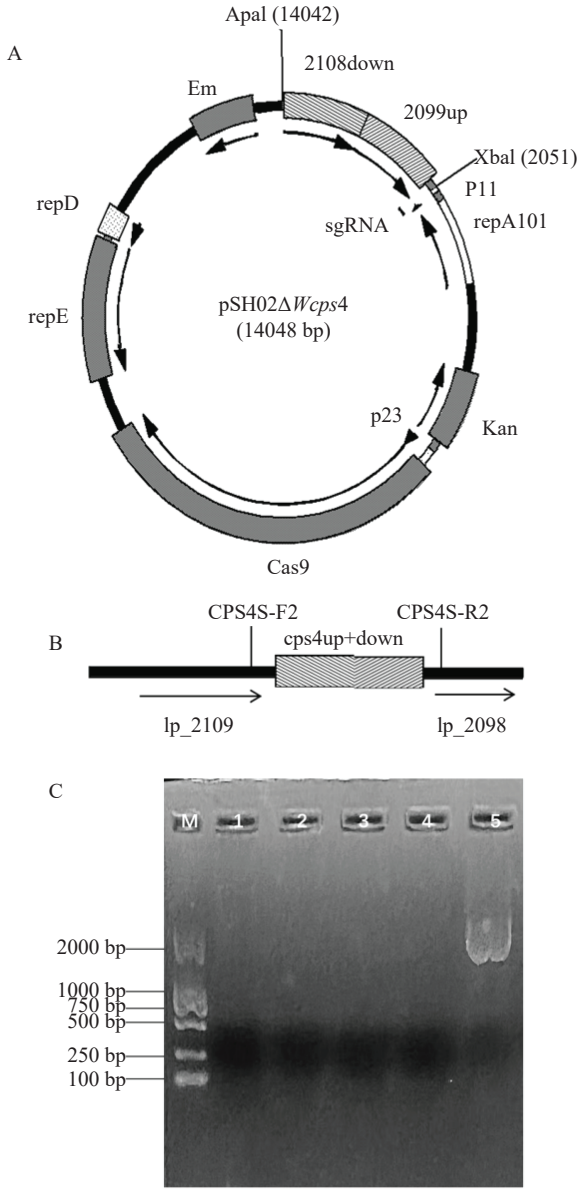



图 2 WCFS1Δ*cps4* 突变株构建方案及 PCR 验证结果

Fig.2 Results of WCFS1Δ*cps4* mutant strain construction scheme and PCR verification

注: A. 敲除质粒 pSH02Δ*Wcps4* 图谱; B. PCR 验证敲除突变株原理示意图; C. 泳道 1~5 是使用 CPS4S-F2/CPS4S-R2 引物依次对 5 个阳性克隆 PCR 验证结果; DL2000 Marker: 2000、1000、750、500、250、100 bp。

## 2.3 生长曲线的测定

根据方法 1.2.3, 绘制 WCFS1、WCFS1Δ*cps1-3* 和 WCFS1Δ*cps4* 菌株生长曲线, 见图 3。从 $OD_{600\ nm}$ 数值来看, 相比 WCFS1, WCFS1Δ*cps1-3* 和 WCFS1Δ*cps4* 菌株的生长呈明显的延缓趋势, 达到稳定期的时间 WCFS1 为 12 h, WCFS1Δ*cps1-3*为 22 h, 而 WCFS1Δ*cps4* 在 32 h 才到达稳定期, 不过三个菌株生长量未见显著差别, $OD_{600\ nm}$ 始终稳定在 6.0 左右。发酵液 pH 下降是乳酸菌生长产酸的结果, 可侧面反映菌体生长情况。从 pH 测定值来看, 三个菌株发酵液 pH 下降趋势与 $OD_{600\ nm}$ 的变化相对应, WCFS1 发酵液 pH 下降最快, WCFS1Δ*cps1-3* 次之, WCFS1Δ*cps4* 最为缓慢。以上结果说明了Δ*cps1-3* 和Δ*cps4* 簇突变均使得菌株生长变缓, 其中Δ*cps4* 突变对菌株生长速率的影响更大, 但对菌体生长量影响不大。

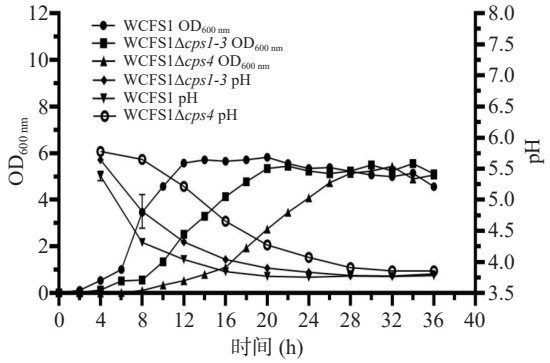



图 3 WCFS1 及 WCFS1Δ*cps4* 的生长曲线及 pH 的测定结果

Fig.3 Results of growth curves and pH measurements for WCFS1 and WCFS1Δ*cps4*

## 2.4 EPS 的产量及单糖组成

WCFS1、WCFS1Δ*cps1-3* 和 WCFS1Δ*cps4* 菌株粗多糖产量见图 4。对比 WCFS1 的 EPS 产量 48.20±0.84 mg/L, WCFS1Δ*cps1-3* 和 WCFS1Δ*cps4* 的 EPS 产量分别下降为野生型的 78.4%(37.80±1.15 mg/L)和 62.2%( 30±0.99 mg/L), 该结果说明Δ*cps4* 簇对 WCFS1 菌株 EPS 产量的影响更大。

