

## 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 全基因组分析及胞外多糖生物合成

吴娜, 崔欣蕊, 胡海敏, 彭清婷, 刘金惠, 丹彤\*

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室  
内蒙古乳业生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

**摘要** 乳酸菌(LAB)生产的胞外多糖是微生物适应环境的产物,具有抑制致病菌生长、抗氧化、降血糖等多种益生功效,还具有改善发酵乳制品口感、质构、风味等作用。本研究以从香格里拉藏区酸牦牛乳中分离得到的高产胞外多糖的副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 为研究对象,采用 Illumina Hiseq 4000 二代测序技术,完成该菌株的全基因组测序,并利用 SOAPdenovo 软件对其进行组装,结合 RAST、COG、GO、KEGG 数据库完成基因的预测及功能注释,发现副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 基因组全长 3 012 314 bp,共编码 2 975 个基因。基因注释的结果表明副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 具有完整的 eps 基因簇,长度为 16 581 bp,包括 *wzb*、*LytR*、*wzg*、*epsC*、*epsD*、*glf1*、*glf2*、*glf3*、*wze*、*glf4*、*WelA*、*WelB* 等 19 个与胞外多糖(EPS)生物合成相关基因。此外,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)试验结果证明 eps 基因簇中几乎所有的基因均可表达,且在 6 h 时表达量达到最大值。研究结果将有助于副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 EPS 的结构研究,为其工业化应用奠定理论基础。

**关键词** 胞外多糖; 副干酪乳酪杆菌; eps 基因簇; 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

**文章编号** 1009-7848(2025)02-0376-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.02.033

副干酪乳酪杆菌 (*Lactocaseibacillus paracasei*, *L. paracasei*) 属于乳酪杆菌属中的干酪乳酪杆菌群,是近年来研究较多的一种益生菌。2022 年 10 月,国家食品安全风险评估中心发布《可用于食品的菌种名单》和《可用于幼儿食品的菌种名单》的公开征求意见中,将副干酪乳酪杆菌(*Lactobacillus paracasei*)更名为副干酪乳酪杆菌。副干酪乳酪杆菌可以从人体肠道、口腔、发酵乳制品以及植物产品中分离出来<sup>[1]</sup>在乳制品发酵、食品防腐和 L-乳酸生产等方面有着广泛的应用<sup>[2]</sup>。研究表明,副干酪乳酪杆菌具有良好的保健功效,能调节脂肪的吸收和代谢,预防肥胖及与肥胖相关的慢性疾病<sup>[3-5]</sup>;能调节肠道菌群,抑制有害菌的生长<sup>[6]</sup>。此外,还能调节人体免疫系统,增强对肿瘤细胞的抵抗能力,从而降低癌症风险。近年来,随着人们对健康的愈发重视,对副干酪乳酪杆菌益生作用的研究已成为热点。

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)胞外多糖

(Exopolysaccharides, EPS)是由 LAB 自身代谢产生的大分子物质<sup>[7]</sup>。根据其相对于菌体的位置分为荚膜多糖(Capsular polysaccharides, CPS)和黏液多糖(Slim polysaccharide, SPS)<sup>[8]</sup>,CPS 附着在细胞表面,难以轻易分离,而 SPS 由细胞释放到胞外,较容易提取<sup>[9]</sup>,目前研究的 EPS 主要指 SPS。EPS 具有多种益生功效,包括增强免疫力、抑制致病菌生长、抗肿瘤、抗氧化及降血糖等<sup>[10-12]</sup>。EPS 可以被添加到发酵乳制品中,改善产品质地,提高营养和保健效果<sup>[13-15]</sup>。此外,EPS 是微生物适应环境的产物<sup>[16]</sup>,有助于微生物黏附,防止干燥脱水,抵御有毒物质和某些原生动物的伤害等<sup>[17]</sup>。

副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 分离自香格里拉藏区酸牦牛乳,是 1 株高产 EPS 的菌株。本研究利用 Illumina Hiseq 4000 二代测序技术完成了副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 的全基因组测序,发现多个 EPS 合成相关基因,并通过实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR, RT-qPCR)技术对相关基因的表达进行检测。这些结果为进一步研究副干酪乳酪杆菌 EPS 提供了科学依据,有助于揭示副干酪乳酪杆菌 EPS 合成的分子机制。

收稿日期: 2024-06-13

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2024LHMS03035)

第一作者: 吴娜,女,硕士生

通信作者: 丹彤 E-mail: dantong813218@aliyun.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 分离自香格里拉藏区酸牦牛乳中,由内蒙古农业大学乳酸菌菌种资源库(LABCC)提供。

1.1.2 试剂 MRS 合成培养基,OXOID 公司;TIANamp Bacteria DNA Kit 试剂盒,Promega 公司;RNAsimple Total RNA Kit 试剂盒,Invitrogen 公司;M5 First Strand cDNA Synthesis Kit (MF11-T)反转录试剂盒,Invitrogen 公司。

### 1.2 仪器与设备

Nano-Drop 2000 型微量分光光度计,美国 Thermo Scientific 公司;HVA-110 型高压灭菌锅,日本 Hirayama 公司;7900 型高通量快速实时荧光定量 PCR 仪,Agilent Stratagene 公司;移液枪、Eppendorf Centrifuge 5242 R 高速冷冻离心机,Eppendorf 公司;Digital Vortex-Genie 2 型漩涡振荡器,KRACKELER Scientific 公司;BPX-272 型电热恒温培养箱,苏州江东精密仪器有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 菌株活化 将保藏在 $-80^{\circ}\text{C}$ 的副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 接种于 MRS 液体培养基, $37^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h,连续培养 2 代,使菌株活力达到最大。

