



嗜热链球菌 IMAU20246 胞外多糖基因簇及其表达分析

代安娜尔, 乔少婷, 孙思霖, 聂佳莹, 丹彤, 孙志宏*

内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室 内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

代安娜尔, 乔少婷, 孙思霖, 聂佳莹, 丹彤, 孙志宏. 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 Annaer, QIAO Shaoting, SUN Silin, NIE Jiaying, DAN Tong, SUN Zhihong. Identification and expression profiling of exopolysaccharide gene cluster in *Streptococcus thermophilus* IMAU20246[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 403-418.

摘要: 【目的】嗜热链球菌 IMAU20246 是一株具有良好发酵特性且高产胞外多糖 (exopolysaccharides, EPS) 的菌株, 但其 EPS 基因簇及合成途径尚不清晰。因此可通过全基因组测序及生物信息学分析菌株基因组序列, 探究 EPS 合成及调控机制。【方法】本实验对嗜热链球菌 IMAU20246 进行全基因组测序并进行生物信息学分析, 解析 EPS 生物合成相关基因簇及 EPS 合成途径, 同时采用实时荧光定量 PCR 技术 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 对其不同时间点 EPS 基因簇的表达进行定量分析。【结果】嗜热链球菌 IMAU20246 基因组中有一个 18.1 kb 的 EPS 生物合成基因簇, 编码 15 个与 EPS 生物合成相关的基因。嗜热链球菌 IMAU20246 通过转运葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖、乳糖、海藻糖、纤维二糖及蔗糖合成 UDP-葡萄糖、dTDP-葡萄糖、dTDP-鼠李糖、UDP-半乳糖、UDP-呋喃半乳糖、UDP-N-乙酰葡萄糖胺和 UDP-N-乙酰半乳糖胺等 7 种糖核苷酸。qRT-PCR 的结果表明, EPS 基因簇中的基因在细胞生长阶段均能表达, 特别是糖基转移酶基因 *epsE*、*epsF*、*epsH* 和 *epsJ* 在培养 6 h 时表达量最高, 此时 EPS 产量达到最高。【结论】本研究从基因组解析了嗜热链球菌 IMAU20246 EPS 基因簇及其合成途径, 为菌株的进一步开发提供了理论依据。

关键词: 嗜热链球菌; 胞外多糖; EPS 基因簇; 生物合成; 生物信息学分析

资助项目: 国家自然科学基金(31860448)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860448).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-471-4305357, E-mail: sunzhihong78@163.com

Received: 2022-05-09; Accepted: 2022-06-26; Published online: 2022-07-14

Identification and expression profiling of exopolysaccharide gene cluster in *Streptococcus thermophilus* IMAU20246

DAI Annaer, QIAO Shaoting, SUN Silin, NIE Jiaying, DAN Tong, SUN Zhihong*

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, Inner Mongolia, China

Abstract: [Objective] *Streptococcus thermophilus* IMAU20246 is a strain with good fermentation performance and high production of exopolysaccharides (EPS), while its gene cluster and pathway for EPS synthesis remain unclear. Therefore, whole-genome sequencing and bioinformatics tools can be employed to identify the gene cluster and decipher the mechanism of EPS synthesis. [Methods] The whole genome of *S. thermophilus* IMAU20246 was sequenced and bioinformatic analysis was performed to analyze the EPS biosynthesis-related gene clusters and pathway. Further, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was carried out to determine the expression levels of the EPS gene cluster at different time points. [Results] An EPS gene cluster of 18.1 kb was identified in the genome of *S. thermophilus* IMAU20246, including 15 genes. The strain synthesized 7 sugar nucleotides including UDP-glucose, dTDP-glucose, dTDP-rhamnose, UDP-galactose, UDP-galactofuranose, UDP-N-acetylglucosamine and UDP-N-acetylgalactosamine by transporting glucose, mannose, fructose and galactose, lactose, trehalose, cellobiose, and sucrose, respectively. The results of qRT-PCR showed that the genes in the EPS gene cluster were expressed during the cell growth. In particular, the glycosyltransferase genes *epsE*, *epsF*, *epsH*, and *epsJ* reached the highest expression levels at the time point of 6 h, when the EPS yield peaked. [Conclusion] In this study, the gene cluster and pathway for EPS synthesis in *S. thermophilus* IMAU20246 were analyzed, which will provide a theoretical basis for further utilization of the strain.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*; exopolysaccharides (EPS); EPS gene clusters; biosynthesis; bioinformatics analysis

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)是兼性厌氧革兰氏阳性菌,同型乳酸发酵,被欧盟认证为 GRAS (generally recognized as safe)菌株,也是链球菌属中唯一公认为安全的菌种^[1]。嗜热链球菌能快速发酵乳糖产生乳酸,缩短凝乳时间,常与德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)一起用于酸奶生产,是乳品发酵工业中的常用发

酵剂菌株^[2]。该菌株还具有提高免疫力、改善人体肠道菌群平衡、调节血压以及抗癌等益生功能^[3]。

胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)生长代谢过程中产生的次级代谢产物,是一种长链、高分子量的化合物,由重复单元和其分支组成,分子量通常在 4×10^4 – 6×10^6 Da 之间^[4]。LAB EPS 可作为

稳定剂、增稠剂和乳化剂等改善产品的质地、流变性和口感^[5]。LAB EPS 的生物合成机制可以分为 2 种模式：脂载体非依赖型的胞外合成模式和脂载体依赖型的胞内合成模式^[6]。前者为同型多糖(homopolysaccharide, HoPS)的合成途径，仅由一种单糖组成，如葡聚糖、果聚糖和多聚半乳糖等。后者为异型多糖(heteropolysaccharide, HePS)合成模式，由几种单糖，如 D-半乳糖、D-葡萄糖、L-鼠李糖、岩藻糖、N-乙酰葡萄糖苷和葡萄糖醛酸等组成^[7]。LAB 所产 EPS 的表型特征由 EPS 基因簇决定^[8]。LAB EPS 基因簇一般位于染色体上，约为 15 到 36 kb，包含负责调控、确定链长、合成聚合和相关重复糖单元输出的基因^[9]。近年来，关于 LAB EPS 及其 EPS 基因簇的报道较多，尤其是关于嗜热链球菌 EPS 的研究受到国内外研究人员的广泛关注。Stingele 等^[10]鉴定了嗜热链球菌 Sfi6 的 EPS 基因簇，发现有 13 个基因(*epsA-epsM*)参与 EPS 的合成，这是嗜热链球菌产 EPS 的第一项报道。Bai 等^[11]发现嗜热链球菌 MN-BM-A01 的基因组序列中携带一个 35.3 kb EPS 基因簇，且 EPS 含量达 350 mg/L，是一株高产 EPS 菌株。能够产生超过 150 mg/L EPS 的菌株被认为是高产菌株，而 Zisu 等^[12]通过改变嗜热链球菌 ASCC1275 培养条件，使其 EPS 产量达到 1 029 mg/L。

嗜热链球菌 IMAU20246 分离自蒙古国传统酸牛奶，具有产酸速度快、凝乳时间短和产粘等特性。该菌株在 M17 培养基中 EPS 的产量较高，达到(428±2.8) mg/L (数据未发表)，具有一定的研究价值。本实验采用 Illumina HiSeq 二代测序技术对该菌株进行全基因组测序，分析其 EPS 合成相关基因簇，并利用 qRT-PCR 技术对 EPS 基因簇的表达进行验证，为研究嗜热链球菌 EPS 的生物合成和调控产量

提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂及仪器

1.1.1 试验菌株

嗜热链球菌 IMAU20246 由“内蒙古农业大学乳品生物技术与工程”教育部重点实验室乳酸菌菌种资源库(LABCC)提供。

1.1.2 主要试剂

M17 肉汤培养基，青岛高科园海博生物技术有限公司；氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾，福晨(天津)化学试剂有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Bacteria DNA Kit，天根生化科技(北京)有限公司；HiPure Universal RNA Kit 通用型 RNA 提取试剂盒，集思慧远生物公司；HiScript Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 反转录试剂盒、2×Taq Plus Master Mix、ChamQSYBRCOLORq PCR Master Mix (2×)，南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器