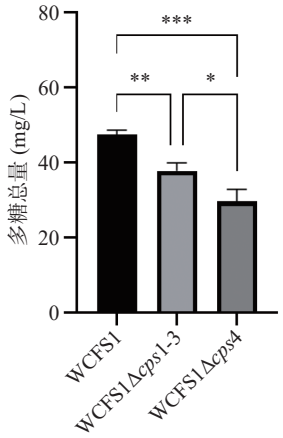



图 4 粗 EPS 的产量

Fig.4 Yields of crude EPS

注: *$P$<0.05, **$P$<0.01, ***$P$<0.001。

对各菌株粗 EPS 单糖组成测定结果见表 3。WCFS1 的 EPS 单糖组成含量从高到低依次为葡萄糖(Glc, 59.44%)、甘露糖(Man, 23.19%)、半乳糖(Gal, 16.31%)和鼠李糖(Rha, 1.04%)。WCFS1Δ*cps1-3* 的 EPS 单糖组成与野生型 WCFS1 差异较大, 甘露糖(32.68%)的组分含量显著上升, 半乳糖组分显著下降至仅占 3.83%, 而鼠李糖组分则未检出; WCFS1Δ*cps4* 的 EPS 单糖组成变化较小, 各单糖组分及占比与野生型 WCFS1 无显著差异。

表 3　粗 EPS 样品的单糖组成

Table 3　Monosaccharide composition analysis of crude EPS

| 单糖组分 | 菌株名称 | | |
|---|---|---|---|
| | WCFS1 | WCFS1Δ*cps1-3* | WCFS1Δ*cps4* |
| 鼠李糖(%) | 1.04±1.75 | – | 4.10±0.91 |
| 甘露糖(%) | 23.19±4.05$^{b}$ | 32.68±1.04$^{a}$ | 27.25±0.73$^{b}$ |
| 葡萄糖(%) | 59.44±2.13$^{ab}$ | 63.42±3.29$^{a}$ | 47.58±11.22$^{b}$ |
| 半乳糖(%) | 16.31±4.08$^{a}$ | 3.83±0.90$^{b}$ | 21.08±1.77$^{a}$ |

注：“–”表明该成分未检出；同一行不同小写字母表示差异显著，$P$<0.05。

## 2.5　转录组学分析 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因

2.5.1　测序数据质量评估　将 6 个试验组处理后的菌体样本进行转录组学测序分析，测得序列经质控后每个样本序列总数(Clean reads)均大于 1.5×10$^{7}$ 条，原始数据 19.1 Gb，平均每个样品总碱基数为 3.18 Gb，碱基质量≥20(Q20 Base Ratio，Q20)和 Q30 的比例分别为 98.59%~98.78% 和 94.92%~95.44%，GC 含量范围为 45.70%~46.18%，原始处理数据(Clean bases)占总数据量的比例达到 96.88% 以上。数据评估结果表明过滤后所获得的序列质量较好，可靠性高，所选参考基因组能够满足后续分析的需求。

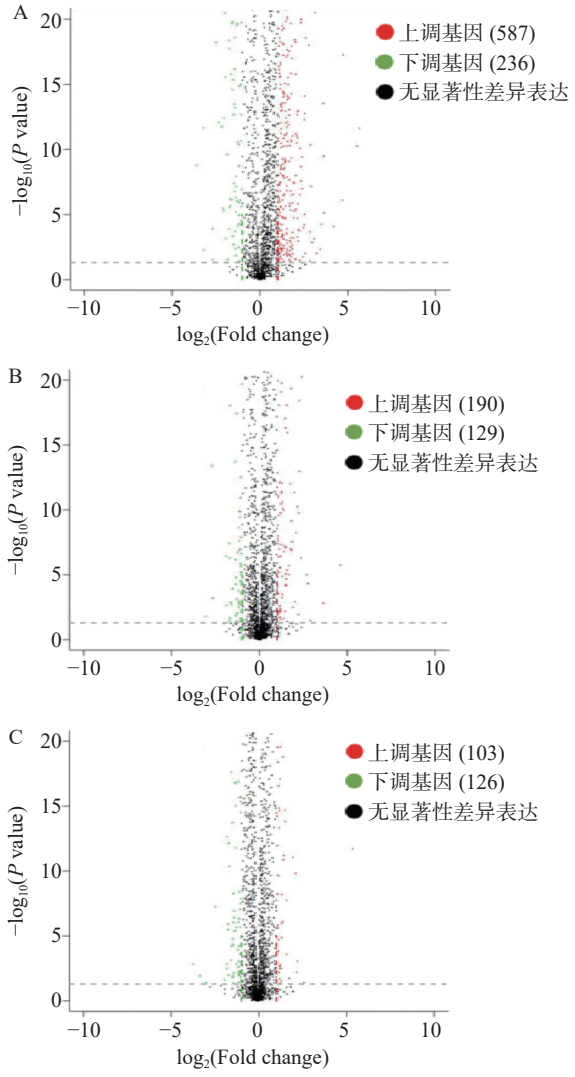



图 5　差异表达基因火山图

Fig.5　Volcano map of differential genes

注：A 为在碳源为 2% 葡萄糖(GLU)的 MRS 培养条件下；B 为在碳源为 2% GOS 的 MRS 培养条件下；C 为在添加了 0.07% 胆盐的 MRS 培养条件下。

2.5.2　相同培养条件下 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因数量分析　如图 5 所示，对比 WCFS1 和 WCFS1Δ*cps1-3* 菌株转录组分析，在同是 MRS 培养基培养条件下，总共检测到 3058 个差异表达基因，其中 2235 个有差异但不显著，823 个有显著性差异，显著上调 587 个，显著下调 236 个(图 5A)；在同是由 GOS 替代 MRS 培养基中葡萄糖的培养条件下，总共检测到 3058 个差异表达基因，其中 2739 个有差异但不显著，319 个有显著性，显著上调 190 个，显著下调 129 个(图 5B)；在同是含 0.07% 胆盐的 MRS 培养基培养条件下，总共检测到 3058 个差异表达基因，其中 2829 个有差异但不显著，229 个有显著性，显著上调 103 个，显著下调 126 个(图 5C)。