1.3.2 DNA 提取 培养结束后,离心去除上清,加入 PBS 清洗 2 遍,离心收集菌体,采用 TIANamp Bacteria DNA Kit 试剂盒,按厂家提供的说明书提取 DNA。

1.3.3 基因组测序 使用微量分光光度计测定提取的 DNA 浓度,通过 0.6%琼脂糖凝胶电泳鉴定纯度,利用 Illumina Hiseq 4000 二代测序技术对菌株进行全基因组测序。

1.3.4 基因组组装 对二代测序后的优化序列进行多个 Kmer 参数的拼接,获得最佳的 contigs 组装结果,将 reads 与 contig 进行比对,对组装结果进行局部组装和优化,形成 scaffolds。

1.3.5 基因组注释 结合 RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology)<sup>[18]</sup>、GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>)、COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) 以及 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) 等数据库完成副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 基因组的预测及注释。

1.3.6 生物信息学分析 采用 CGview ([http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview\\_server/](http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/))<sup>[19]</sup> 软件和 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)<sup>[20]</sup> 软件完成菌株的生物信息学分析。

1.3.7 总 RNA 提取 将活化后的副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 接种于 MRS 液体培养基中,于  $37^{\circ}\text{C}$  培养,在 0,6,12,18,24 h 离心收集菌体,参考试剂盒说明书,利用 RNAsimple Total RNA Kit 试剂盒进行 RNA 提取,并使用质量分数 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

1.3.8 cDNA 合成 DNA 去除及 cDNA 合成反应使用 M5 First Strand cDNA Synthesis Kit(MF11-T)反转录试剂盒进行试验,方法参照厂家提供的说明书。

1.3.9 RT-qPCR 引物设计 本试验所用的扩增引物利用 primer5.0<sup>[21]</sup> 软件设计,由上海美吉生物公司合成,如表 1 所示。

1.3.10 实时荧光定量 PCR 使用表 1 设计的引物,16S rRNA 作为内参基因,进行试验。参照 Livak 等<sup>[22]</sup>的  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法分析数据,计算基因表达量并绘图。反应体系如表 2 所示。

## 2 结果与分析

### 2.1 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 基因组基本特征

基于 Illumina Hiseq 4000 平台的测序结果,采用 CGView 软件绘制基因组扫描图(图 1)。副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 基因组全长 3 012 314 bp,包含 102 条 scaffold,Scaffold N50、Scaffold N90 长度分别为 153 231 bp 和 25 151 bp,G+C 含量为 46.26%。共编码到 2 975 个基因,长度为 2 578 188 bp,占总基因组长度的 85.59%,tRNA 基因数目为 52 个,rRNA 基因数目为 3 个。

### 2.2 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 基因组 COG 分析

副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 基因组的 COG 功能注释结果如图 2 所示,有 2 288 个基因被注释到 23 个类别,G 类别(碳水化合物的运输和代谢,341 个基因,占比 14.90%)的基因占比最大,其次是 J 类别(翻译、核糖体结构和生物合成,211 个基因,占比 9.22%)、R 类别(一般功能预测基因,209

表 1 RT-qPCR 引物  
Table 1 Primers for RT-qPCR

基因名称	引物序列(5'→3')	扩增长度/ bp	基因名称	引物序列(5'→3')	扩增长度/ bp
<i>wzb</i>	GGCGTTTGATAACCAGCGTA GTGCTTAATAACAGCATGCCGA	150	<i>glf3</i>	GTCGATTGAAAAATGATTGTAA TCTATCAACCATCCTTTTAGCAGC	148
<i>LytR</i>	TGACGATTGAGAAGTTGGCG CGCTACCTGCATATTTAAAGC	135	<i>wze</i>	GCTGTCATAAAAGGATGGCAAC AAGGCCCTATATAGCCGAACAG	139
<i>wzg</i>	ATGAACGCCGCTGATTTTG CGTCAATGGGAATCACGGTT	163	<i>glf4</i>	GGGGTATTATCAACAGAGTAGACC CACCACCTCAAGACATCTTCCAAC	124
<i>epsC</i>	TGGGTTTACTCAATCTTGGCAT CGCTGAGGTAATCCTGCAT	145	<i>welA</i>	AGGTTTGTGGCAAGTCTCGGG CACCAGTCGGATGAATCACAA	146
<i>epsD</i>	GTGATTTGAAGAGAAGCTTTGAGG CTCATCGTTACTTTGATACCCGT	137	<i>welB</i>	GTGAATAAAGCCTATCTGGAACG GATTTTGACGTTTTTGAACCGT	139
<i>glf1</i>	AGGATGCTGCTGTTTACTGGA CCAAGGGTTTGACGTTCTTCT	97	<i>16S rRNA</i>	GGTCTGTAAGTACGCTGAGG GCACTGAAGGGCGGAAAC	
<i>glf2</i>	TTCGGCTTTCAACATTTTCGT ATAACCGGTCTCATTGTCCACA	148			