SX-700 型高压灭菌锅，HIRAYAMA 公司；SW-CJ-2FD 型超净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；移液枪、Eppendorf Centrifuge 5242 R 高速冷冻离心机，Eppendorf 公司；Vortex-genie2 型漩涡振荡器，Scientific Industries 公司；DHP-9272 型电热恒温培养箱，上海坤天试验仪器有限公司；ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪，Applied Biosystems 公司。

1.2 菌株培养及 DNA 提取

将嗜热链球菌 IMAU20246 接种到 M17 液体培养基中进行活化，37 °C 培养 24 h，以 2% (体积分数)的接种量连续培养 3 代，使菌株达到最高活力。将第 3 代菌株培养液离心收集菌体，并用 PBS 溶液清洗 2 遍后采用 TIANamp

Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株基因组 DNA。

1.3 基因组测序和组装

提取基因组 DNA 后使用微量分光光度计测定 DNA 浓度, 通过 0.6%琼脂糖凝胶电泳鉴定质量纯度, 并采用 Illumina HiSeq 4000 对嗜热链球菌 IMAU20246 进行二代基因组序列测定。利用 SOAP denovo^[13]程序流程对基因组重测序序列进行组装, 选取 scaffold 数量小、N50 和 N90 较长及 GC 含量与参考基因组较接近等较好的序列进行后续的 SOAP 验证及校验。

1.4 基因组注释

采用 RAST^[14] (Rapid Annotation using Subsystem Technology) Server-RAST Annotation Server (<http://rast.nmpdr.org/>)结合 COG (cluster of orthologous groups of proteins)数据库、GO (gene ontology) 数据库和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)代谢通路数据库完成对嗜热链球菌 IMAU20246 基因组的预测与注释。

1.5 生物信息分析

通过 CGView (http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/) 软件^[15]绘制嗜热链球菌 IMAU20246 基因组圈图。CGView 服务器绘制的图谱可以展示基因组特征。基因组中找出 EPS 基因簇, 采用 NCBI 的 BLAST 在线分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[16], 并进行核酸序列相似性比较。碳水化合物活性酶 (carbohydrate active enzymes, CAZy, <http://www.cazy.org/>)数据库^[17]进行蛋白质同源序列比对。

1.6 实时荧光定量 PCR

1.6.1 RNA 的提取及反转录 cDNA 的合成

将嗜热链球菌 IMAU20246 接种于 M17 液体培养基中, 37 °C 培养, 分别在 0、6、12、18 和 24 h 收集菌体, 使用 RNAiso Plus 试剂提

取样品总 RNA, 使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。基因组 DNA 的去除和 cDNA 的合成使用的是 HiScript Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒。基因组 DNA 的去除反应条件为 42 °C 2 min, 反转录 cDNA 合成的反应条件为: 50 °C 15 min, 85 °C 2 min。

1.6.2 实时荧光定量 PCR 扩增引物的设计

本实验所用引物均采用 Primer 5^[18]软件设计, 引物由上海美吉生物科技有限公司合成, *gapdh*^[19]为内参基因, 如表 1 所示。

1.6.3 实时荧光定量 PCR

qRT-PCR 相对表达量分析反应体系如表 2, 反应程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 进行 35 个循环。反应在 ABI7300 型荧光定量 PCR 仪上进行, 通过 2^{-ΔΔCt}算法计算基因相对表达量。

表 1 本实验所用引物

Table 1 The primers used in this experiment

Gene name	Primer sequence (5'→3')	Fragment size (bp)
<i>epsA-F</i>	TAGTTTAGATGGCGGAGA	194
<i>epsA-R</i>	AGCCTGAATCAAGTTGTG	
<i>epsB-F</i>	GAAGCACTTATCCAGAC	176
<i>epsB-R</i>	ACATTACTAAGCCCACTA	
<i>epsC-F</i>	TTGCTTCAAAAAAATCA	156
<i>epsC-R</i>	CCAATACACCAACCACTG	
<i>epsD-F</i>	ATTTGCTAGTGTTGGGCT	208
<i>epsD-R</i>	ACTTGTTGGATTAGGTGG	
<i>epsE-F</i>	ATGAGTCAAGGTGAAAAA	176
<i>epsE-R</i>	CGAATAAGTGGATAAAGG	
<i>epsF-F</i>	GGTGGATTTGAGACCTTT	160
<i>epsF-R</i>	CCGTTAGGGAGTTCCTTT	
<i>epsH-F</i>	CTTGTTGATGATGGTTCT	274
<i>epsH-R</i>	TTATCTTTTATAGGTGTGA	
<i>epsJ-F</i>	CAGGGATTCTATTTGAGG	158
<i>epsJ-R</i>	AAGAGACATTTTTTGGGC	
<i>epsM-F</i>	ACCGCAAGGAATACAACG	224
<i>epsM-R</i>	TGAGGGAGAAACAGCAAA	
<i>gapdh-F</i>	TACGACACAACCTCAAGGT	232
<i>gapdh-R</i>	CAGGAGCAGTAATAACAA	

表 2 qRT-PCR 反应体系

Table 2 The analysis system of qRT-PCR

Component	Volume (μL)	Concentration
2 \times Taq Plus Master Mix	10	2 \times
Primer F (5 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	5 $\mu\text{mol/L}$
Primer R (5 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	5 $\mu\text{mol/L}$
cDNA	1.0	
ddH ₂ O	7.4	
Total	20	

2 结果与分析

2.1 嗜热链球菌 IMAU20246 基因组基本特征

基于 Illumina HiSeq 二代测序技术对嗜热链球菌 IMAU20246 进行全基因组测序, 并利用 CGview 软件绘制基因组圈图(图 1)。嗜热链球菌 IMAU20246 基因组全长为 1 846 913 bp, GC 含量为 38.8%, scaffold N50 长度是 48 259 bp, scaffold N90 长度是 11 992 bp, 共编码基因长度为 1 535 199 bp, 占全基因组的 83.12%, 共编码了 2 068 个基因, tRNA 基因数目为 35 个, rRNA 基因数目为 2 个, 符合嗜热链球菌基因

组特征。其基因组序列已提交至 GenBank 数据库, 登录号为: JAKUKF000000000。

2.2 嗜热链球菌 IMAU20246 功能注释

对嗜热链球菌 IMAU20246 基因组序列进行 COG、GO 和 KEGG 数据库比对注释。如图 2A 所示, 通过 COG 基因功能预测分析, 嗜热链球菌 IMAU20246 基因共注释到 1 650 个基因, 分为 25 类, 其中 S (未知功能)、E (氨基酸的转运和代谢)、L (复制、重组和修复)、J (翻译、核糖体结构和生物合成)、K (转录) 相关基因和 M (细胞壁/膜/包膜生物起源) 占据前几位, 共有 89 个基因注释到类别 G (碳水化合物转运和代谢) 中。注释到 GO 数据库的基因有 1 512 个, 图 2B 所示, 分为三大类: 生物过程 (biological process)、细胞组分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function), 其中在生物过程大类中分别在翻译 (translation)、细胞分裂 (cell division) 和碳水化合物代谢过程 (carbohydrate metabolic process) 中基因富集较多, 在细胞组分大类中膜组成部分 (integral