2.5.3　不同培养条件下 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因数量分析　如图 6 所示，对比 WCFS1 和 WCFS1Δ*cps1-3* 菌株转录组分析，在三种不同培养条件下均出现的具有显著性差异表达的基因共有 46 个，其中显著上调 30 个(图 6A)，显著下调 16 个(图 6B)，表 4 列出具体的差异表达基因信息。值得注意的是，在三种不同培养条件下均出现的共有显著差异表达的基因数目仅占 MRS 培养条件下差异表达基因数目的 5.1%(上调)和 6.8%(下调)，该结果显示 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因数量在不同培养条件下相差较大，说明了 *cps1-3* 簇编码基因可能在菌株环境适应性方面发挥重要作用。

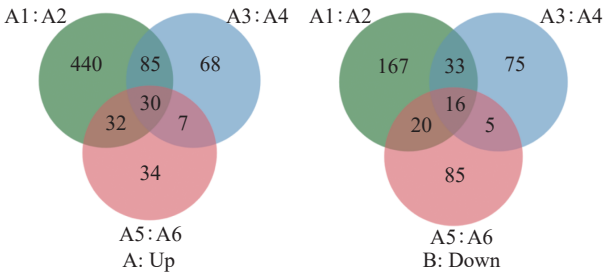



图 6　差异表达基因韦恩图

Fig.6　Venn map of differential genes

注：A：显著上调基因；B：显著下调基因；A1:A2 指在同是 MRS 培养基培养条件下；A3:A4 指在同是由 2% GOS 替代 MRS 培养基中葡萄糖的培养条件下；A5:A6 指在同是含 0.07% 胆盐的 MRS 培养基培养条件下。

表 4 结果显示，上调较大的表达基因有辅助基因调节蛋白 A(Accessory gene regulator protein A)、与乳球菌素的加工和转运过程相关的 ATP 结合蛋白(Lactococcin-G-processing and transport ATP-binding protein LagD)、乳球菌素 A 分泌相关蛋白(Lactococcin A secretion protein LcnD)，这些基因根

表 4 三种培养条件下 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株共有差异表达基因

Table 4 Genes with differential expression in the three culture conditions of WCFS1Δ*cps1-3* mutant strains

| 序号 | 基因 ID | 基因描述 | $log_2FC$ | *P*-Value |
|---|---|---|---|---|
| 1 | PROKKA_00875 | hypothetical protein | 16.22 | $8.82\times10^{-5}$ |
| 2 | PROKKA_00882 | Accessory gene regulator protein A | 6.00 | 0 |
| 3 | PROKKA_00878 | Lactococcin-G-processing and transport ATP-binding protein LagD | 5.72 | 0 |
| 4 | PROKKA_00877 | Lactococcin A secretion protein LcnD | 5.41 | 0 |
| 5 | PROKKA_00876 | CAAX amino terminal protease self-immunity | 4.42 | $4.66\times10^{-189}$ |
| 6 | PROKKA_00880 | hypothetical protein | 4.36 | $3.18\times10^{-41}$ |
| 7 | PROKKA_00885 | hypothetical protein | 4.11 | $2.76\times10^{-62}$ |
| 8 | PROKKA_00879 | hypothetical protein | 3.72 | $4.68\times10^{-45}$ |
| 9 | PROKKA_00874 | CAAX amino terminal protease self- immunity | 3.48 | $6\times10^{-63}$ |
| 10 | PROKKA_00881 | CAAX amino terminal protease self- immunity | 3.2 | $7\times10^{-27}$ |
| 11 | PROKKA_02517 | putative transglycosylase IsaA precursor | 2.90 | $1.97\times10^{-169}$ |
| 12 | PROKKA_00873 | CAAX amino terminal protease self- immunity | 2.84 | $3\times10^{-30}$ |
| 13 | PROKKA_02553 | hypothetical protein | 2.69 | $4.08\times10^{-6}$ |
| 14 | PROKKA_00628 | Multidrug resistance protein 3 | 2.43 | $1.96\times10^{-66}$ |
| 15 | PROKKA_02480 | ABC transporter ATP-binding protein YxdL | 2.42 | $1.15\times10^{-21}$ |
| 16 | PROKKA_02733 | hypothetical protein | 2.39 | $1.73\times10^{-7}$ |
| 17 | PROKKA_02343 | putative acyltransferase | 2.27 | $2.35\times10^{-22}$ |