表 2 RT-qPCR 反应体系  
Table 2 Reaction system for RT-qPCR

试剂	浓度	体积/ $\mu\text{L}$
反转录试剂盒试剂(2x)	2x	5.0
引物 F/ $(\mu\text{mol/L})$	10	0.2
引物 R/ $(\mu\text{mol/L})$	10	0.2
cDNA		1.0
水		3.6
总计		10.0

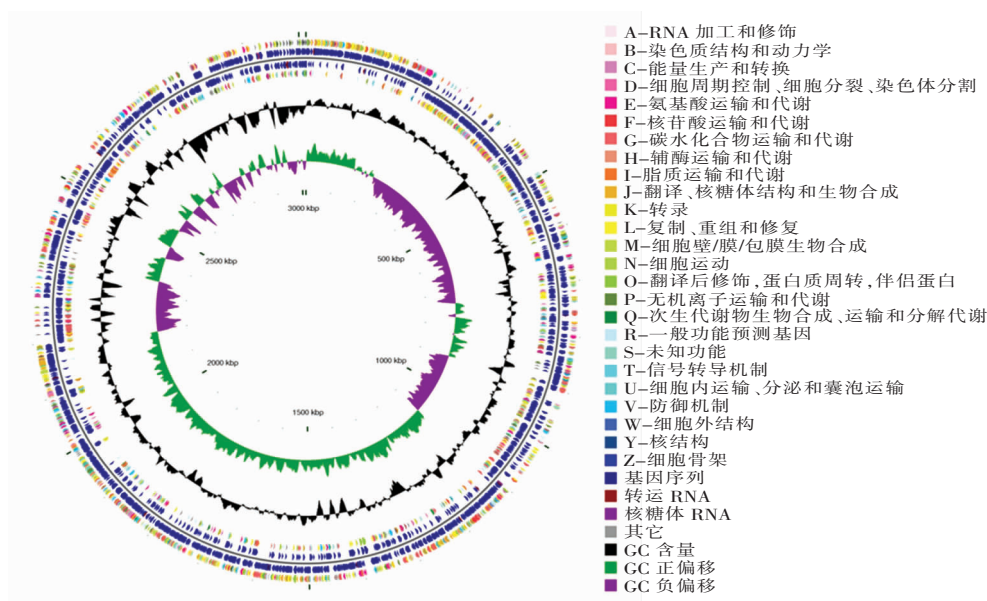


图 1 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 基因组扫描图

Fig.1 Genome scan map of *L. paracasei* ProSci-92



过程中,磷酸烯醇丙酮酸依赖性糖磷酸转移酶系统(Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system)注释到较多基因;在细胞组成中,细胞膜组分(Integral component of membrane)注释到较多基因,其次为细胞质(Cytoplasm)、质膜(Plasma membrane);在分子功能中,有326个基因被注释到ATP整合(ATP binding)中,占GO总编码基因的10.96%,另外在水解酶活性(Hydrolase activity)、DNA整合(DNA binding)等类别中也注释到较多编码基因。

## 2.4 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 基因组 KEGG 分析

副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 基因组的 KEGG 功能注释结果如图 4 所示。共注释到 1 496 个基因。在一级类别中,新陈代谢(Metabolism)、环境信息加工(Environmental information processing)注释到较多基因,基因数量分别为 1 220 个和 286 个,占 KEGG 总编码基因的 81.55%和 19.12%。在二级类别中,被注释到全局和概述图谱(Global and overview maps)、碳水化合物代谢(Carbohydrate metabolism)、膜转运(Membrane transportation)中的基因占大多数。