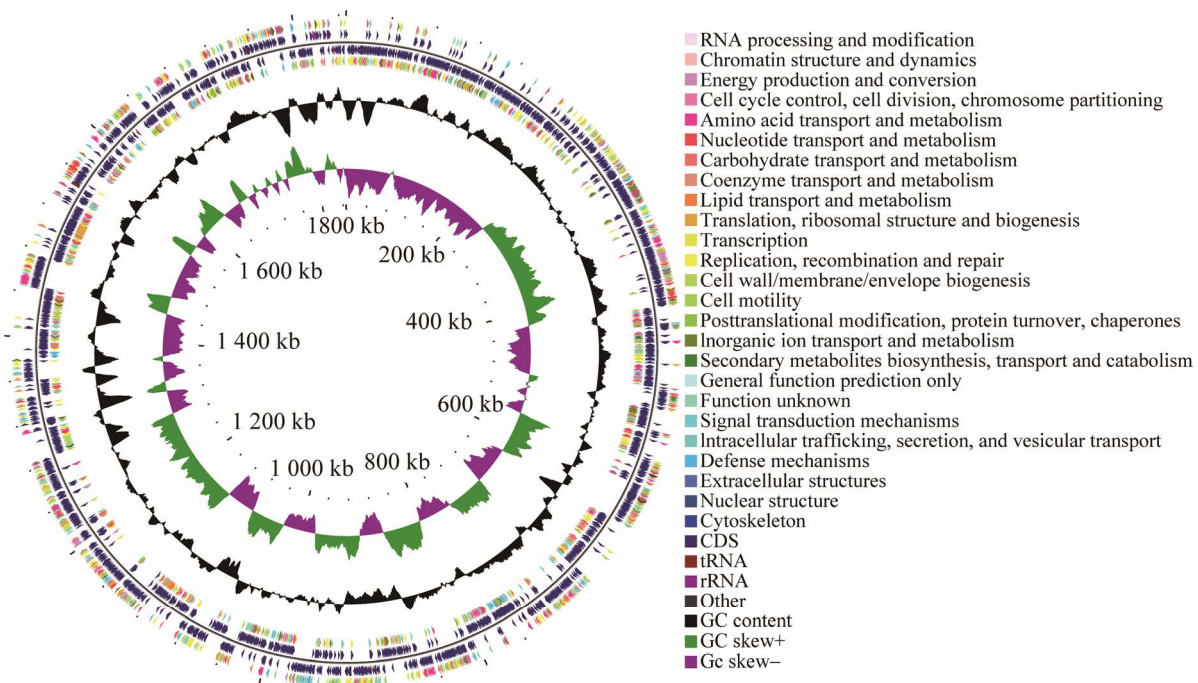
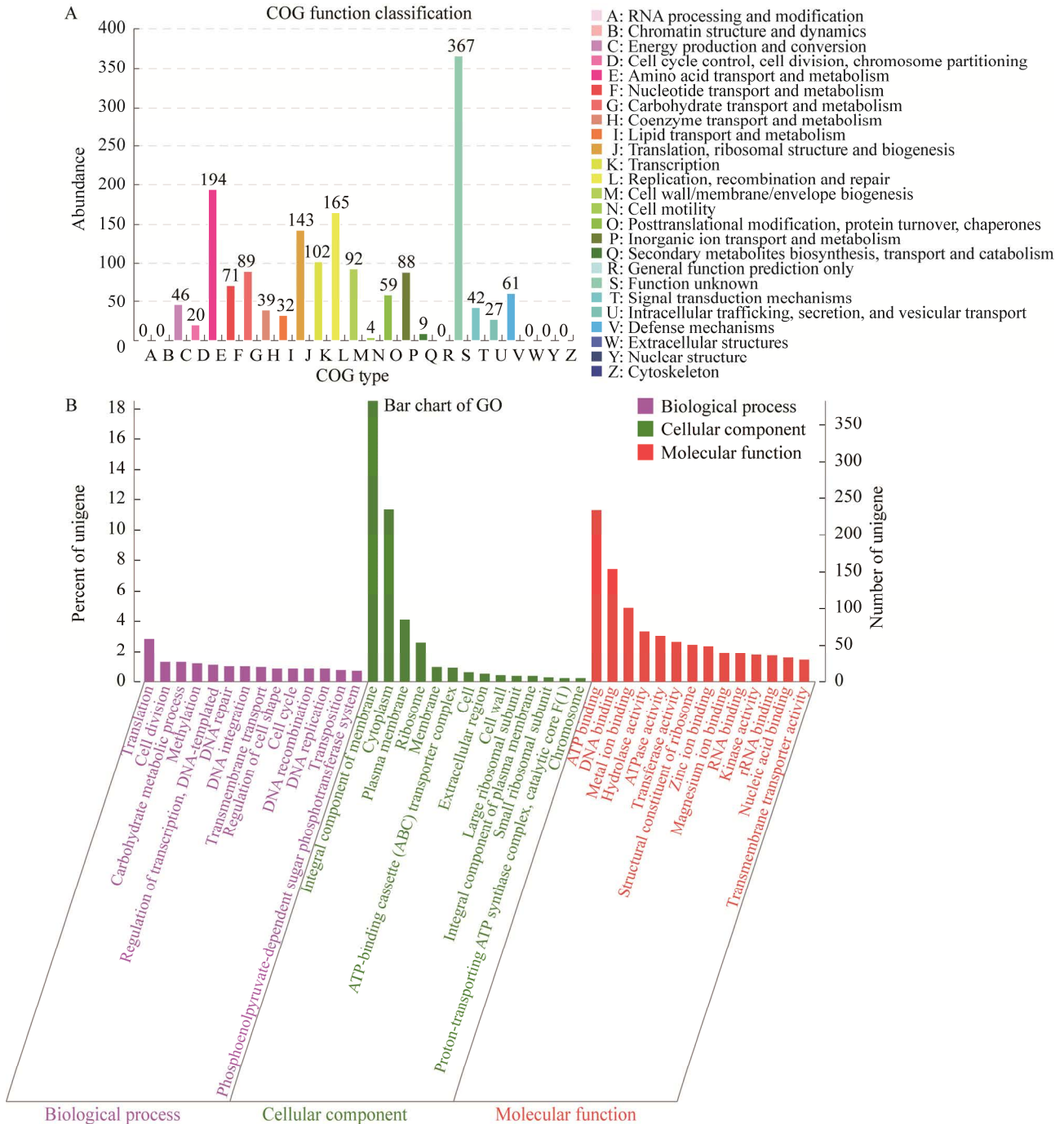


图 1 嗜热链球菌 IMAU20246 全基因组图谱

Figure 1 The genome-wide map of *Streptococcus thermophilus* IMAU20246.

component of membrane)、细胞质(cytoplasm)和质膜(plasma membrane)注释基因较多。共有 1 395 个基因注释到 KEGG 代谢通路中, 如图 2C 所示, 共注释到 6 大类别, 分别为新陈代谢 (metabolism)、细胞过程(cellular processes)、遗传信息处理(genetic information processing)、人

类疾病(human diseases)、生物系统(organismal systems) 和 环境 信息 处理 (environmental information processing)等。其中注释到氨基酸代谢的有 120 个基因, 碳水化合物代谢中有 107 个基因, 膜运输占 99 个基因, 注释到翻译的基因占 80 个基因, 核酸代谢占 68 个基因。