| 18 | PROKKA_02732 | UDP-Gal:alpha-D-GlcNAc-diphosphoundecaprenol beta-1,3-galactosyltransferase | 2.19 | $1.69\times10^{-11}$ |
| 19 | PROKKA_03107 | hypothetical protein | 2.15 | $2.18\times10^{-280}$ |
| 20 | PROKKA_00872 | CAAX amino terminal protease self- immunity | 2.13 | $7\times10^{-27}$ |
| 21 | PROKKA_03109 | Enterocin A Immunity | 1.88 | $1.70\times10^{-154}$ |
| 22 | PROKKA_02486 | hypothetical protein | 1.86 | $3.92\times10^{-23}$ |
| 23 | PROKKA_02485 | hypothetical protein | 1.84 | $4.52\times10^{-8}$ |
| 24 | PROKKA_01035 | putative ABC transporter ATP-binding protein YheS | 1.77 | $2\times10^{-137}$ |
| 25 | PROKKA_00129 | hypothetical protein | 1.77 | $2.65\times10^{-13}$ |
| 26 | PROKKA_02736 | UDP-N-acetylgalactosamine-undecaprenyl-phosphate N-acetylgalactosaminephosphotransferase | 1.52 | $3\times10^{-6}$ |
| 27 | PROKKA_00871 | Toxin HigB-1 | 1.24 | $2\times10^{-8}$ |
| 28 | PROKKA_01293 | Bacitracin export ATP-binding protein BceA | 1.22 | $1\times10^{-7}$ |
| 29 | PROKKA_01591 | hypothetical protein | 1.16 | $1.36\times10^{-109}$ |
| 30 | PROKKA_00019 | hypothetical protein | 1.08 | $3.22\times10^{-9}$ |
| 31 | PROKKA_00189 | 5-aminovalerate aminotransferase DavT | -1.09 | $3.77\times10^{-8}$ |
| 32 | PROKKA_01318 | Uric acid permease PucK | -1.10 | $2.89\times10^{-25}$ |
| 33 | PROKKA_00169 | Methionine import ATP-binding protein MetN | -1.19 | $7.96\times10^{-5}$ |
| 34 | PROKKA_00536 | 60 kDa chaperonin | -1.30 | 0 |
| 35 | PROKKA_02969 | EamA-like transporter family protein | -1.41 | $5.63\times10^{-143}$ |
| 36 | PROKKA_02045 | Oligopeptide transport ATP-binding protein OppF | -1.59 | $4.20\times10^{-258}$ |
| 37 | PROKKA_02369 | Glycine betaine transporter BetL | -1.59 | $1.13\times10^{-294}$ |
| 38 | PROKKA_01578 | Aspartokinase 3 | -1.63 | $5.26\times10^{-102}$ |
| 39 | PROKKA_02043 | Dipeptide transport system permease protein DppC | -1.68 | 0 |
| 40 | PROKKA_02044 | Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD | -1.70 | 0 |
| 41 | PROKKA_01674 | putative amino acid permease YhdG | -1.70 | 0 |
| 42 | PROKKA_02041 | Dipeptide-binding protein DppE precursor | -1.72 | 0 |
| 43 | PROKKA_01450 | Methionine gamma-lyase | -1.72 | $1.25\times10^{-102}$ |
| 44 | PROKKA_02042 | Oligopeptide transport system permease protein OppB | -1.78 | $1\times10^{-246}$ |
| 45 | PROKKA_01509 | Branched-chain-amino-acid aminotransferase | -2.02 | $2.95\times10^{-109}$ |
| 46 | PROKKA_01224 | Oligopeptide-binding protein OppA precursor | -2.29 | $1.01\times10^{-55}$ |