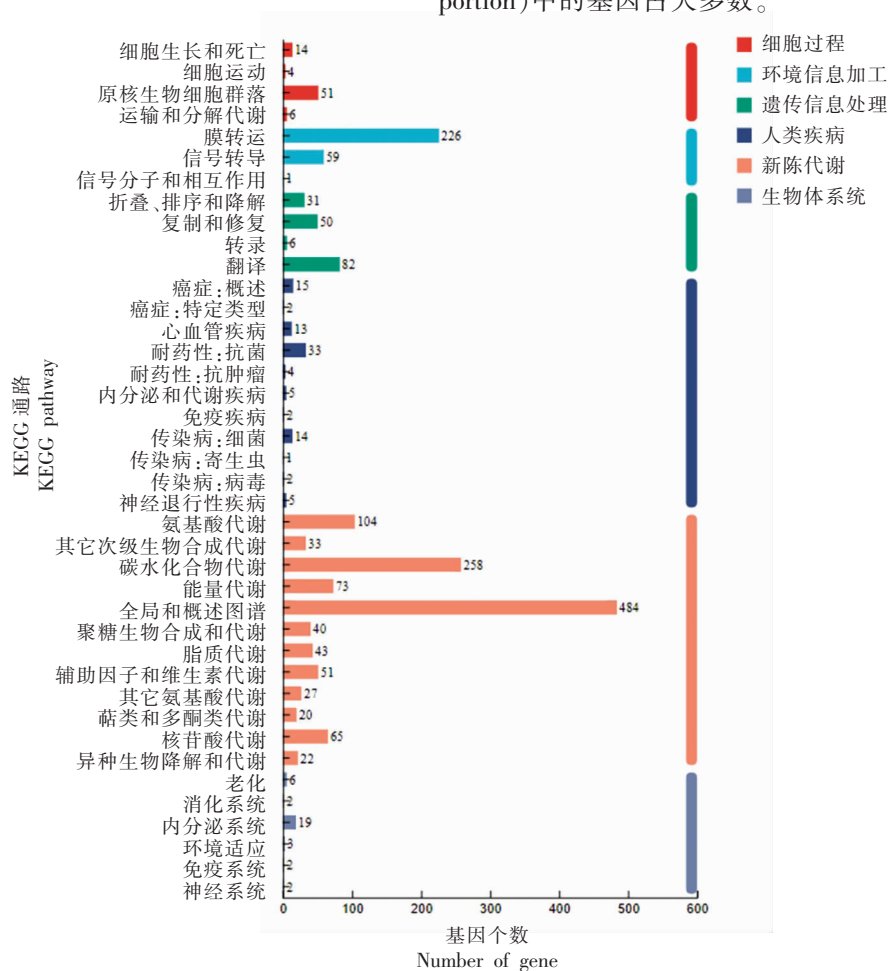


图 4 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 基因组 KEGG 功能注释结果

Fig.4 KEGG pathway classification of *L. paracasei* ProSci-92

## 2.5 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 eps 基因簇

注释后发现,副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 拥有较为完整的 eps 基因簇,长度为 16 581 bp,由 19 个基因组成。从图 5 可以看出,副干酪乳酪杆菌

ProSci-92 的 eps 基因簇中,除假定蛋白外,有 15 个与 EPS 生物合成相关的基因。根据 eps 基因的功能可将 eps 基因簇划分为调控、决定多糖链长、编码糖基转移酶和控制多糖输出 4 个区域。

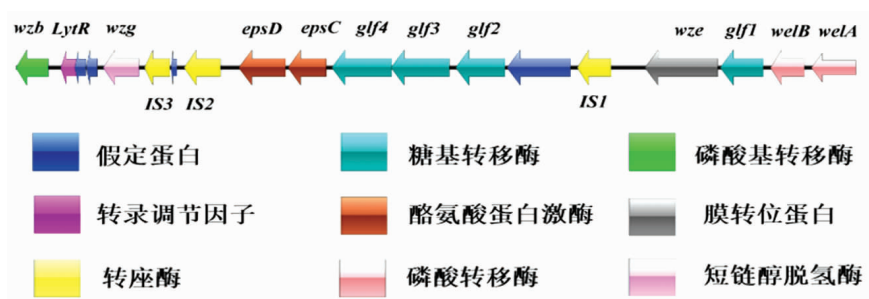


图 5 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 eps 基因簇

Fig.5 eps gene cluster of *L. paracasei* ProSci-92

通过 NCBI Blast 比对 eps 基因簇中功能性基因的同源性,结果如表 3 所示。

*LytR* 能与 eps 基因簇上的靶基因结合,启动 EPS 的转录过程,从而调控 EPS 的合成<sup>[23]</sup>。该基因与副干酪乳酪杆菌 NRIC 1917(ID:GAN39834.1)<sup>[24]</sup>菌株的同源性高达 100%。

*glf1~glf4* 为糖基转移酶基因,其种类和数量决定了重复单元的范围<sup>[25-26]</sup>,这些基因负责将单糖转运到脂质载体上形成重复单元<sup>[27]</sup>,在 EPS 合成过程中发挥着重要作用。其中 *glf1* 和 *glf4* 编码鼠李糖基转移酶基因,与副干酪乳酪杆菌 Lpp223 (ID:EPC31572.1) 菌株的同源性高达 100% 和 99.75%,*glf2* 和 *glf3* 编码糖基转移酶基因,与副干酪乳酪杆菌 Lpp37(ID:CCK23134.1)<sup>[28]</sup>菌株的同源性高达 99.69% 和 100%。

*epsC*、*epsD* 为编码酪氨酸蛋白激酶基因,能控

制 EPS 链长,分别与副干酪乳酪杆菌 Lpp223 (ID:EPC31572.1)、副干酪乳酪杆菌 DSM 20258 (ID:KRN08542.1)<sup>[29]</sup>的同源性达到 100% 和 98.71%。有研究发现,控制 EPS 链长的基因能调控糖基转移酶的活性,这种调控关系对于 EPS 合成过程中相关酶的表达有着重要的影响<sup>[30]</sup>。

另外还注释到转座酶基因,磷酸甘油酸变位酶基因,膜转位蛋白基因等功能基因。*IS1*、*IS2*、*IS3* 是转座酶基因,是一个可以改变自身位置的片段基因,可能参与 DNA 的重组和移动<sup>[31]</sup>。*wzb* 编码磷酸甘油酸变位酶基因,与副干酪乳酪杆菌 JCM 8130 (ID:KRM63852.1)<sup>[32]</sup>菌株的同源性高达 99.53%。*wze* 编码膜转位蛋白基因,与副干酪乳酪杆菌 Lpp227 (ID:EPC94151.1) 菌株的同源性达到 91.61%,该基因在 EPS 合成过程中起到输出重复单元的作用,负责将其从细胞质膜的内部转移到