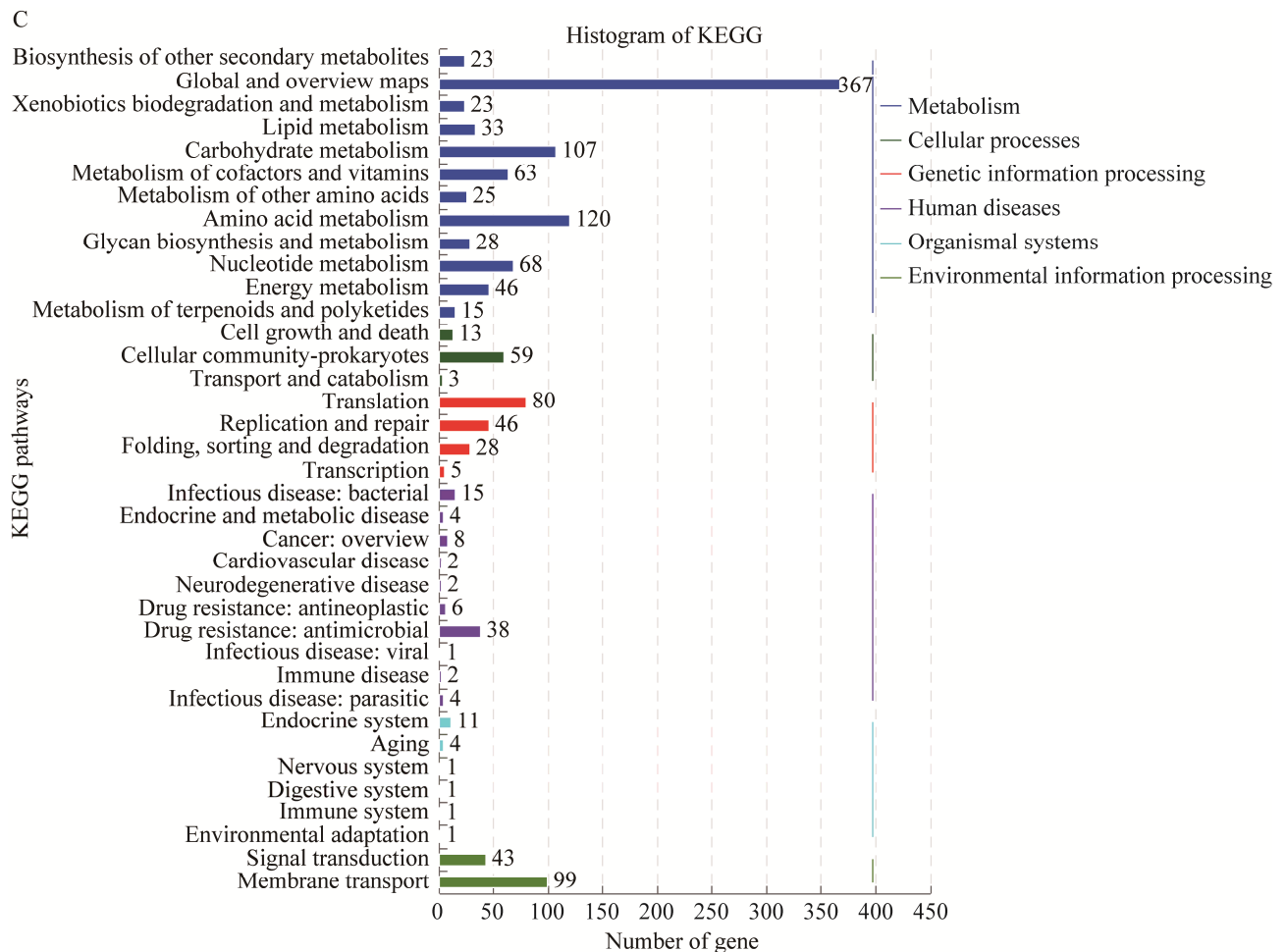


图 2 嗜热链球菌 IMAU20246 的 COG (A)、GO (B)和 KEGG (C)功能分类图

Figure 2 COG (A), GO (B) and KEGG (C) functional classification map of *Streptococcus thermophilus* IMAU20246.

2.3 嗜热链球菌 IMAU20246 EPS 基因簇

更好地了解 EPS 生物合成中涉及的基因功能对 EPS 生产至关重要。本研究通过基因组分析发现,嗜热链球菌 IMAU20246 染色体上存在一条完整的 EPS 基因簇,全长 18.1 kb,由 20 个开放阅读框(open reading frame, ORF)组成。其中和 EPS 生产相关的基因有 15 个,分别为 EPS 调控基因 *epsA* 和 *epsB*, 决定链长基因 *epsC*、*epsD*、*eps2C* 及 *eps2D*, 糖基转移酶 *epsE*、*epsF*、*epsG*、*epsH* 和 *epsJ*, 重复单元聚合和输出基因 *wzy*、*wzx* 和 *epsM*, 及 UDP-半乳

糖变位酶 *epsN* 等。此外在 EPS 基因簇 5'端上游是编码嘌呤核苷磷酸化酶基因 *deoD*, 主要参与核苷酸的生物合成和分解代谢, 基因簇 3'端下游是基因 *orf14.9*, 主要和细胞的增殖有关^[20]。将嗜热链球菌 IMAU20246 与嗜热链球菌 CNRZ1066、嗜热链球菌 ASCC1275、嗜热链球菌 CS6 及嗜热链球菌 ND-07 的 EPS 基因簇进行比对分析^[21-24] (图 3)。通过比较发现,嗜热链球菌 IMAU20246 与其他嗜热链球菌的 EPS 基因簇相对保守, 不同菌株 EPS 基因簇之间高度相似。

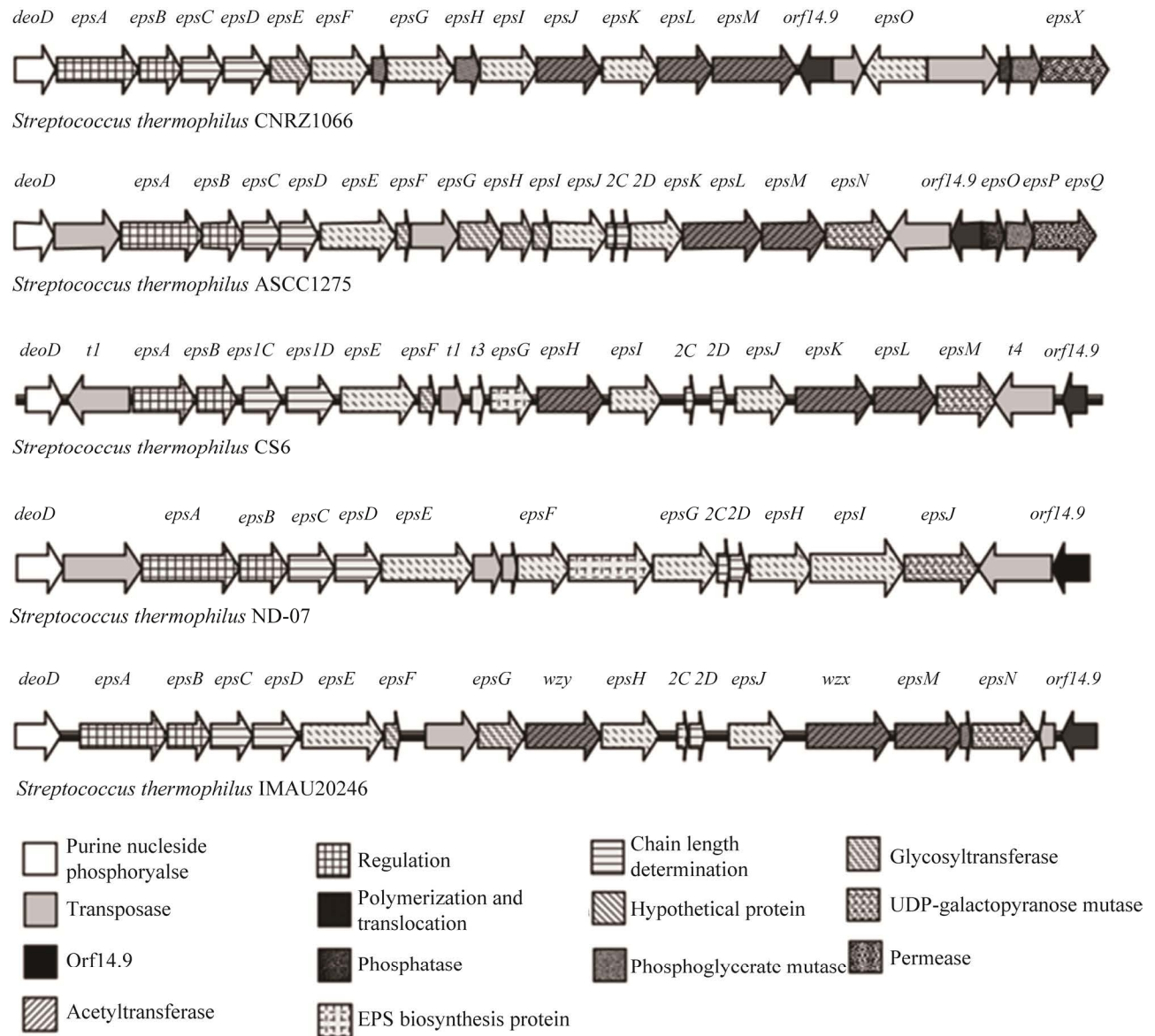


图3 嗜热链球菌 IMAU20246 与其他嗜热链球菌之间 EPS 基因簇的比较

Figure 3 Comparison of EPS gene clusters between *Streptococcus thermophilus* IMAU20246 and other *S. thermophilus*.