据 NCBI 注释(NCBI BlastP)分别与群体感应信号调控功能、乳球菌素的加工和转运过程、细菌素分泌功能有关。下调最大的表达基因是寡肽结合蛋白 oppa 前体(Oligopeptide-binding protein OppA precursor),其主要功能与寡肽的识别和转运有关;支链氨基酸转氨酶(Branched-chain-amino-acid aminotransferase),主要与支链氨基酸代谢调控功能有关;寡肽转运系统透膜蛋白 OppB(Oligopeptide transport system permease protein OppB),主要功能是与 OppA 蛋白协同作用,OppB 作为透膜蛋白,嵌入细胞膜中,形成通道或协助构象变化,使寡肽能够穿过细胞膜;蛋氨酸 γ-裂解酶(Methionine gamma-lyase),主要与蛋氨酸分解代谢有关。

2.5.4 不同培养条件下 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因 GO 功能分析 利用 GO(Gene Ontology)分析与野生型 WCFS1 菌株相比,WCFS1Δ*cps1-3* 突变株在不同培养条件下差异表达基因的功能,见图 7。在碳源为 2% 葡萄糖(GLU)的 MRS 培养条

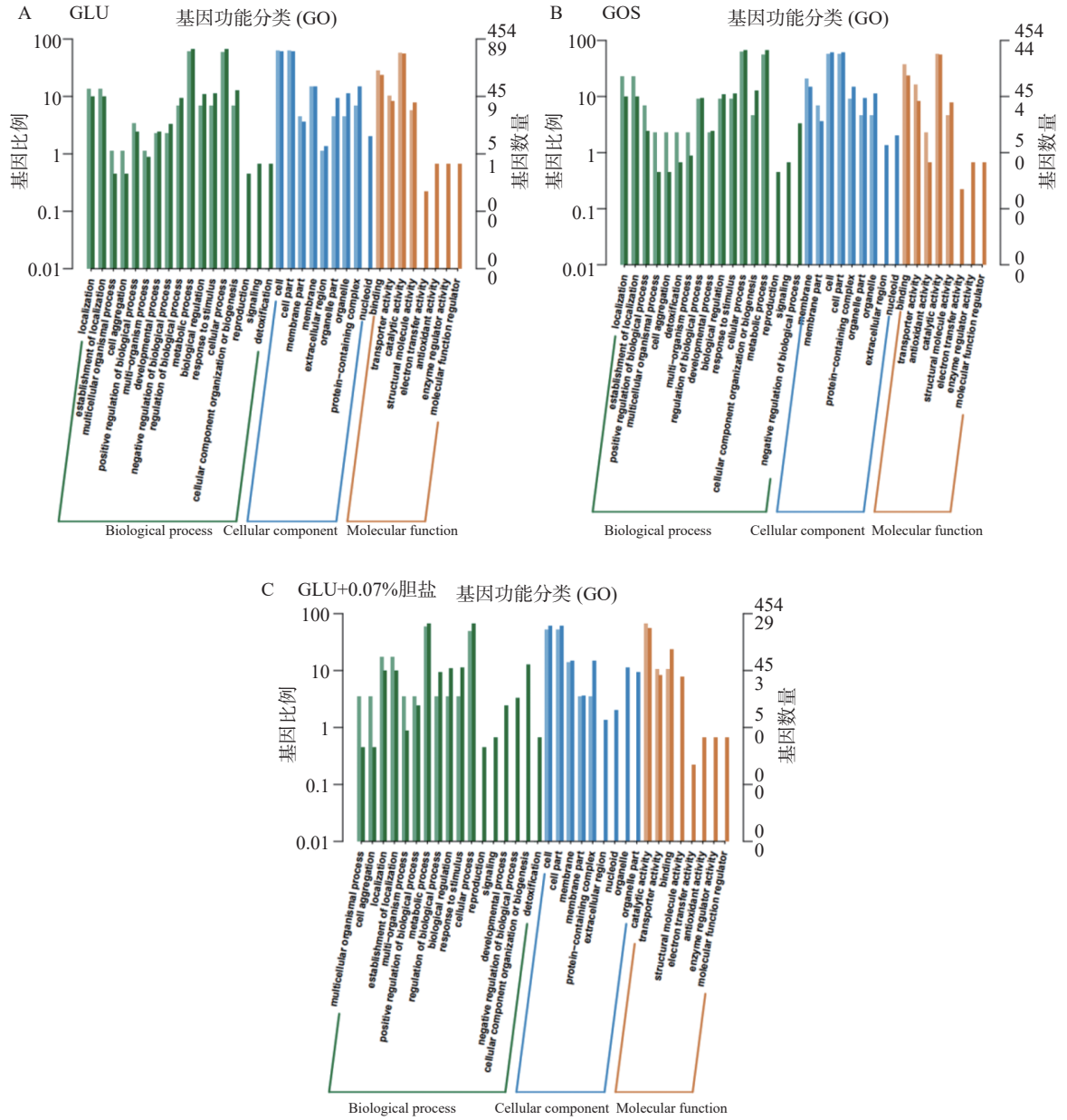



图 7　不同培养条件下 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因 GO 功能富集分析

Fig.7　GO enrichment analysis of differential expressed genes of WCFS1Δ*cps1-3* mutant strains under different culture conditions

注：横轴为功能分类，纵轴为该分类内基因个数（右）及其占被注释上基因总数的百分比（左）。不同颜色代表不同的分类，其中深色代表该分类下的所有基因，基因数量对应右侧纵轴的深色数值，浅色代表该分类下的差异基因，基因数量对应右侧纵轴的浅色数值；A 为在碳源为 2% 葡萄糖（GLU）的 MRS 培养条件下；B 为在碳源为 2% GOS 的 MRS 培养条件下；C 为在添加了 0.07% 胆盐的 MRS 培养条件下。

件下，WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因的功能主要在代谢过程（metabolic process）、细胞（cell）、催化活性（catalytic activity）等 34 个二级类别（图 7A）；在碳源为 2% GOS 的 MRS 培养条件下，差异表达基因功能增加了脱毒通路（detoxification）、抗氧化活性（antioxidant activity）2 个类别，而减少了负向调节生物过程（negative regulation of biological process）、细胞外区域（extracellular region）2 个类别（图 7B）；为了模拟肠道环境，向 MRS 中添加 0.07% 胆盐，*cps1-3* 簇的缺失引起的差异表达基因的功能增加了脱毒通路（detoxification）、抗氧化活性（antioxidant activity）2 个类别，而减少了负向调节生物过程、发展过程（developmental process）、细胞组成、组织或生物发生（cellular component organization or biogenesis）、细胞外区域、细胞器（organelle）、细胞器部分（organelle part）、结构分子活性（structural molecule activity）8 个类别（图 7C）。可见，在不同培养条件下，WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因在细胞中的功能随环境条件变化而变化。

2.5.5　不同培养条件下 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因 KEGG 功能分析　利用 KEGG（Kyoto encyclopedia of genes and genomes）分析与野生型 WCFS1 菌株相比，WCFS1Δ*cps1-3* 突变株在不同培养条件下差异表达基因的功能，见图 8。在碳源为