表 3 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 eps 基因簇功能

Table 3 Function of eps gene cluster from *L. paracasei* ProSci-92

基因	编码蛋白	相似菌株	基因号	相似比/%
<i>wzb</i>	磷酸甘油酸变位酶	副干酪乳酪杆菌 JCM 8130	KRM63852.1	99.53
<i>LytR</i>	转录调节因子	副干酪乳酪杆菌 NRIC 1917	GAN39834.1	100.00
<i>wzg</i>	短链醇脱氢酶	副干酪乳酪杆菌 ATCC 334	LT604076.1	98.73
<i>epsD</i>	酪氨酸蛋白激酶 t	副干酪乳酪杆菌 DSM 20258	KRN08542.1	98.71
<i>epsC</i>	酪氨酸蛋白激酶 t	副干酪乳酪杆菌 Lpp 223	EPC31572.1	100.00
<i>glf4</i>	鼠李糖基转移酶	副干酪乳酪杆菌 Lpp 223	EPC31572.1	99.75
<i>glf3</i>	糖基转移酶	副干酪乳酪杆菌 Lpp 37	CCK23134.1	100.00
<i>glf2</i>	糖基转移酶	副干酪乳酪杆菌 Lpp 37	CCK23134.1	99.69
<i>wze</i>	膜转位蛋白	副干酪乳酪杆菌 Lpp 227	EPC94151.1	91.61
<i>glf1</i>	鼠李糖基转移酶	副干酪乳酪杆菌 Lpp 223	EPC31572.1	100.00
<i>WelB</i>	半乳糖磷酸转移酶	干酪乳杆菌 12A	EKP97590.1	76.70
<i>WelA</i>	葡萄糖-1-磷酸胸苷酸转移酶	副干酪乳酪杆菌 Lpp 221	EPC78478.1	98.47

外部<sup>[33]</sup>。*wzg* 编码短链醇脱氢酶基因,与副干酪乳酪杆菌 ATCC 334 (ID:ABJ70810.1)<sup>[34]</sup>菌株同源性达 98.73%。*Wela* 编码葡萄糖-1-磷酸胸苷酸转移酶,与副干酪乳酪杆菌 Lpp221 (ID:EPC78478.1)<sup>[35]</sup>菌株的同源性达到 98.47%,*WelB* 编码半乳糖磷酸转移酶,与干酪乳杆菌 12A (ID:EKP97590.1)菌株的同源性仅为 76.70%。

## 2.6 RT-qPCR 分析

2.6.1 RNA 提取结果 RT-qPCR 是一种常用的基因表达检测方法。副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 RNA 质检结果如表 4、图 6 所示,所有样品 RNA 条带清晰,无色素、蛋白和糖类杂质,无 DNA 污

表 4 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 总 RNA 提取结果  
Table 4 Total RNA extraction results  
of *L. paracasei* ProSci-92

时间/h	质量浓度/ (ng/ $\mu$ L)	OD <sub>260/280</sub>	OD <sub>260/230</sub>
0	608.894	2.061	2.158
6	707.373	2.038	2.392
12	542.105	2.062	2.260
18	510.268	2.034	1.993
24	697.562	2.015	2.201

染,OD<sub>260/280</sub>  $\geq$  1.9,OD<sub>260/230</sub>  $\geq$  2.0,质量浓度  $\geq$  400 ng/ $\mu$ L。

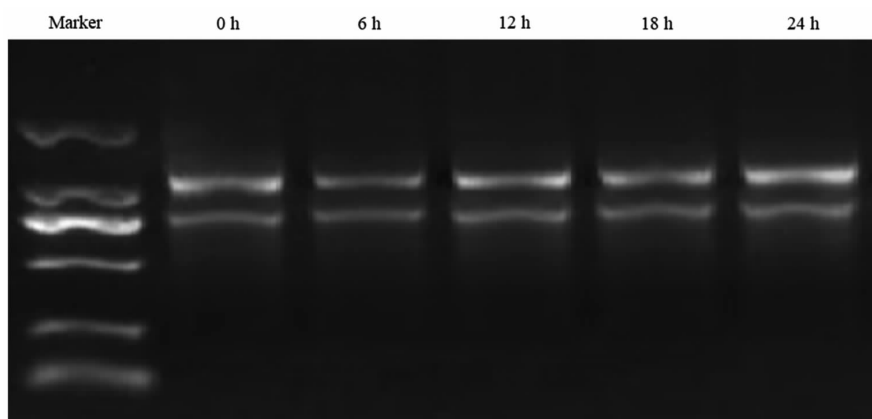


图 6 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.6 Results of RNA electrophoresis of *L. paracasei* ProSci-92

2.6.2 RT-qPCR 分析结果 本试验对副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 *eps* 基因簇中的多个基因在不同时期(6, 12, 18, 24 h)的表达量进行测定,结果如图 7 所示。*eps* 基因簇中与 EPS 合成相关基因在菌株培养 6 h 时表达量达到最大;培养 12 h 时,表达量均有不同程度的下降;当培养 18 h 时,糖基转移酶基因和转运 EPS 的膜转位蛋白基因 *wze* 的相对表达量出现回升,而在培养 24 h 时,所有基因的表达量均呈现下降趋势,说明此时菌体已进入衰亡期,基因的表达能力下降。此结果与副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 在 6, 12, 18, 24 h 的 EPS 产量测定结果(图 8)一致,基因表达量最大时 EPS 产量也最高,24 h 时 EPS 产量由于基因表达量的下降而降低。

## 3 讨论

副干酪乳酪杆菌是一种被广泛研究的菌种,具有许多潜在的益生功能<sup>[36]</sup>。随着对副干酪乳酪杆菌基因组深入研究,发现大多数菌株基因组大小在 2.81~3.35 Mb 之间,整体 GC 含量为 (46.33 $\pm$ 0.13)%,含有 2 777 个蛋白质编码区域,涵盖了菌株生长、代谢等多个方面<sup>[37]</sup>。本研究以从香格里拉藏区酸耗牛乳中分离得到的高产 EPS 的副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 为研究对象,通过二代测序,并对其结果进行组装、注释和生物信息学分析,发现菌株基因组全长 3.01 Mb,GC 含量为 46.26%,包含 2 975 个蛋白质编码区,与已报道的大部分副干酪乳酪杆菌基因组信息一致。