在嗜热链球菌 IMAU20246 中 *wzx* 编码翻转酶, *wzy* 编码聚合酶, 参与 EPS 重复单元的翻转和聚合^[25]。这 2 个基因分别在嗜热链球菌 ASCC1275 中编码 *epsL* 和 *epsM*, 负责重复单元的聚合和易位。此外在嗜热链球菌 CNRZ1066 中编码 *epsJ* 和 *epsL*, 在嗜热链球菌 CS6 中编码 *epsK* 和 *epsL*。携带 *wzx* 和 *wzy* 基因的菌株通过

Wzx/Wzy 依赖途径合成 EPS^[26], 因此推测嗜热链球菌 IMAU20246、嗜热链球菌 CNRZ1066、嗜热链球菌 ASCC1275 和嗜热链球菌 CS6 的 EPS 合成途径都是相同的。*epsM* 编码一种膜蛋白, 负责重复单元的输出, 与嗜热链球菌 CNRZ1066 的 *epsM* 及嗜热链球菌 ND-07 的 *epsI* 同源性较高。Zhou 等^[27]报道高 EPS 产量可能

与 EPS 聚合输出基因上调有关, 因此对其进行调控将是提高 EPS 产量的有效手段。在嗜热链球菌 IMAU20246 EPS 基因簇末端发现 UDP-半乳糖变位酶 *epsN*, 该酶可将 UDP-吡喃半乳糖转换成 UDP-呋喃半乳糖, 影响 EPS 重复单元的结构和单糖组成^[28]。在嗜热链球菌 ASCC1275、嗜热链球菌 CS6 及嗜热链球菌 ND-07 中均有发现。Zeidan 等^[29]报道 UDP-半乳糖变位酶是 LAB EPS 基因簇中常见基因, 参与 EPS 前体物质糖核苷酸的生物合成。此外在这 5 株嗜热链球菌 EPS 基因簇中还存在转座酶、假定蛋白、磷酸甘油酸变位酶以及磷酸酶等功能基因, 而这些基因如何参与 EPS 的生物合成有待后续深入研究。

2.4 碳水化合物活性酶分析

通过 CAZy 分析了嗜热链球菌 IMAU20246

碳水化合物活性酶功能基因, 共含有 45 个与碳水化合物代谢相关基因, 注释到 4 大类碳水化合物活性酶, 如图 4 所示, 分别为糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)、糖基转移酶(glycosyltransferases, GTs)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CEs)和碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding modules, CBMs)。其中 GHs 家族和 GTs 家族种类最多。GHs 家族在水解复杂碳水化合物方面具有很大的潜力, 被认为是参与碳水化合物代谢的关键酶, 能够有效利用代谢糖类, 从而形成多种糖核苷酸。GHs 共含有 22 种, CH13 是 GHs 家族中最大的序列家族, 主要编码寡糖降解酶。GTs 家族是编码糖基转移酶基因, 共含有 16 种, 其中 GT2、GT4 和 GT8 的数量较多, 糖基转移酶催化糖基从激活的供体分子到特定的受体分子的转移,

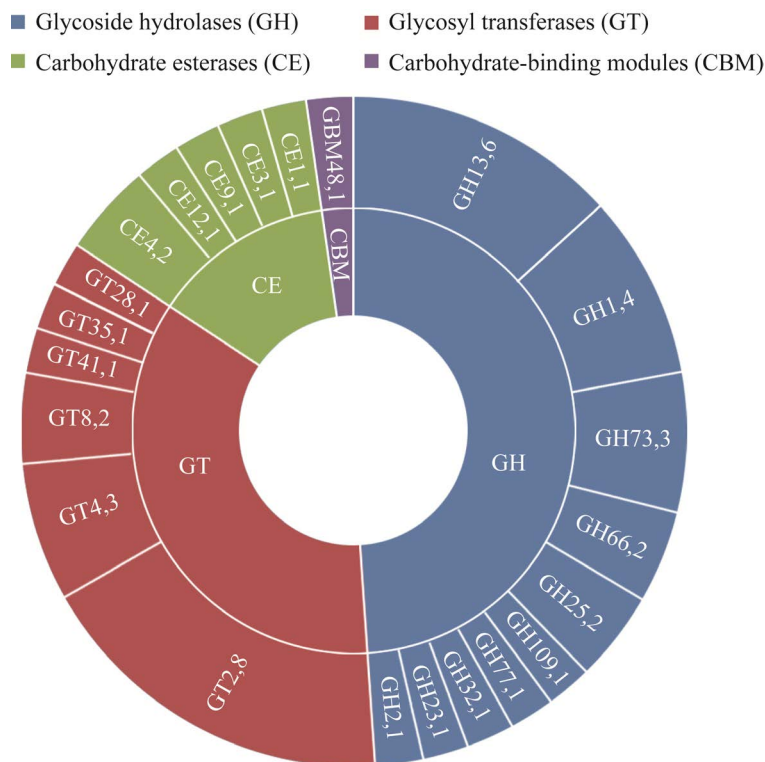


图 4 CAZy 在嗜热链球菌 IMAU20246 的分布

Figure 4 Distribution of CAZy in *Streptococcus thermophilus* IMAU20246.

从而形成糖苷键，可以转移各种糖核苷酸，形成 EPS 的重复单元^[30]。通过研究碳水化合物活性酶可以从基因组水平分析菌株利用碳水化合物能力。碳水化合物不仅可以为机体提供生命活动所必需的能量，而且还为细胞内的化学反应提供还原力，为细胞结构物质的合成提供中间代谢产物^[31]。

2.5 糖转运系统

碳水化合物是合成 EPS 的关键营养物质，其种类不仅影响 EPS 的产量，而且在不同碳源条件下合成的 EPS 在分子结构、活性和理化性质等方面也存在较大差异。通常有 3 种糖转运方式：磷酸烯醇式丙酮酸-磷酸转移酶系统 (PEP-PTS) 和 ABC 型糖转运系统及糖渗透酶^[32]。PEP-PTS 是主要的糖转运方式，由磷酸载体蛋白 HPr、能量耦合蛋白酶 EI 以及膜结合的具有糖特异性通透酶 EII 组成；EII 由 EIIA、EIIIB 与 EIIC 亚单位构成^[33]。如表 3 所示，嗜热链球菌 IMAU20246 基因组中含有 8 个糖特异性通透酶(EII)基因及 2 个糖渗透酶基因，分别是 PTS 甘露糖转运体亚基 EIIAB、EIIC 和 EIIC，

PTS 果糖转运体亚基 EIIABC，PTS 纤维二糖转运体亚基 EIIC，PTS 蔗糖转运体亚基 EIIABC，PTS 海藻糖转运体亚基 EIIABC 和 PTS 葡萄糖转运体亚基 EIIBC 及乳糖、半乳糖渗透酶和鼠李糖渗透酶。因此，从基因组层面可以推测嗜热链球菌 IMAU20246 代谢利用的碳源有葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖、乳糖、蔗糖、海藻糖及纤维二糖等。

2.6 EPS 生物合成途径

细菌 EPS 的生物合成机制一般有 4 种：(1) Wzx/Wzy-依赖途径；(2) ABC 转运体依赖途径；(3) 合成酶依赖途径；(4) 利用单个蔗糖酶蛋白进行细胞外合成途径^[34]。HoPS 由合成酶途径和细胞外生产途径合成，HePS 则主要由 Wzx/Wzy-依赖途径和 ABC 转运体依赖途径合成^[35]。嗜热链球菌 IMAU20246 合成 EPS 为 Wzx/Wzy-依赖途径，在 EPS 的生物合成过程中，糖核苷酸由数个糖基转移酶组装至位于细胞膜内的十一聚类异戊二烯醇磷酸酯(C55)上形成重复单元，然后由 *wzx* 蛋白在细胞膜上转运，由 *wzy* 蛋白在细胞表面聚合^[36]。

表 3 嗜热链球菌 IMAU20246 碳水化合物利用系统

Table 3 Carbohydrate utilization system of *Streptococcus thermophilus* IMAU20246

Encoded protein	Code base
Phosphotransferase system (PTS)	
PTS mannose-specific EIIAB component	fig 6666666.790943.peg.40
PTS mannose-specific EIIC component	fig 6666666.790943.peg.41
PTS mannose-specific EIID component	fig 6666666.790943.peg.42
PTS fructose-specific EIIABC component	fig 6666666.790943.peg.600
PTS cellobiose-specific EIIC component	fig 6666666.790943.peg.1564
PTS sucrose-specific EIIABC component	fig 6666666.790943.peg.1670
PTS trehalose-specific EIIABC component	fig 6666666.790943.peg.1835
	fig 6666666.790943.peg.1836
PTS glucose-specific EIIBC component	fig 6666666.790943.peg.2055
Permease	
Lactose and galactose permease	fig 6666666.790943.peg.1973
Rhamnose permease	fig 6666666.790943.peg.828

本实验根据 Xiong 等^[37]的相关研究报道结合 Rast 注释和 KEGG 代谢途径对嗜热链球菌 IMAU20246 可能的 EPS 生物合成途径进行预测 (图 5)。乳糖通过乳糖渗透酶(LacS)进入细胞内, 并被 β -半乳糖苷酶(LacZ)水解成葡萄糖和半乳糖, 葡萄糖激酶(GK)催化葡萄糖转化为葡萄糖-6-磷酸; 此外海藻糖和纤维二糖也被磷酸化成葡萄糖-6-磷酸, 葡萄糖-6-磷酸进入糖酵解途

径或在葡萄糖磷酸变位酶(PGM)的作用下转化成葡萄糖-1-磷酸, 在 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(GalU)的催化下合成糖核苷酸 UDP-葡萄糖; 又或在葡萄糖-1-磷酸胸苷转移酶(rfbA)作用下合成 dTDP-葡萄糖, 再经多种酶反应合成 dTDP-鼠李糖。半乳糖则经 Leloir 途径在醛糖 1-差向异构酶(GalM)、半乳糖激酶(GalK)和 UDP-半乳糖-1-磷酸-尿苷转移酶(GalT)下合成 UDP-半乳

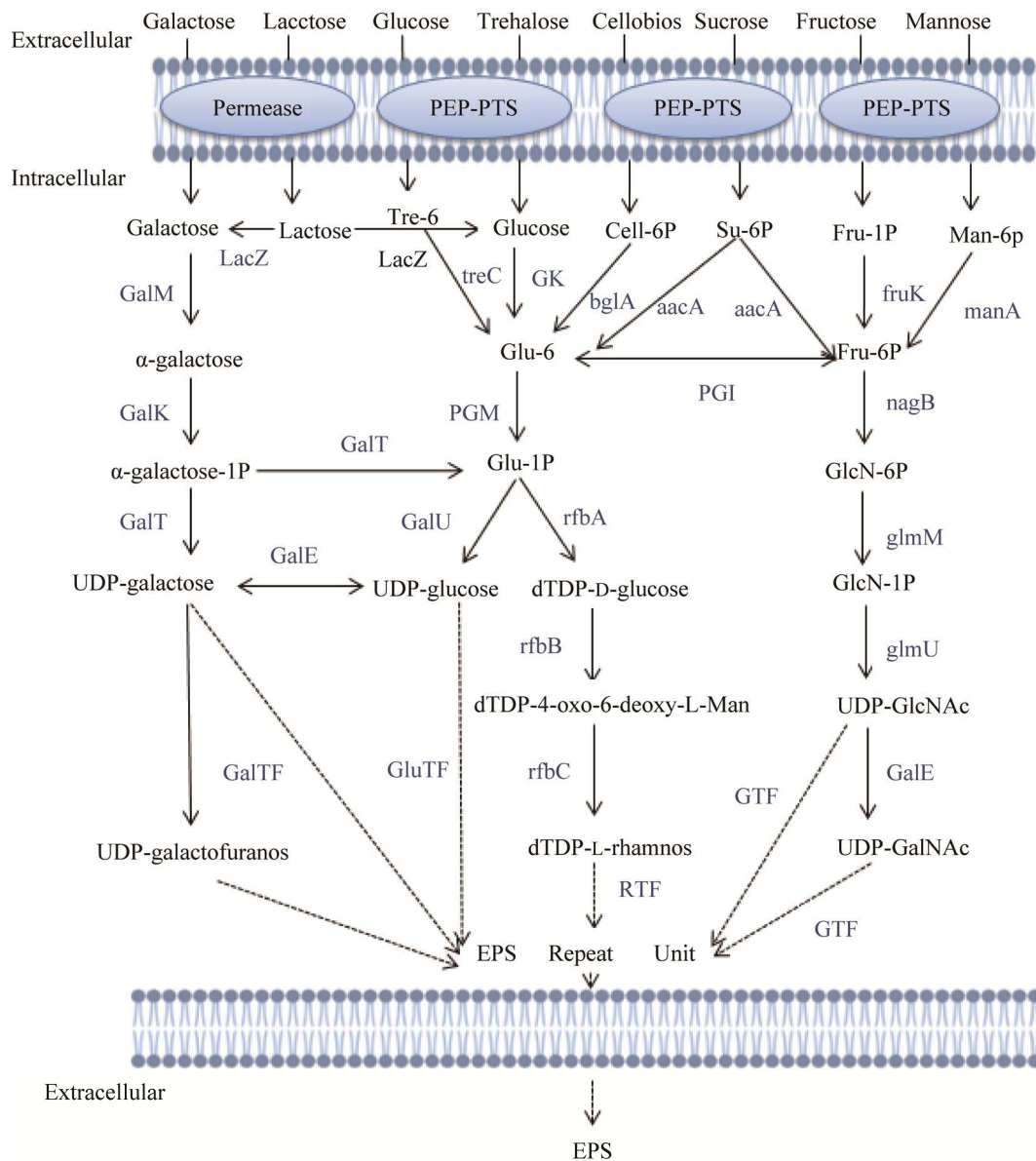


图 5 嗜热链球菌 IMAU20246 糖核苷酸的合成

Figure 5 Synthesis of sugar nucleotides in *Streptococcus thermophilus* IMAU20246.

糖或生成葡萄糖-1-磷酸；UDP-葡萄糖-4-差向异构酶(GalE)负责 UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖之间的相互转化。研究表明，编码合成糖核苷酸的关键酶 PGM、GalU 和 GalE 的基因表达水平和 EPS 的产量高度相关^[38]，嗜热链球菌 IMAU20246 基因组序列中 PGM 有 2 个拷贝数，GalE 有 4 个拷贝数，说明嗜热链球菌 IMAU20246 产生的 UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖之间可以相互转换，类似的结果在嗜热链球菌 KLDS SM 的 EPS 生物合成途径中也有发现^[39]。蔗糖、甘露糖和果糖分别由 PEP-sucrose PTS 途径、PEP-mannose PTS 途径及 PEP-fructose PTS 途径进入细胞内被磷酸化形成甘露糖-6-磷酸、果糖-6-磷酸和蔗糖-6-磷酸，三者之间相互转化，最终果糖-6-磷酸转化成 UDP-N-乙酰葡萄糖胺及 UDP-N-乙酰半乳糖胺。总之，嗜热链球菌 IMAU20246 可利用的碳源非常广泛，包括乳糖、葡萄糖、半乳糖、海藻糖、纤维二糖、蔗糖、果糖和甘露糖等，这些碳源在一系列酶的作用下可合成 7 种糖核苷酸，分别是 UDP-葡萄糖、dTDP-葡萄糖、dTDP-鼠李糖、UDP-半乳糖、UDP-呋喃半乳糖、UDP-N-乙酰葡萄糖胺和 UDP-N-乙酰半乳糖胺，然后在特异性糖基转

移酶 EpsE、EpsF、EpsG、EpsH 和 EpsJ 的催化下反应生成 EPS 重复单元，与内膜细胞质的脂质载体分子相连接，由 *wzx* 蛋白在细胞膜上转运，接着在 *wzy* 蛋白的作用下进一步聚合在细胞表面，最后由 EpsM 输出至细胞外形成 EPS。

2.7 实时荧光定量 PCR 结果

LAB 中 EPS 的合成是一个复杂的过程，涉及到 EPS 相关基因的表达调控。本实验采用 qRT-PCR 技术分析 EPS 基因簇在菌体生长不同时间点(6、12、18 和 24 h)的表达量及其对 EPS 合成的影响，结果如图 6 所示。*epsA* 和 *epsB* 在菌体培养 18 h (稳定期)时表达量达到峰值，分别是 24 h (衰亡期)表达量的 1.55 倍及 1.62 倍；*epsC* 和 *epsD* 的表达量在 18 h 时最高，而后开始下调，分别是 24 h 表达量的 2.21、1.97 倍。多糖输出基因 *epsM* 的表达水平也呈现先上调后下调的趋势，在菌体生长 18 h 时表达量最高。糖基转移酶基因 *epsE*、*epsF*、*epsH* 和 *epsJ* 是 EPS 生物合成的关键酶基因，在菌体生长的 6 h (对数期)时所有糖基转移酶基因的表达量均达到峰值，表明此时菌株将大量的单糖组合成重复单元，EPS 产量也达到最高。引导糖基转移酶基因 *epsE* 在培养 6 h 时表达量达到峰

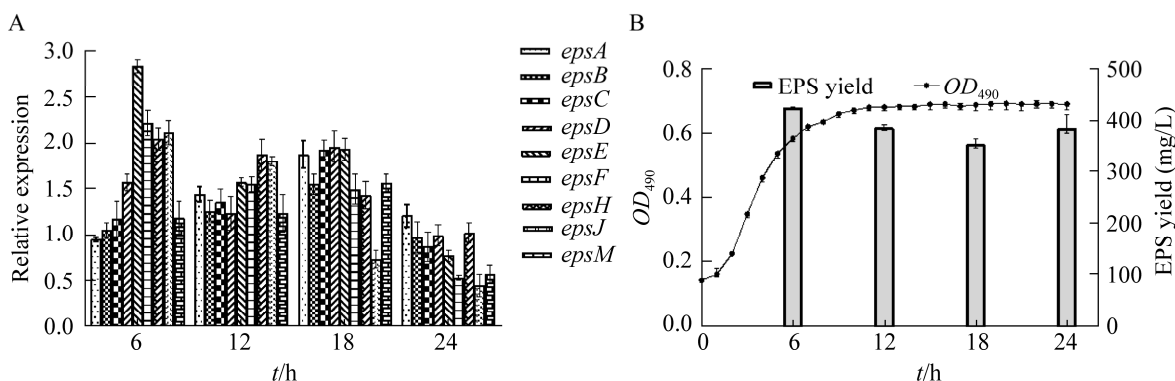


图 6 嗜热链球菌 IMAU20246 EPS 合成相关基因在不同生长阶段的相对表达量(A)及嗜热链球菌 IMAU20246 在 M17 培养基中的生长曲线与 EPS 产量(B)

Figure 6 Relative expression level of EPS synthesis related genes in different growth stages (A) and growth curve and EPS yield of *Streptococcus thermophilus* IMAU20246 in M17 medium (B). Data represent the means of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation.

值, 随后略有下降, 在 18 h 时又一次上调, 而 *epsF*、*epsH* 和 *epsJ* 的表达水平随着培养时间的延长呈现下调趋势。在培养 24 h 时, 菌体进入衰亡期, 所有基因的表达量均达到最低值。

EPS 基因簇是调控 EPS 产量的主要因素, 研究表明丧失 EPS 基因簇会导致菌株丧失合成 EPS 的能力^[40]。Song 等^[41]研究了干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) LC2W 中 EPS 基因与 EPS 合成的关系, 发现当 EPS 合成基因被敲除时, EPS 的产量会降低, 而过表达 EPS 合成基因则 EPS 产量会显著增加。而 EPS 基因簇上单一基因也会影响其产量, Minic 等^[42]研究发现对 *epsC*、*epsD* 和 *epsE* 单个基因进行敲除能够影响嗜热链球菌 EPS 的产量。Dertli 等^[43]报道了敲除 *epsA* 会导致约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsonii*) FI9785 EPS 的合成完全丧失。此外, 糖基转移酶活性可影响 EPS 产量, Stingle 等^[44]通过过表达糖基转移酶实现嗜热链球菌 Sfi6 EPS 产量的提高。Dabour 等^[45]研究发现当乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SMQ-461 的引导糖基转移酶基因发生突变时, 该菌株丧失了生产 EPS 的能力。熊永刚^[46]也研究发现当过表达引导糖基转移酶可使植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) YM-4-3 EPS 产量显著提升。在本研究中引导糖基转移酶 *epsE* 在培养 6 h 时表达量最高, 此时 EPS 产量也达到最高。

3 结论

嗜热链球菌 IMAU20246 基因组上有一个完整的 EPS 基因簇, 负责 EPS 的调控、链长长度、聚合及输出。通过 CAZy 分析发现嗜热链球菌 IMAU20246 含有丰富的糖苷水解酶及糖基转移酶。嗜热链球菌 IMAU20246 具有葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖、乳糖、海藻糖、纤维二糖及蔗糖转运系统, 能合成 UDP-葡萄

糖、dTDP-葡萄糖、dTDP-鼠李糖、UDP-半乳糖、UDP-呋喃半乳糖、UDP-N-乙酰葡萄糖胺和 UDP-N-乙酰半乳糖胺等。qRT-PCR 分析结果表明嗜热链球菌 IMAU20246 的 EPS 基因簇在细胞生长过程中均能表达, 特别是糖基转移酶基因 *epsE*、*epsF*、*epsH* 和 *epsJ* 在培养 6 h 时表达量最高, 此时 EPS 产量达到最高。

参考文献

- [1] PURWANDARI U, SHAH NP, VASILJEVIC T. Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt[J]. *International Dairy Journal*, 2007, 17(11): 1344-1352.
- [2] FREITAS F, ALVES VD, REIS MAM. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(8): 388-398.
- [3] PATEL S, MAJUMDER A, GOYAL A. Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2012, 52(1): 3-12.
- [4] KORCZ E, VARGA L. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: techno-functional application in the food industry[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 110: 375-384.
- [5] BECKER A. Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 687.
- [6] 孔令慧, 赵林森, 夏永军, 张汇, 艾连中, 熊智强. 嗜热链球菌胞外多糖生物合成的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(2): 284-290.
KONG LH, ZHAO LS, XIA YJ, ZHANG H, AI LZ, XIONG ZQ. Research advance in the exopolysaccharide biosynthesis of *Streptococcus thermophilus*[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(2): 284-290 (in Chinese).
- [7] MALICK A, KHODAEI N, BENKERROUM N, KARBOUNE S. Production of exopolysaccharides by selected *Bacillus* strains: optimization of media composition to maximize the yield and structural characterization[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 539-549.

- [8] FENG YY, YAO MD, WANG Y, DING MZ, ZHA J, XIAO WH, YUAN YJ. Advances in engineering UDP-sugar supply for recombinant biosynthesis of glycosides in microbes[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 41: 107538.
- [9] SOUMYA MP, NAMPOOTHIRI KM. 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.
- [10] STINGELE F, NEESER JR, MOLLET B. Identification and characterization of the *eps* (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(6): 1680-1690.
- [11] BAI Y, SUN EN, SHI YD, JIANG YY, CHEN Y, LIU SL, ZHAO L, ZHANG M, GUO HY, ZHANG H, MU ZS, REN FZ. Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* MN-BM-A01, a strain with high exopolysaccharides production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 224: 45-46.
- [12] ZISU B, SHAH NP. Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275[J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(11): 3405-3415.
- [13] LUO RB, LIU BH, XIE YL, LI ZY, HUANG WH, YUAN JY, HE GZ, CHEN YX, PAN Q, LIU YJ, TANG JB, WU GX, ZHANG H, SHI YJ, LIU Y, YU C, WANG B, LU Y, HAN CL, CHEUNG DW, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler[J]. *GigaScience*, 2012, 1(1): 18.
- [14] OVERBEEK R, OLSON R, PUSCH GD, OLSEN GJ, DAVIS JJ, DISZ T, EDWARDS RA, GERDES S, PARRELLO B, SHUKLA M, VONSTEIN V, WATTAM AR, XIA FF, STEVENS R. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST)[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D206-D214.
- [15] 李柏良, 赵莉, 王成凤, 靳姐, 丁秀云, 刘飞, 霍贵成. 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 BL, ZHAO L, WANG CF, JIN D, DING XY, LIU F, HUO GC. Genomic and phenotypic characterization of the biosynthesis pathway of exopolysaccharides in *Streptococcus thermophilus* KLDS3.1012[J]. *Food Science*, 2019, 40(6): 136-142 (in Chinese).
- [16] JIA DX, SUN CY, JIN YT, LIU ZQ, ZHENG YG, LI M, WANG HY, CHEN DS. 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.
- [17] LOUVEAU T, ORME A, PFALZGRAF H, STEPHENSON MJ, MELTON R, SAALBACH G, HEMMINGS AM, LEVEAU A, REJZEK M, VICKERSTAFF RJ, LANGDON T, FIELD RA, OSBOURN A. Analysis of two new arabinosyltransferases belonging to the carbohydrate-active enzyme (CAZY) glycosyl transferase family1 provides insights into disease resistance and sugar donor specificity[J]. *The Plant Cell*, 2019, 30(12): 3038-3057.
- [18] 田佳乐, 刘洋, 李嘉雯, 乔少婷, 胡海敏, 丹彤. 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 JL, LIU Y, LI JW, QIAO ST, HU HM, DAN T. 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 (in Chinese).
- [19] SUN Y, LI Y, LUO DZ, LIAO DJ. Pseudogenes as weaknesses of *ACTB* (*actb*) and *GAPDH* (*gapdh*) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e41659.
- [20] ZHOU Y, CUI YH, QU XJ. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure, bioactivity and associations: a review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 207: 317-332.
- [21] BOLOTIN A, QUINQUIS B, RENAULT P, SOROKIN A, EHRlich SD, KULAKAUSKAS S, LAPIDUS A, GOLTSMAN E, Mazur M, Pusch GD, FONSTEIN M, OVERBEEK R, KYPRIDES N, PURNELLE B, PROZZI D, NGUI K, MASUY D, HANCY F, BURTEAU S, BOUTRY M, et al. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(12): 1554-1558.
- [22] WU QL, TUN HM, LEUNG FCC, SHAH NP. Genomic insights into high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4974.

- [23] ZHOU Y, CUI YH, SUO C, WANG Q, QU XJ. Structure, physicochemical characterization, and antioxidant activity of the highly arabinose-branched exopolysaccharide EPS-M2 from *Streptococcus thermophilus* CS6[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 192: 716-727.
- [24] 钟智, 孙天松, 陈永福. 基因组分析揭示 *Streptococcus thermophilus* ND-07 富产胞外多糖分子机制[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(4): 9-11, 21. ZHONG Z, SUN TS, CHEN YF. Genomic insights into the high exopolysaccharides-producing bacterium *Streptococcus thermophilus* ND-07[J]. China Dairy Industry, 2018, 46(4): 9-11, 21 (in Chinese).
- [25] LIU MA, MORRIS P, REEVES PR. Wzx flippases exhibiting complex O-unit preferences require a new model for Wzx-substrate interactions[J]. MicrobiologyOpen, 2019, 8(3): e00655.
- [26] 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.
- [27] ZHOU Y, CUI YH, QU XJ. Comparative transcriptome analysis for the biosynthesis of antioxidant exopolysaccharide in *Streptococcus thermophilus* CS6[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(12): 5321-5332.
- [28] 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.
- [29] ZEIDAN AA, POULSEN VK, JANZEN T, BULDO P, DERKX PMF, ØREGAARD G, NEVES AR. Polysaccharide production by lactic acid bacteria: From genes to industrial applications[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(Supp_1): S168-S200.
- [30] 宋宇琴. 德氏乳杆菌保加利亚亚种的群体遗传学和功能基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2018. SONG YQ. Study on population genetics and functional genomics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [31] PALEVICH N, KELLY WJ, LEAHY SC, DENMAN S, ALTERMANN E, RAKONJAC J, ATTWOOD GT. Comparative genomics of rumen *Butyrivibrio* spp. uncovers a continuum of polysaccharide-degrading capabilities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 86(1): e01993-e01919.
- [32] CUI YH, XU TT, QU XJ, HU T, JIANG X, ZHAO CY. New insights into various production characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(10): 1701.
- [33] CUI YH, JIANG X, HAO MY, QU XJ, HU T. New advances in exopolysaccharides production of *Streptococcus thermophilus*[J]. Archives of Microbiology, 2017, 199(6): 799-809.
- [34] MOHD NADZIR M, NURHAYATI RW, IDRIS FN, NGUYEN MH. Biomedical applications of bacterial exopolysaccharides: a review[J]. Polymers, 2021, 13(4): 530.
- [35] 丁秀云, 蒙月月, 李柏良, 霍贵成. 嗜热链球菌 KLDSSM 胞外多糖生物合成途径的分析[J]. 食品工业科技, 2017, 38(12): 151-156. DING XY, MENG YY, LI BL, HUO GC. Genetic analysis and preliminary determination of production of exopolysaccharide of *Streptococcus thermophilus* KLDS SM[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(12): 151-156 (in Chinese).
- [36] SCHMID J, SIEBER V, REHM B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 496.
- [37] XIONG ZQ, KONG LH, LAI PFH, XIA YJ, LIU JC, LI QY, AI LZ. Genomic and phenotypic analyses of exopolysaccharide biosynthesis in *Streptococcus thermophilus* S-3[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(6): 4925-4934.
- [38] CHEN Y, ZHANG M, REN FZ. A role of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* in the intestinal inflammation and mucosal barrier in caco-2 monolayer and dextran sulphate sodium-induced experimental murine colitis[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2019, 24(3): 513.
- [39] LI BL, DING XY, EVIVIE SE, DA JIN, MENG YY, HUO GC, LIU F. Short communication: genomic and phenotypic analyses of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* KLDS SM[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(1): 106-112.
- [40] BOELS IC, van KRANENBURG R, KANNING MW, CHONG BF, de VOS WM, Kleerebezem M. Increased exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* due to increased levels of expression of the NIZO B40 eps gene cluster[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 5029-5031.

- [41] SONG X, XIONG ZQ, KONG LH, WANG GQ, AI LZ. Relationship between putative *eps* genes and production of exopolysaccharide in *Lactobacillus casei* LC2W[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1882.
- [42] MINIC Z, MARIE C, DELORME C, FAURIE JM, MERCIER G, EHRLICH D, RENAULT P. Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(4): 1351-1357.
- [43] DERTLI E, MAYER MJ, COLQUHOUN IJ, NARBAD A. *epsA* is an essential gene in exopolysaccharide production in *Lactobacillus johnsonii* FI9785[J]. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(4): 496-501.
- [44] STINGELE F, NEWELL JW, NEESER JR. Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(20): 6354-6360.
- [45] 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.
- [46] 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: 昆明理工大学硕士学位论文, 2021.
- XIONG YG. Effect of overexpression of priming glycosyltransferase on exopolysaccharide synthesis of *Lactobacillus plantarum* YM-4-3[D]. Kunming: Master's Thesis of Kunming University of Science and Technology, 2021 (in Chinese).