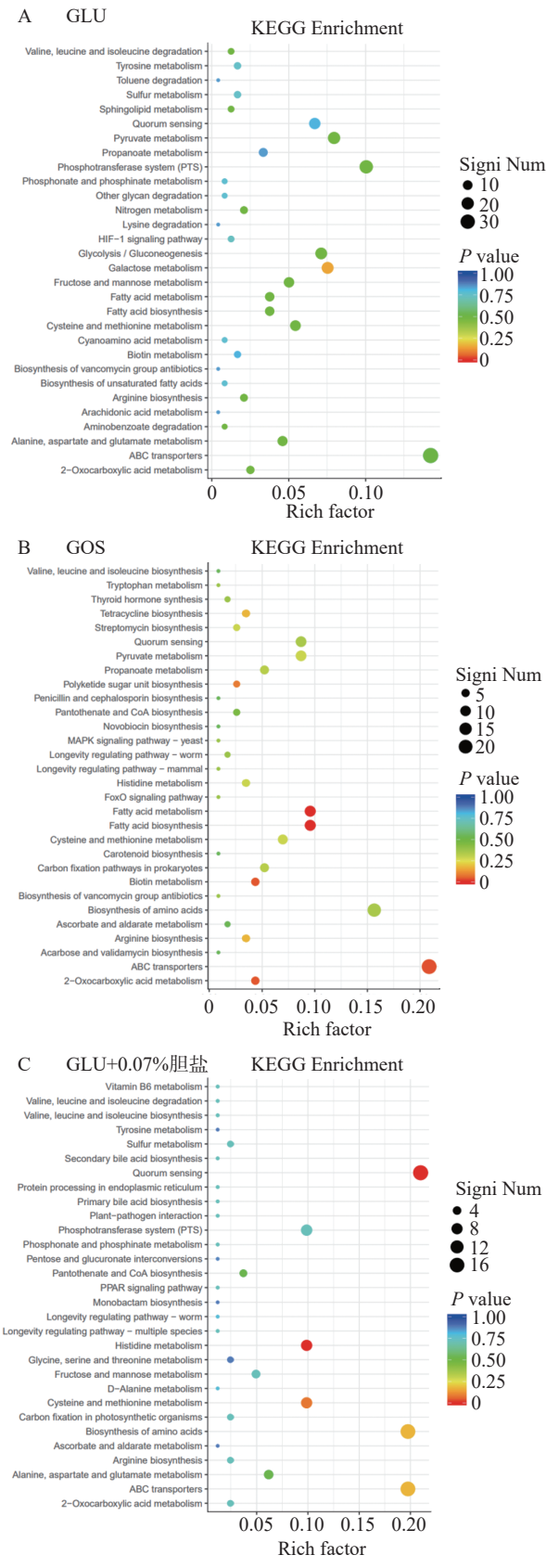



图 8　不同培养条件下 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因 KEGG 功能富集分析

Fig.8　KEGG enrichment analysis of differential expressed genes of WCFS1Δ*cps1-3* mutant strains under different culture conditions

注：A 为在碳源为 2% 葡萄糖（GLU）的 MRS 培养条件下；B 为在碳源为 2% GOS 的 MRS 培养条件下；C 为在添加了 0.07% 胆盐的 MRS 培养条件下。

2% 葡萄糖（GLU）的 MRS 培养条件下，WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因集中在 ABC 转运蛋白（ABC transporters）、磷酸转移酶系统（Phosphotransferase system, PTS）和半乳糖代谢（Galactose metabolism）、丙酮酸盐代谢（Pyruvate metabolism）和糖酵解/糖异生（Glycolysis / Gluconeogenesis）等代谢途径（图 8A）；在碳源为 2% GOS 的 MRS 培养条件下，WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因参与的代谢途径主要有 ABC 转运蛋白、氨基酸生物合成（Biosynthesis of amino acids）、脂肪酸代谢（Fatty acid metabolism）、脂肪酸生物合成（Fatty acid biosynthesis）、丙酮酸盐代谢等途径（图 8B）；在向 MRS 中添加 0.07% 胆盐的培养条件下，WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因参与的代谢途径主要有群体感应（Quorum sensing）、氨基酸的生物合成、ABC 转运蛋白、组氨酸代谢（Histidine metabolism）和半胱氨酸和蛋氨酸代谢（Cysteine and methionine metabolism）等途径（图 8C）。可见，在不同培养条件下，WCFS1Δ*cps1-3* 突变株差异表达基因集中在不同的代谢和信号传导途径中，承担不同的功能。

## 3　讨论与结论

胞外多糖 EPS 是乳酸菌重要的次生代谢产物，不仅是微生物适应复杂环境的关键生理物质，更是一类具有重要开发价值的生物活性资源，在食品加工、生物医药及农业科技等领域展现出广阔的应用前景[2−4,10]。目前，植物乳植杆菌是报道较多的高产 EPS 的乳酸菌菌种[35]，但不同菌株合成的 EPS 结构和功能差异显著。*cps* 基因簇是植物乳植杆菌编码合成 EPS 的基因序列，通常一个菌株含多个 *cps* 簇。本研究选取一株重要的植物乳植杆菌模式菌株 WCFS1 为研究对象，研究其不同 *cps* 簇的构效关系，为进一步研究具有菌株特异性的 EPS 生物学功能奠定基础。

细菌基因敲除是研究基因功能的有效手段[36−37]，具体有同源重组、CRISPR/Cas9 基因编辑和转座子插入突变等多种方法。为了构建 WCFS1 菌株的突变株 WCFS1Δ*cps1-3* 和突变株 WCFS1Δ*cps4*，本研究首先选择了 Cre-loxP 同源重组法[38]，但实验最终只成功获得了 WCFS1Δ*cps1-3* 突变株（阳性克隆筛选成功率为 2/15, 13.3%），未获得 WCFS1Δ*cps4* 突变株。随后，采用 CRISPR/Cas9 技术，基于 pSH02 质粒构建了 pSH02Δ*Wcps4* 质粒，在转化含 Rec T 基因的 pLH01 质粒辅助作用下，最终成功筛选获得了 WCFS1Δ*cps4* 突变株（阳性克隆筛选成功率为 1/5, 20%）。就本实验而言，相比之下 CRISPR/Cas9 法更具优势[39−42]。

WCFS1 菌株基因组共有 4 个 *cps* 簇，其中 *cps1-cps3* 在基因组上串联排列，虽然 *cps2* 和 *cps3* 与其他一些植物乳植杆菌的 *cps* 簇具有相似性[20,22]，但 *cps1* 的结构特殊，与其它菌株未见同源性。距离

*cps1-3* 簇较远的 *cps4* 簇，其基因排列和序列与其他植物乳植杆菌具有高度的序列保守性，相似性高达 97~99%[17]。本研究结果显示不同Δ*cps* 簇突变株合成 EPS 结果不同，基因序列保守的 *cps4* 簇缺失后菌体合成 EPS 产量下降更多，且对菌体生长的影响也较大，到达稳定期的时间由 12 h 延迟至 32 h，但生物量不变；基因序列同源性低的 *cps1-3* 簇缺失后，菌株合成 EPS 单糖组成的变化较大，其中甘露糖的组分显著上升至 32.68%，半乳糖组分显著下降至 3.83%，而鼠李糖组分则未检出。综合上述结果，推测 WCFS1 菌株的 *cps1-3* 簇可能通过调控合成 EPS 的单糖组成，进而改变其 EPS 的化学特性和生物学功能，在菌株适应环境等方面发挥作用，也因此表现出基因水平的多样性，而 *cps4* 簇可能通过调控合成 EPS 的产量以保证菌体正常生长，也因此在基因结构具有高度保守性。