*eps* 基因簇是调控 EPS 产量的主要因素,本研究在其染色体 DNA 上发现了完整的 *eps* 基因

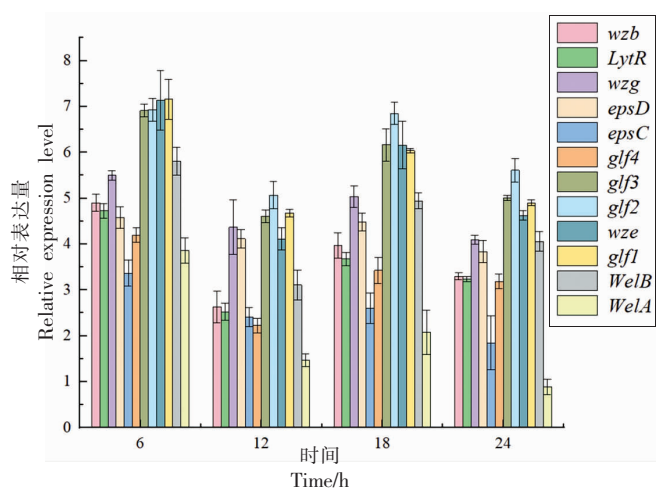


图 7 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 eps 基因簇中部分基因的相对表达量

Fig.7 Relative expression of some genes in *L. paracasei* ProSci-92 eps gene cluster

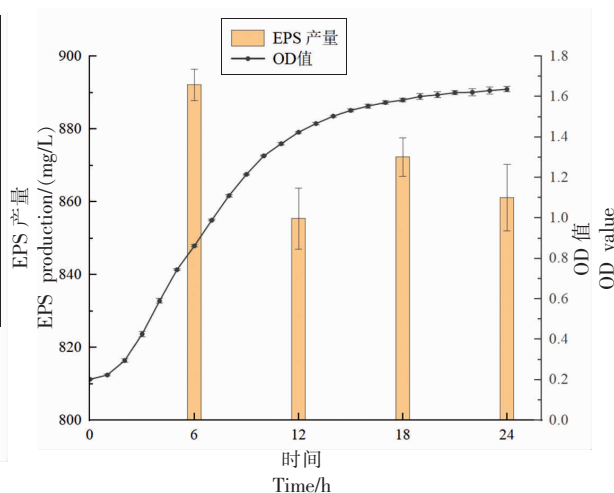


图 8 副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 在 MRS 培养基中的生长曲线、EPS 产量

Fig.8 Growth curve and EPS yield of *L. paracasei* ProSci-92 in MRS medium

簇, 该基因簇长度为 16 581 bp, 由 19 个基因组成, 主要由转录基因 *LytR*, 糖基转移酶基因 *glf1~glf4*, 控制链长的基因 *epsC*、*epsD* 及膜转位蛋白基因 *wze* 等组成。这些基因编码的酶在 EPS 生物合成过程中发挥着重要作用。Minic 等<sup>[38]</sup>研究发现对 *epsC*、*epsD* 和 *epsE* 单个基因进行敲除, 嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*, *S. thermophilus*) EPS 的产量将受到影响; 鲍婷婷<sup>[39]</sup>报道了敲除 *cpsA* 会抑制植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) JM113 EPS 的生成并导致多糖产量下降。此外, 糖基转移酶活性可影响 EPS 产量, Wu 等<sup>[40]</sup>研究发现当 eps 基因簇中缺失引导糖基转移酶基因, 菌株将无法合成 EPS; 熊永刚<sup>[41]</sup>研究显示将引导糖基转移酶 *cps2E* 和 *cps4E* 敲除后菌株的 EPS 产量显著降低, 而过表达 *cps2E* 和 *cps4E* 可显著提高植物乳杆菌 YM-4-3 的 EPS 产量。在此基础上, 本研究通过实施 RT-qPCR 试验验证了 eps 基因簇中基因的表达情况 (图 7), 发现糖基转移酶基因在培养 0~24 h 期间均能够表达, 特别是在培养 6 h 基因的表达量达到最高, 说明此时菌株将大量的单糖组合成重复单元, 聚合后排出细胞外, 这与图 8 中菌体培养 6 h 时 EPS 产量达到

最高的结果是一致的。

在 LAB 中产生 EPS 的生物合成机制相对保守<sup>[42]</sup>。通过 eps 基因簇中基因功能的分析结果, 推测出副干酪乳酪杆菌 ProSci-92 生物合成途径 (图 9)。乳糖进入细胞后, 经  $\beta$ -半乳糖苷酶分解为葡萄糖和半乳糖, 部分半乳糖被醛糖 1-差向异构酶转化为  $\alpha$ -D-半乳糖, 接着经磷酸化成为 1-磷酸-半乳糖, 随后会通过 Leloir 途径转化为 u1-磷酸-葡萄糖<sup>[43]</sup>, 或者在 UDP 葡萄糖-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶的作用下转化为 UDP-半乳糖。葡萄糖在葡萄糖激酶的作用下转化为葡萄糖-6-磷酸, 然后进入糖酵解途径或在葡萄糖磷酸变位酶的作用下转化为葡萄糖-1-磷酸, 最终转化为 UDP-葡萄糖和 dTDP-鼠李糖<sup>[32]</sup>。其中, UDP-半乳糖和 UDP-葡萄糖是可以相互转化的<sup>[44]</sup>。同时, 细胞膜内侧脂质载体参与了 EPS 的产生和细胞膜结构的组装<sup>[45]</sup>, 经过转化后的 dTDP-鼠李糖、UDP-葡萄糖以及 UDP-半乳糖在不同独特的糖基转移酶 *glf1~glf4* 作用下, 转移到脂质载体上成为糖重复单元, 利用聚合酶将其聚合并形成特定的结构, 翻转酶 (*wze*) 负责将 EPS 的重复单元进行易位, 和跨膜蛋白共同作用将 EPS 转运到细胞外。





- niversity of Technology, 2023.
- [9] 许春平, 白家峰, 马扩彦, 等. 蕈菌多糖的制取及其综合利用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2019: 20–25.  
XU C P, BAI J F, MA K Y, et al. Preparation and comprehensive utilization of mushroom polysaccharide [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2019: 20–25.
- [10] 黄燕燕. 植物乳杆菌 DMDL9010 基因组学、降解  $\text{NO}_2^-$  特性及其胞外多糖缓解抑郁症的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.  
HUANG Y Y. Genomics of *Lactobacillus plantarum* DMDL9010, the characteristics of degrading  $\text{NO}_2^-$  and the effects of extracellular polysaccharide on depression[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [11] 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.
- [12] 苗雅琼. 胞外多糖 Riclin 协同吉西他滨的抗肺癌作用和免疫抑制调节机制的研究[D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2023.  
MIAO Y Q. Study on the anti-lung cancer effect of extracellular polysaccharide Riclin and gemcitabine and the regulation mechanism of immunosuppression [D]. Bengbu: Bengbu Medical College, 2023.
- [13] LI M, LI W C, LI D Y, et al. Structure characterization, antioxidant capacity, rheological characteristics and expression of biosynthetic genes of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IMAU11823[J]. Food Chemistry, 2022, 384: 132566.
- [14] ZHANG L J, FOLKENBERG M D, AMIGO M J, et al. Effect of exopolysaccharide-producing starter cultures and post-fermentation mechanical treatment on textural properties and microstructure of low fat yoghurt[J]. International Dairy Journal, 2016, 53: 10–19.
- [15] 李鸿莹. 解淀粉芽孢杆菌 JM033 胞外多糖结构表征及免疫调节作用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023.  
LI H X. Structural characterization and immunomodulation of extracellular polysaccharide from *Bacillus amyloliquefaciens* JM033[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2023.
- [16] 姜毓君, 满朝新, 张宇, 等. 提高副干酪乳杆菌 JY062 胞外多糖产量的制法: CN115161364A [P]. 2022–10–11[2023–11–13].  
JIANG Y Y, MAN C X, ZHANG Y, et al. Method of improving the production of extracellular polysaccharide in *Lactobacillus paracasei* JY062: CN115161364A [P]. 2022–10–11[2023–11–13].
- [17] BADEI S, BERNARDI T, MICHAUD P, et al. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides [J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(1): 54–66.
- [18] OVERBEEK R, OLSON R, PUSCH G D, et al. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST) [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42: D206–D214.
- [19] 李柏良, 赵莉, 王成凤, 等. 嗜热链球菌 KLDS3.1012 胞外多糖合成途径的基因组学及表型特征分析 [J]. 食品科学, 2019, 40(6): 136–142.  
LI B L, ZHAO L, WANG C F, et al. Genomic and phenotypic characterization of the biosynthesis pathway of in *Streptococcus thermophilus* KLDS3.1012 [J]. Food Science, 2019, 40(6): 136–142.
- [20] JIA D X, SUN C Y, JIN Y T, et al. Properties of *D*-allulose 3-epimerase mined from *Novibacillus thermophilus* and its application to synthesis of *D*-allulose [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 148: 109816.
- [21] 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.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method [J]. methods, 2002, 25(4): 402–408.
- [23] 杜心恬, 宋馨, 刘欣欣, 等. 细菌胞外多糖生物合成转录调控因子研究进展 [J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 573–581.  
DU X T, SONG X, LIU X X, et al. Research progress on transcriptional regulatory factors of bacterial extracellular polysaccharide biosynthesis [J]. Microbiology Bulletin, 2021, 48(2): 573–581.
- [24] SHIWA Y, ATARASHI H, TANAKA N, et al.