为了进一步探究 *cps1-3* 簇与菌株环境适应性的相关性，本研究对比分析了 WCFS1 和 WCFS1Δ*cps1-3* 菌株在三种不同培养条件下的转录组表达情况，结果表明在不同培养条件下 *cps1-3* 簇缺失引起的与野生型具有显著性差异表达的基因数目仅占 MRS 培养条件下的 5.1%（上调）和 6.8%（下调），GO 和 KEGG 功能分析也显示了不同培养条件下因 *cps1-3* 簇缺失引起的与野生型具有显著性差异表达的基因功能均相差较大，说明了 *cps1-3* 簇编码基因可能在菌株环境适应性方面发挥的重要作用。

综上所述，本文是对植物乳植杆菌 EPS 生物合成基因簇（*cps*）构效关系的初步探索，从基因结构、合成 EPS 的产量及单糖组成、转录水平差异基因等方面说明不同 *cps* 簇编码基因在菌体生长、EPS 合成及环境适应性方面行使不同功能。在此基础上，未来将继续开展 *cps* 簇构效关系的深入研究，旨在通过揭示 *cps* 簇对 EPS 分子结构特征及合成效率的调控机制，为系统解析产 EPS 菌株的遗传多样性及其与表型多样性的互作关系提供理论依据，为后续功能菌株的精准选育和 EPS 资源的靶向开发奠定研究基础。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## 参考文献


[1] 黄晓宇, 韩璠, 高雅茹, 等. 植物乳杆菌胞外多糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(13): 315−322. [HUANG Xiaoyu, HAN Jing, GAO Yaru, et al. Research progress of exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum*[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(13): 315−322.]

[2] 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 Chao. Production of exopolysaccharide by lactic acid bacteria and its application in food[J]. Modern Food, 2022, 28(17): 18−22.]

[3] 姚晶, 任婧, 吴正钧, 等. 乳酸菌胞外多糖的生物合成及其遗传调控[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(2): 11−16. [YAO Jing, REN Jing, WU Zhengjun, et al. Biosynthesis and genetic regulation of exopolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(2): 11−16.]

[4] 谭凤翔, 余元善, 温靖, 等. 乳酸菌胞外多糖的合成、生物活性及应用研究进展[J]. 中国酿造, 2023, 42(9): 7−13. [TAN Fengxiang, YU Yuanshan, WEN Jing, et al. Research progress on the synthesis, biological activity and application of extracellular polysaccharide produced by lactic acid bacteria[J]. China Brewing, 2023, 42(9): 7−13.]

[5] 李佳伟, 虞宁馨, 于连升, 等. 乳酸菌胞外多糖在食品工业中的应用研究[J]. 中国酿造, 2023, 42(6): 17−21. [LI Jiawei, YU Ningxin, YU Liansheng, et al. Application of exopolysaccharides of lactic acid bacteria in food industry[J]. China Brewing, 2023, 42(6): 17−21.]

[6] KAVITAKE D, TIWARI S, SHAH I A, et al. Antipathogenic potentials of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and their food and health applications[J]. Food Control, 2023, 152: 109850.

[7] PRETE R, DELL'ORCO F, SABATINI G, et al. Improving the antioxidant and anti-inflammatory activity of fermented milks with exopolysaccharides-producing *Lactiplantibacillus plantarum* strains[J]. Foods, 2024, 13(11): 1663.

[8] LU Jing, MAO Yunren, MA Ting, et al. Screening and genome analysis of lactic acid bacteria with high exopolysaccharide production and good probiotic properties[J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103211.

[9] 索超, 曲晓军, 崔艳华. 乳酸菌胞外多糖研究进展[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(11): 32−36. [SUO Chao, QU Xiaojun, CUI Yanhua. Research advances in extracellular polysaccharide produced by lactic acid bacteria[J]. China Dairy Industry, 2017, 45(11): 32−36.]

[10] ZHOU Zifang, ZENG Xiaoqun, WU Zhen, et al. Relationship of gene-structure–antioxidant ability of exopolysaccharides derived from lactic acid bacteria: a review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(24): 9187−9200.

[11] 刘丽波, 刘宁, 李春, 等. 一株高产 EPS 乳酸杆菌的筛选及合成量优化[J]. 食品工业科技, 2006(12): 65−67. [LIU Libo, LIU Ning, LI Chun, et al. Screening and optimization of the synthesis amount of a high-yielding EPS *Lactobacillus* strain[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006(12): 65−67.]

[12] IBARBURU I, PUERTAS A I, BERREGI I, et al. Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 214: 54−62.

[13] DEO D, DAVRAY D, KULKARNI R. A diverse repertoire of exopolysaccharide biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus* revealed by comparative analysis in 106 sequenced genomes[J]. Microorganisms, 2019, 7(10): 444.

[14] LAMOTHE G, JOLLY L, MOLLET B, et al. Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[J]. Archives of Microbiology, 2002, 178(3): 218−228.

[15] DAN T, FUKUDA K, SUGAI-BANNAI M, et al. Characterizationand expression analysis of the exopolysaccharide gene cluster in *Lactobacillus fermentum* TDS030603[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(12): 2656−2664.

[16] ALE E C, ROJAS M F, REINHEIMER J A, et al. *Lactobacillus fermentum*: could EPS production ability be responsible for functional properties?[J]. Food Microbiology, 2020, 90: 103465.

[17] JIANG Yunyun, YANG Zhennai. A functional and genetic overview of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plan-*

*tarum*[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 47: 229−240.
[18] LI Ping, LI Xuan, GU Qing, et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 reveals its genetic adaptation and potential probiotic profiles[J]. Journal of Zhejiang University. Science. B, 2016, 17(8): 569−579.
[19] 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.
[20] KLEEREBEZEM M, BOEKHORST J, VAN KRANENBURG 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.
[21] VAN DEN NIEUWBOER M, VAN HEMERT S, CLAASSEN E, et al. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and its host interaction: a dozen years after the genome[J]. Microbial Biotechnology, 2016, 9(4): 452−465.
[22] SIEZEN R J, VAN HYICKAMA VLIEG J E T. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(Suppl 1): S1−S13.
[23] SOUMYA M P, NAMPOOTHIRI K M. An overview of functional genomics and relevance of glycosyltransferases in exopolysaccharide production by lactic acid bacteria[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184: 1014−1025.
[24] VASTANO V, PERRONE F, MARASCO R, et al. Transcriptional analysis of exopolysaccharide biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus plantarum*[J]. Archives of Microbiology, 2016, 198(3): 295−300.
[25] KIMMEL S A, ROBERTS R F. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* RR[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 40(1-2): 87−92.
[26] 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.
[27] 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.
[28] 黄淑婷, 孙娅西, 宦海琳, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术的植物乳植杆菌 YZH81 胞外多糖合成基因簇功能鉴定研究[J]. 食品科学, 2024, 1-6. [HUANG Shuting, SUN Yaxi, HUAN Hailin, et al. Functional characterization of the capsular polysaccharide cluster of *Lactiplantibacillus plantarum* YZH81 based on CRISPR/Cas9 technology[J]. Food Science, 2024, 1-6.]
[29] 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. [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.]
[30] HUANG He, SONG Xin, YANG Sheng. Development of a RecE/T-assisted CRISPR-Cas9 toolbox for *Lactobacillus*[J]. Biotechnology Journal, 2019, 14(7): e1800690.
[31] 张甜, 丁真真, 刘艳全, 等. 具有抑菌活性乳酸菌的分离、鉴定及其生长特性研究[J]. 中国酿造, 2024, 43(2): 119−124. [ZHANG Tian, DING Zhenzhen, LIU Yanquan, et al. Isolation, identification and growth characteristics of lactic acid bacteria with antibacterial activity[J]. China Brewing, 2024, 43(2): 119−124.]
[32] CERNING J, BOUILLANNE C, LANDON M, et al. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 1992, 75(3): 692−699.
[33] 赖田甜, 赵华, 姚梦柯, 等. 植物乳杆菌 NMGL2 胞外多糖对其生长特征及发酵乳加工特性的影响[J]. 中国酿造, 2022, 41(2): 113−118. [LAI Tiantian, ZHAO Hua, YAO Mengke, et al. Effect of the exopolysaccharide of *Lactobacillus plantarum* NMGL2 on its growth characteristics and processing characteristics of fermented milk[J]. China Brewing, 2022, 41(2): 113−118.]
[34] 王慧阳, 秦靖, 庄丹, 等. 蜗牛黏液多糖的提取、表征及抗氧化性和免疫活性[J]. 生物加工过程, 2020, 18(3): 324−331. [WANG Huiyang, QIN Jing, ZHUANG Dan, et al. Isolation, characterization, antioxidant and immunomodulating activity of polysaccharides from Achatina fulica mucus[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2020, 18(3): 324−331.]
[35] LI Jiayi, ZHANG Lijuan, MU Guangqing, et al. Interpretation of safety and potential probiotic properties of *Lactiplantibacillus plantarum* Y42 based on genome-wide sequencing[J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103249.
[36] 房思昌, 宋馨, 薛玉玲, 等. CRISPR/Cas 技术在乳酸菌中的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(11): 317−323. [FANG Sichang, SONG Xin, XUE Yuling, et al. Research progress of CRISPR/Cas technology in lactic acid bacteria[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(11): 317−323.]
[37] 关雪, 赵启祖, 邹兴启, 等. 基于基因敲除技术的非洲猪瘟病毒基因功能的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2024(21): 93−99. [GUAN Xue, ZHAO Qizu, ZOU Xingqi, et al. Research progress on the gene function of African swine fever virus based on gene knockout technology[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary, 2024(21): 93−99.]
[38] 迟涛, 徐晓娟, 刘洋硕, 等. 干酪乳杆菌 yhaⅠ基因敲除菌株的构建及其耐药表型的分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 106−110. [CHI Tao, XU Xiaojuan, LIU Yangshuo, et al. Construction of yhaⅠ gene knockout mutant strains of *Lactobacillus casei* and analysis of its antibiotic resistance[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(6): 106−110.]
[39] 邢得勋, 谭景轩, 崔金娜, 等. 基因敲除技术在多重耐药细菌中的应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2301−2311. [XING Dexun, TAN Jingxuan, CUI Jinna, et al. Research progress in the application of gene knockout in multidrug-resistant bacteria[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2301−2311.]
[40] 樊祥瑞, 王俊燕, 梁丽亚, 等. 基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因编辑与调控技术[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2449−2464. [FAN Xiangrui, WANG Junyan, LIANG Liya, et al. Multiplex gene editing and regulation techniques based on CRISPR/Cas system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2449−2464.]
[41] GOH Y J, BARRANGOU R. Harnessing CRISPR-Cas systems for precision engineering of designer probiotic *Lactobacilli*[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 56: 163−171.
[42] MU Yulin, ZHANG Chengxiao, LI Taihua, et al. Development and applications of CRISPR/Cas9-based genome editing in *Lactobacillus*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(21): 12852−12852.