- Genome sequences of three strains of *Lactobacillus paracasei* of different origins and with different cholate sensitivities[J]. *Genome Announc*, 2015, 3 (2): e00178-15.
- [25] 扎娃. 乳酸菌胞外多糖合成条件的优化及 eps 基因簇分析[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020.
- ZHA W. Optimization of synthesis conditions of extracellular polysaccharide of lactic acid bacteria and analysis of eps gene cluster[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2020.
- [26] CUI Y H, JIANG X, HAO M Y, et al. New advances in exopolysaccharides production of *Streptococcus thermophilus* [J]. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(6): 799-809.
- [27] 赵洁. 自然发酵乳中嗜热链球菌群体遗传学和功能基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- ZHAO J. Population genetics and functional genomics of *Streptococcus thermophilus* in naturally fermented milk[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [28] SMOKVINA T, WELS M, POLKA J, et al. *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: Towards species pan-genome definition and exploitation of diversity[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68731.
- [29] KROCKEL L, SCHILLINGER U, FRANZ C, et al. *Lactobacillus versmoldensis* sp. nov., isolated from raw fermented sausage[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53 (2): 513-517.
- [30] MINIC Z, MARIE C, DELORME C, et al. Control of epsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by epsD tyrosine kinase [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(4): 1351-1357.
- [31] DABOUR N, LAPOINTE G. Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (11): 7414-7425.
- [32] TENG D, KAWAI K, MIKAJIRI S, et al. Stabilization of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130T with the addition of disaccharides, polymers, and their mixtures[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017, 81 (4): 768-773.
- [33] XIAO L Y, XU D L, TANG N Y, et al. Biosynthesis of exopolysaccharide and structural characterization by *Lactocaseibacillus paracasei* ZY-1 isolated from Tibetan kefir [J]. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 2021, 3: 100054.
- [34] BROADBENT J R, LARSEN R L, DEIBEL V, et al. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(9): 2445-2458.
- [35] SMOKVINA T, WELS M, POLKA J, et al. *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: Towards species pan-genome definition and exploitation of diversity[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68731.
- [36] 巨晓英, 寇晓虹. 副干酪乳杆菌的功能及其在食品工业中的应用研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(8): 48-50.
- JU X Y, KOU X H. Research progress on the function of *Lactobacillus paracasei* and its application in food industry[J]. *China Dairy Industry*, 2009, 37(8): 48-50.
- [37] 王静, 张文羿. 副干酪乳杆菌系统发育组学分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(7): 1461-1474.
- WANG J, ZHANG W Y. Phylogenetic analysis of *Lactobacillus paracasei*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2022, 41(7): 1461-1474.
- [38] MINIC Z, MARIE C, DELORME C, et al. Control of epsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by epsD tyrosine kinase [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(4): 1351-1357.
- [39] 鲍婷婷. 植物乳杆菌 JM113 胞外多糖相关基因 cpsA 的功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- BAO T T. Functional study on extracellular polysaccharide-related gene cpsA of *Lactobacillus plantarum* JM113[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019.
- [40] WU S, ZHENG R, SHA Z, et al. Genome sequence of *Pseudomonas stutzeri* 273 and identification of the exopolysaccharide EPS273 biosynthesis locus[J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(7): 218.
- [41] 熊永刚. 过表达引导糖基转移酶对 *Lactobacillus plantarum* YM-4-3 胞外多糖合成的影响[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2021.
- XIONG Y G. Over-expression of glycosyltransferase leads to the effect of extracellular polysaccharide

- synthesis in *Lactobacillus plantarum* YM-4-3 [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2021.
- [42] ZEIDAN A A, KUZINA V P, THOMAS J, et al. Polysaccharide production by lactic acid bacteria: From genes to industrial applications[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41: S168-S200.
- [43] 乔少婷, 代安娜尔, 解敏, 等. *Streptococcus thermophilus* IMAU20551 胞外多糖基因簇及其表达分析[J]. 食品科学, 2022, 43(22): 136-144.
- QIAO S T, DAI A N E, XIE M, et al. *Streptococcus thermophilus* IMAU 20551 exopolysaccharide gene cluster and its expression analysis[J]. Food Science, 2022, 43(22): 136-144.
- [44] 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. Whole genome sequencing and exopolysaccharide gene cluster analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IMAU11823 [J]. Journal of China Food, 2021, 21(4): 256-266.
- [45] DELCOUR J, FERAIN T, DEGHORAIN M, et al. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999, 76(1/4): 159-184.

### Whole Genome Analysis and Extracellular Polysaccharide Biosynthesis of *Lacticaseibacillus paracasei* ProSci-92

WU Na, CUI Xinrui, HU Haimin, PENG Qingting, LIU Jinhui, DAN Tong\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering (IMAU), Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

**Abstract** Exopolysaccharide produced by lactic acid bacteria (LAB) is the product of microorganism adapting to the environment, which has many beneficial effects such as inhibiting the growth of pathogenic bacteria, antioxidation, lowering blood sugar, and improving the taste, texture and flavor of fermented dairy products. In this study, *Lacticaseibacillus paracasei* (*L. paracasei*) ProSci-92, which was isolated from sour yak milk in Shangri-La Tibetan area, was used as the research object, and the whole genome of the strain was sequenced by Illumina Hiseq 4000 second-generation sequencing technology. The genome of *L. paracasei* ProSci-92 was 3 012 314 bp, encoding 2 975 genes. The results of gene annotation showed that *L. paracasei* ProSci-92 RAST a complete eps gene cluster. The length was 16 581 bp, including 19 genes related to extracellular exopolysaccharide (EPS) biosynthesis, such as *uzb*, *LytR*, *wzg*, *epsC*, *epsD*, *glf1*, *glf2*, *glf3*, *wze*, *glf4*, *WelA* and *WelB*. In addition, the results of real-time quantitative PCR (RT-qPCR) showed that almost all genes in eps gene cluster could be expressed, and the expression reached the maximum at 6 h. The smooth progress of this study provided help for the structural analysis of *L. paracasei* ProSci-92 EPS, and provided a theoretical basis for the industrial application of the strain.

**Keywords** extracellular polysaccharide; *Lactobacillus paracasei*; eps gene cluster; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR)