

长双歧杆菌 A17 胞外多糖合成基因簇的分析

张文丽, 王英, 石莹, 呼鑫荣, 旭日花*

(内蒙古大学 生命科学学院, 内蒙古自治区 呼和浩特 010021)

摘要: 为探究长双歧杆菌 A17 胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)生物合成途径, 作者依托全基因组测序, 利用 eggNOG-mapper、KEGG、GO 数据注释和局部序列比对等方法对 EPS 合成相关的基因进行注释与同源性分析。根据同源性分析得到一个长度约为 20 kb 由 19 个基因组成的 A17 *eps* 基因簇, 预测到 EPS 前体糖核苷酸合成途径, 同时发现该途径中的关键基因 *pgm* 并进行了异源表达。*eps* 基因簇负责 *eps* 单体重复单元合成以及输出相关的 EPS 合成过程, 在 EPS 前体糖核苷酸合成途径中双歧杆菌 A17 利用葡萄糖、乳糖形成 UDP-Gal、UDP-Glc 两种前体糖核苷酸。其中, *pgm* 编码 1→6 葡萄糖磷酸变位酶, 该酶的产量和活性与 EPS 合成有关。

关键词: 双歧杆菌; 胞外多糖; 基因簇; 异源表达

中图分类号: Q 939.37

文章编号: 1673-1689(2023)10-0009-07

DOI: 10.12441/spyswjs.20220329001

Analysis of Synthetic Gene Cluster of *Bifidobacterium longum* A17 Exopolysaccharides

ZHANG Wenli, WANG Ying, SHI Ying, HU Xinrong, XU Rihua*

(School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China)

Abstract: To investigate the biosynthesis pathway of exopolysaccharides (EPS) in *Bifidobacterium longum* A17, the authors relied on the whole-genome sequencing, and EPS synthesis-related genes were annotated and subjected to homology analysis using eggNOG-mapper, KEGG, GO data annotation, and local sequence alignments. According to the homology analysis, an A17 *eps* gene cluster consisting of 19 genes with a length of approximately 20 kb was obtained. The synthesis pathway of the precursor glyconucleotides of EPS was predicted, and the key gene *pgm* involved in the pathway was found and heterologously expressed. The *eps* gene cluster is responsible for the synthesis of *eps* monomer repeat units and the subsequent EPS synthesis process related to the export. In the EPS precursor glyconucleotide synthesis pathway, *Bifidobacterium longum* A17 utilizes glucose and lactose to form 2 precursor glyconucleotides, UDP-Gal and UDP-Glc. Among them, *pgm* encodes 1→6 glucose phosphomutase, whose production and activity are enzyme related to EPS synthesis.

Keywords: *Bifidobacterium*, exopolysaccharides, gene cluster, heterologous expression

收稿日期: 2022-03-29 修回日期: 2022-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860433); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2018MS03026)。

* 通信作者: 旭日花(1981—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事益生菌及其活性代谢产物的理论与应用研究。

E-mail: xurihua81@126.com

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是一种高 G+C 含量的厌氧革兰氏阳性杆状菌,属放线菌门^[1],1899 年由 Tissier 首次从婴儿粪便中分离得到^[2]。作为人出生后肠道内最早的细菌定植者之一^[3],其数量和组成随时间和年龄而变化^[4-5]。根据不同年龄段人肠道内存在的菌种不同可将双歧杆菌分为:婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)、青春双歧杆菌(*B. adolescentis*)、长双歧杆菌(*B. longum*)等^[6]。双歧杆菌作为一种益生菌,被认为主要通过提供营养和非营养的化合物来促进宿主新陈代谢进而维护宿主的健康^[7]。同时双歧杆菌的其他积极作用表现在缓解肠道疾病方面,例如肠易激综合征(IBS)和炎症性肠病(IBD)等^[8-9]。双歧杆菌 EPS 是双歧杆菌在生长代谢过程中分泌的一类长链聚合物,根据其相对于菌体的位置分为荚膜多糖和黏液多糖。因 EPS 具有抑菌、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等多种生物活性,因此,能够产生 EPS 的双歧杆菌在相关益生菌研究中具有重要的应用价值和广阔的应用前景。

胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是一种存在于大多数细菌中的碳水化合物聚合物,它们可以松散附着在细菌细胞表面或释放到周围的细胞环境,既作为细菌保护性表层,也与周围环境发生相互作用^[10]。多年来,对细菌胞外多糖研究的热度一直有增无减,不仅仅因为它们对生物膜形成的贡献,更重要的是因为 EPS 是几种传染病的潜在的毒力因子^[11]。近几年由于发现 EPS 能够调节与周围环境的交流以及它们对宿主健康维护的贡献及其在食品、化妆品和医药方面的潜在应用使得对 EPS 的研究受到更大的关注^[11]。

EPS 合成分为糖核苷酸合成和 *eps* 基因簇合成 2 个阶段。糖类经转运系统由细胞外转运到细胞内,再经一系列酶促反应生成糖核苷酸。糖核苷酸作为合成 EPS 的前体物质,在 *pgmA*、*galE*、*galU* 等管家基因和 *eps* 基因簇的调控下完成 EPS 的合成、聚合以及向细胞外输出等^[12]。在乳酸菌菌株中指导 EPS 合成的基因首次在 *Streptococcus thermophilus* Sfi6 被报道,该簇长为 14.5 kb,由 13 个基因组成^[13]。据报道,乳酸菌 EPS 生物合成过程中各前体物质和酶,均已被证明能够影响 EPS 的产量^[14]。其中 *Lactococcus lactis* strain NIZO B40 菌株含有一个 42.2 kb EPS 质粒,存在一个 12 kb *eps* 操纵子。将整个 NIZO B40 *eps* 基因簇克隆到高拷贝数载体

pIL253 中,导致 EPS 生产水平几乎增加了 4 倍^[15]。然而,*eps* 基因簇并不是影响 EPS 生物合成的唯一决定性因素。Welman 等人研究表明 6-磷酸葡萄糖似乎是连接 EPS 合成代谢途径和糖酵解分解代谢途径的中间关键体^[16]。这些结果表明 EPS 生物合成机制在不同的菌株中是不同的、复杂的。

目前,相较于乳酸菌的其他种属,双歧杆菌 EPS 合成相关基因及其生物工程改造方面的研究报道较少。因此,作者阐明 EPS 前体糖核苷酸合成途径并寻找与 EPS 合成相关的基因簇,在此基础上将 EPS 合成相关的基因进行异源表达,为进一步探索 EPS 合成途径提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

长双歧杆菌 A17:分离自健康婴儿粪便,保存于内蒙古大学生命科学学院;pET-28a 质粒:北纳生物颂司产品;大肠杆菌感受态细胞 DH5 α :Trans Gen Biotech 产品;MRS 培养基:北京陆桥公司产品;溶菌酶:天根生化公司产品;细菌基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化公司产品;Quick DNA Purification Kit DNA 产物纯化试剂盒、Plasmid Mini Kit 质粒小提试剂盒、Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒:CWBIO 公司产品;T4 DNA Ligase:TaKaRa 公司产品。

1.2 仪器

超净工作台:南京 MDS 公司产品;LRH-250 型生化培养箱:上海一恒科学仪器公司产品;YU-1810 型紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器公司产品;琼脂糖凝胶电泳仪:BIO-RAD 公司产品;PCR 扩增仪:德国 Jena 分析仪器公司产品;核酸浓度检测仪:Themro 公司产品。

1.3 研究方法

1.3.1 生物信息学分析 使用基于 IlluminaMiSeq 测序平台的二代测序技术和基于 PacBio 测序平台的三代测序技术对文库进行测序后,采用 NCBI 公认的原核生物编码基因预测软件 GeneMarkS 对所有基因进行预测。最后使用 eggNOG-mapper、KAAS 自动化注释系统、InterPro、BLASTP 等软件进行生物信息学分析。

1.3.2 重组表达载体的构建

1) PCR 引物设计 根据 NCBI 数据库中长双歧杆菌 *pgm* 基因完整序列,设计引物并交由华大科

技公司合成(见表 1)。PCR(25 μ L 体系)反应条件: 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 6 min。
95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min、95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、57 $^{\circ}$ C 退火 30 s、PCR 扩增后电泳检测,并进行胶回收、纯化。

表 1 PCR 扩增所用引物及其序列

Table 1 Primers and their sequences used for PCR amplification

| 引物 | 序列(5'→3') |
|-------------------|---|
| PF _{pgm} | 5-CGGGATCCGTGGCAGAATAGGGAGCAT-3(下划线部分为 <i>Bam</i> H I 酶切位点) |
| PR _{pgm} | 5-CCGAAGCTTGCTAACGCAGCGATTTC-3(下划线部分为 <i>Hind</i> III 酶切位点) |

2) pET28a-pgm 重组表达载体的构建 用质粒提取试剂盒从大肠杆菌中提取 pET-28a 质粒,提取的质粒和克隆后测序正确的 *pgm* 基因分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶双酶切,酶切后的混合物用 Quick DNA Purification Kit DNA 产物纯化试剂盒纯化,16 $^{\circ}$ C 连接 14 h。连接体系(10 μ L):1 μ L 10 \times T4 连接缓冲液,1 μ L T4 DNA 连接酶,1 μ L 双酶切后的 pET28a 载体,3 μ L 双酶切后的 *pgm* 基因,4 μ L ddH₂O。

3) 重组质粒 pET28a-pgm 的转化与鉴定 取 50 μ L DH5 α 与重组质粒混合,冰上放置 30 min,42 $^{\circ}$ C 水浴热击 90 s,迅速置于冰上冷却 5 min,加入 1 mL LB 液体培养基(不含 Kan)中,37 $^{\circ}$ C 培养 1 h 完成转化。转化完成的菌液涂布于 LB 固体平板上(含 Kan),37 $^{\circ}$ C 培养 18 h 筛选阳性重组子。随机挑取 4 个阳性重组子单菌落进行菌落 PCR。将挑取的单菌落悬浮于 20 μ L 质量分数 10%的 TritonX-100 细胞裂解液中,置于沸水浴 3 min,使细胞裂解,以裂解液为模板,进行 PCR 并电泳检测。挑取电泳条带正确的菌落,PCR 的副板单菌落于 5 mL LB 液体培养基(含 kan 50 μ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12 h。用 Plasmid Mini Kit 质粒提取试剂盒提取质粒,送测序。同时对重组质粒进行双酶切和电泳检测,鉴定 pET28a-pgm 重组表达载体是否构建成功。重组成功的大肠杆菌在甘油管中保种,-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

4) 重组质粒的诱导表达 抗性平板上挑取单菌落,加入 20 mL 含卡那抗性的 LB 液体培养基,过夜摇菌,以体积分数 1%的接种转接于 50 mL 含卡那抗性的 LB 液体培养基,待菌液的 OD 值为 0.6 时,加入 0.4 mmol/L 的 IPTG,16 $^{\circ}$ C 诱导表达 12 h,使蛋白表达量达到最大。用 5 mL NTA-0 平衡缓冲液悬浮破碎菌液;10 000 g ,20 min 离心;用 5 mL NTA-0 重悬沉淀;将上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

5) 目的蛋白的分离与纯化 将上清液进行

His-tag 亲和层析(Invitrogen[®]),层析产物浓缩后进行凝胶电泳,检测目的重组蛋白质。层析产物进一步用 AKTA Purifier 分子筛去除其他的杂蛋白质,收集特定峰所对应的样品,SDS-PAGE 凝胶电泳检测验证是否获得了高纯度目的重组蛋白质。以牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum,BSA)作为标准品,用 Bradford 法测定目的蛋白质质量浓度。

2 结果与分析

2.1 EPS 基因簇预测结果

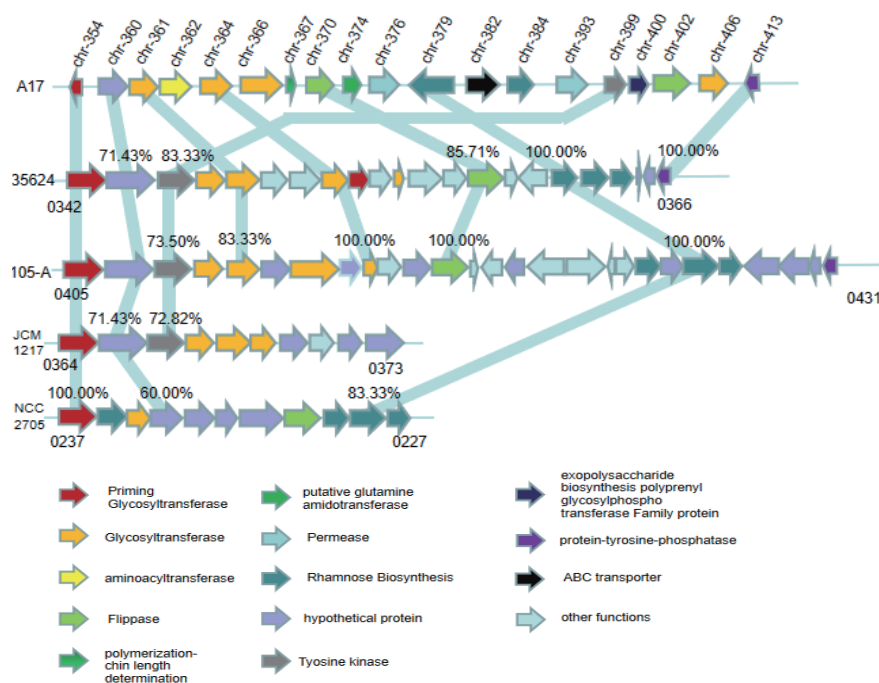
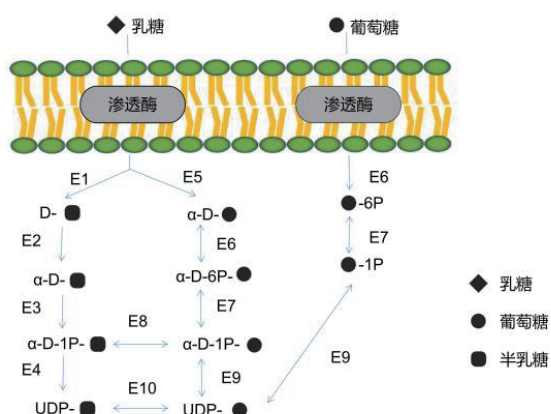
以已报道的双歧杆菌 EPS 基因簇为基础,利用不同双歧杆菌此类簇边界处的保守区域进行分析后,发现双歧杆菌 A17 存在一个由 19 个基因(chr-354 到 chr-413)组成的,长度约为 20 kb 的簇,命名为 A17 *eps* 基因簇。EPS 基因簇结果如图 1 所示。

2.2 EPS 前体糖核苷酸生物合成途径分析

据图 2 分析得知,乳糖可被 lacZ 和 LCT 编码的乳糖酶水解为 D-半乳糖和 α -D 葡萄糖,再经半乳糖激酶(galK)、葡萄糖磷酸变位酶(pgm)以及 UDP-糖焦磷酸化酶(USP)等的作用下分别转化形成 UDP-半乳糖和 UDP-葡萄糖。其中,UDP-半乳糖和 UDP-葡萄糖之间可经 UDP 葡萄糖-4-表异构酶(galE)相互进行转化。经乳糖代谢产生的 UDP 葡萄糖可与新的 1-磷酸半乳糖反应生成 1-磷酸葡萄糖,也可进入糖原合成通路参与糖原的合成。葡萄糖经葡萄糖激酶(glk)转化为葡萄糖六磷酸,磷酸葡萄糖变位酶(pgm)使葡萄糖 6-磷酸进一步形成葡萄糖 1-磷酸,产物再经 UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶(galU)、UDP-糖焦磷酸化酶(USP)转变最后形成 UDP-葡萄糖。因此,长双歧杆菌 A17 菌株利用葡萄糖,乳糖,通过以上方式形成 2 种糖核苷酸(UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖)。为后续合成 EPS A17 提供原材料,EPS A17 的结构已另文发表^[20]。

2.3 pET28a-pgm 重组表达载体的构建与鉴定

pgm 基因的 PCR 扩增产物电泳结果如图 3 所

图 1 A17 *eps* 基因簇与其他 EPS 基因簇的比较分析结果Fig. 1 Comparative analysis results of A17 *eps* gene cluster and other EPS gene clusters

E1:β-半乳糖苷酶;E2:醛糖 1-差向异构酶;E3:半乳糖激酶;E4:UDP-糖焦磷酸化酶;E5:乳糖酶-根皮苷水解酶;E6:葡萄糖激酶;E7:葡萄糖磷酸变位酶;E8:UDP-葡萄糖-己糖-1-磷酸尿苷酰转移酶;E9:UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶;E10:UDP-葡萄糖-4-差向异构酶。

图 2 长双歧杆菌 A17 糖核苷酸合成途径

Fig. 2 Synthesis pathway of *B. longum* A17 glyconucleotide

示。菌落 PCR 的扩增结果如图 4 所示。

电泳结果显示,基因片段大小接近 1 700 bp 左右与目标片段(1 677 bp)长度吻合。菌落 PCR 结果表明该载体成功转化到大肠杆菌中。pET28a-*pgm* 重组表达载体构建及双酶切电泳结果如图 5 所示。

在图 5 中,1 号泳道为空 pET-28a 质粒载体,长

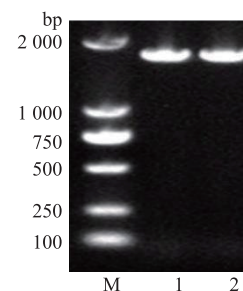
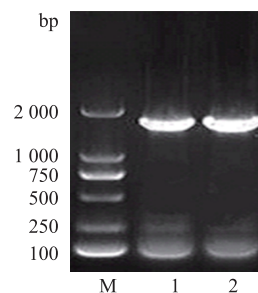
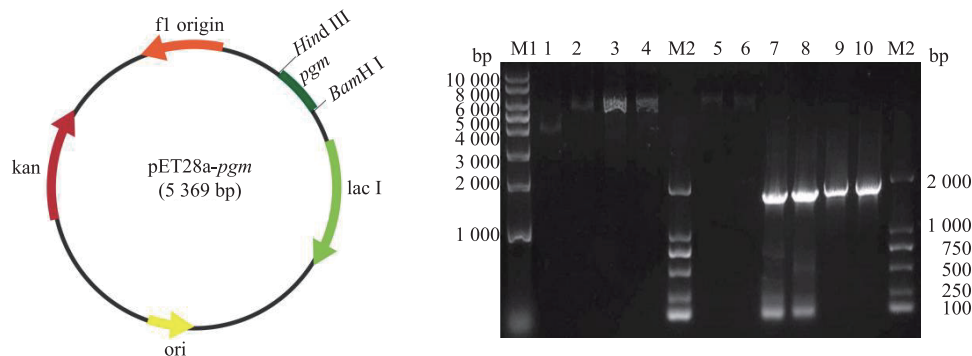
图 3 *pgm* 基因的 PCR 扩增产物电泳图Fig. 3 Electrophoresis of the PCR amplification product of gene *pgm*

图 4 菌落 PCR 的扩增电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of colony PCR amplification

度为 5 369 bp,但是电泳图中的克隆片段为 4 000~7 000 bp,这是由于在 4 000~7 000 bp 区域中质粒超螺旋形式的比例最大,与线状 DNA 和开环 DNA 相比,超螺旋 DNA 电泳速度最快,因此 4 000~5 000



M1:1kb DNA Ladder;1:pET28a 质粒;2: 空pET28a 质粒酶切产物;3、4:pET28a-pgm 重组表达载体;M2:DL2000 Marker;5、6:pET28a-pgm 重组表达载体酶切产物;7、8:pET28a-pgm 重组表达载体 PCR 产物;9、10:pgm 基因 PCR 扩增产物。

图 5 pET28a-pgm 重组表达载体构建及相关产物的电泳结果

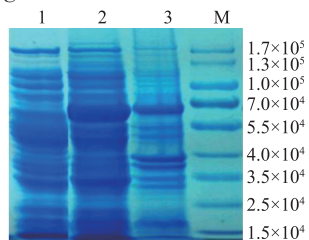
Fig. 5 Electrophoresis results of the pET28a-pgm recombinant expression vector construction and related products

bp 出现最亮的条带。2 号泳道为空载体双酶切产物,酶切后电泳速度要比原载体慢,故在 5 000~6 000 bp 出现最亮的条带。3、4 号泳道的扩增片段长度大约 7 000 bp 左右,与 pET28a-pgm 重组表达载体序列长度的 6 974 bp 吻合。5、6 号泳道为 pET28a-pgm 重组表达载体的双酶切产物,电泳图中 *pgm* 基因浓度太低,条带不明显。7、8 号泳道为 pET28a-pgm 重组表达载体的 PCR 产物,扩增片段大小在 1 700 bp 左右,符合 *pgm* 基因长度。9、10 号泳道作为阳性对照(A17 中 *pgm* 基因的 PCR 扩增产物)。

将 pET28a-pgm 重组表达载体的测序结果 BLASTx 比对分析,结果显示重组表达载体中的 *pgm* 基因序列与网站中序列完全匹配,证明重组表达载体中的 *pgm* 基因就是 EPS 合成过程中编码葡萄糖磷酸变位酶的关键基因。

2.4 目的重组蛋白质的表达与纯化

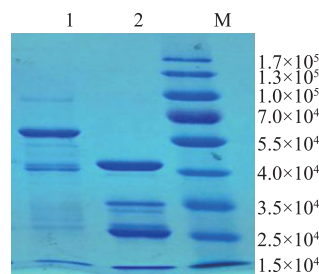
活化重组成功的大肠杆菌,用 IPTG 诱导其表达目的蛋白质。诱导后离心菌液,对上清液和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图 6 所示。诱导产物用 His-tag 亲和层析纯化,结果如图 7 所示。



1: 未经诱导上清液;2: IPTG 诱导上清;3: IPTG 诱导沉淀;M: Marker。

图 6 IPTG 诱导蛋白质表达结果

Fig. 6 Results of IPTG-induced protein expression



1: 亲和层析目的蛋白质;2: 亲和层析杂蛋白质;M: Marker。

图 7 亲和层析纯化结果

Fig. 7 Affinity chromatography results

目的蛋白质的相对分子质量约为 60 000 左右,从电泳图中可以看出,1 泳道的未经诱导对照组在 60 000 左右没有蛋白质,IPTG 诱导的上清液和沉淀中 60 000 处有条带,说明重组大肠杆菌成功表达了目的蛋白质,并且上清液中的目的蛋白质含量明显多于沉淀,说明蛋白质主要在上清液里。

对含目的蛋白质的上清液进行 His-tag 亲和层析,纯化蛋白质,层析产物浓缩电泳,1 号泳道中出现目的条带,2 号泳道是层析中出现的杂蛋白质。利用 AKTAPurifier 分子筛去除杂蛋白质,可得到高纯度(95%)的目的蛋白质。

2.5 目的蛋白质质量浓度的测定

采用最为常见的 Bradford 法进行测定,每个样品均 3 次重复。将 BSA 作为标准品,该法所测定的标准曲线在质量浓度 2.5~15 $\mu\text{g/mL}$ 范围内保持线性关系。测定目的蛋白质浓度的标准曲线为: $y=0.0251x+0.0193$,浓缩后蛋白质测定的 OD 值为: $y=0.302$ (平均值),因此求得 x 约为 11.3 $\mu\text{g/mL}$ 。由于蛋白质是经过稀释 100 倍后测定的,故计算得重组

蛋白质的最终质量浓度为 1.130 mg/mL, 目的蛋白质表达量较高, 可实现量产。

3 结 语

因为双歧杆菌在肠道中可以抑制有害细菌, 改善胃肠道屏障功能^[21], 长期以来一直被用作益生菌来改变肠道菌群组成以缓解各种疾病。最近的研究表明, 双歧杆菌可改变树突状细胞的功能, 以调节肠道对无害抗原和细菌的免疫稳态, 或启动针对病原体的机体保护措施^[22-25]。据报道, 很多双歧杆菌会合成 EPS, 由于 EPS 具有与周围环境沟通的能力以及对宿主健康的维护, 受到了科学界相当大的关注^[26]。一些体外研究表明, 特定的 EPS 可以在产 EPS 的菌中发挥有益的作用^[22]。然而, 值得注意的是, 由于双歧杆菌 EPS 的产率低, 这些聚合物作为市售益生元添加剂的用途非常有限^[26]。可通过优化发酵条件例如优化发酵时间、pH、培养温度、碳氮源等或者通过基因工程技术等来提高胞外多糖产量。在进行基因工程改造菌株时可通过超量表达 EPS 合成途径中的基因例如磷酸葡萄糖变位酶(*pgm*)、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(*galU*)等来提高 EPS 产量, 以期解决双歧杆菌作为一种益生菌但其胞外多糖产量低下的问题^[26-28]。

EPS 的合成是一个很复杂的过程, 包括糖进入细胞质、前体糖核苷酸的形成以及胞外多糖合成与

输出^[20]。乳酸菌的 EPS 生物合成由 *eps* 基因簇调控, 决定 EPS 重复单元的合成、聚合、输出等过程。在本研究中经过一系列生物信息学分析发现, EPS 的生物合成与一个关键的基因相关, 在乳酸菌当中通过过表达该基因使胞外多糖的产量有较大幅度的提升。双歧杆菌 *eps* 基因簇没有像 LAB“保守”*eps* 基因簇一样的特性, 且种间和种内的差异极大^[1], 本研究中在与其它双歧杆菌 *eps* 基因簇进行比较时也发现这一点, 说明单一研究某一种双歧杆菌来推断其它双歧杆菌的 *eps* 基因簇是不可取的, 只能与其它双歧杆菌进行比较分析。结合作者所在实验室前期长双歧杆菌 A17 全基因组测序结果, 成功分析到胞外多糖 A17 的合成途径。

在乳酸菌及其亚种当中, 提高胞外多糖产量的途径可通过优化发酵条件, 例如改变培养温度、优化发酵时间、碳源等来实现。为了提高双歧杆菌胞外多糖产量低的问题, 通过选取 pET28a 重组表达质粒实现了葡萄糖磷酸变位酶的大量表达, 为从分子手段调控双歧杆菌 EPS 的产量提供了新的途径。将以往解决胞外多糖产量问题从传统的优化培养条件上升到选取拷贝数与表达效果兼优的质粒, 大大缩短了实验时间, 更快更高效解决胞外多糖产量低下的问题, 对后续开展针对双歧杆菌及其 EPS 功能研究以及进一步阐明双歧杆菌 EPS 生物合成具有重要意义。

参考文献

- [1] YEN C H, KUO Y W, TSENG Y H, et al. Beneficial effects of fructo-oligosaccharides supplementation on fecal bifidobacteria and index of peroxidation status in constipated nursing-home residents: a placebo-controlled, diet-controlled trial[J]. **Nutrition**, 2011, 27(3): 323-328.
- [2] GYÖRGY P, NORRIS R F, ROSE C S. Bifidus factor. I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1954, 48(1): 193-201.
- [3] FANARO S, CHIERICI R, GUERRINI P, et al. Intestinal microflora in early infancy: composition and development[J]. **Acta Paediatrica**, 2003, 91(441): 48-55.
- [4] ZWIELEHNER J, LISZT K, HANDSCHUR M, et al. Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of *Bacteroides bifidobacteria* and *Clostridium* cluster IV in institutionalized elderly[J]. **Experimental Gerontology**, 2009, 44(6/7): 440-446.
- [5] BIAGI E, NYLUND L, CANDELA M, et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians[J]. **PLoS One**, 2010, 5(5): e10667.
- [6] 江建平, 刘洋, 张亮, 等. 多位点序列分析在食品用双歧杆菌分类鉴定中的应用[J]. **食品工业**, 2015, 36(10): 201-206. JIANG J P, LIU Y, ZHANG L, et al. Study of multilocus sequence analysis in identification of bifidobacterium species in food[J]. **The Food Industry**, 2015, 36(10): 201-206. (in Chinese)
- [7] NICHOLSON J K, HOLMES E, WILSON I D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care[J]. **Nature Reviews Microbiology**, 2005, 3(5): 431-438.
- [8] CAMILLERI M. Probiotics and irritable bowel syndrome: rationale, putative mechanisms, and evidence of clinical efficacy[J].

- Journal of Clinical Gastroenterology**, 2006, 40(3):264-269.
- [9] TANABE S, KINUTA Y, SAITO Y. Bifidobacterium infantis suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation[J]. **International Journal of Molecular Medicine**, 2008, 22(2):181-185.
- [10] CASTRO-BRAVO N, WELLS J M, MARGOLLES A, et al. Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2018, 9:2426.
- [11] HIDALGO-CANTABRANA C, SÁNCHEZ B, MILANI C, et al. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2014, 80(1):9-18.
- [12] 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. (in Chinese)
- [13] STINGELE F, NEESER J R, MOLLET B. Identification and characterization of the *eps* (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6[J]. **Journal of Bacteriology**, 1996, 178(6):1680-1690.
- [14] 胡盼盼, 宋微, 单毓娟, 等. 影响乳酸菌胞外多糖产量的因素[J]. 食品科技, 2014, 39(9):31-37.
HU P P, SONG W, SHAN Y J, et al. Factors contributing to the yield of exopolysaccharide by lactic acid bacteria[J]. **Food Science and Technology**, 2014, 39(9):31-37. (in Chinese)
- [15] VAN KRANENBURG R, MARUGG J D, VAN SWAM I I, et al. Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*[J]. **Molecular Microbiology**, 1997, 24(2):387-397.
- [16] WELMAN A D, MADDOX I S, ARCHER R H. Metabolism associated with raised metabolic flux to sugar nucleotide precursors of exopolysaccharides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2006, 33(5):391-400.
- [17] SCHMID J. Recent insights in microbial exopolysaccharide biosynthesis and engineering strategies[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2018, 53:130-136.
- [18] DIMOPOULOU M, CLAISSE O, DUTILH L, et al. Molecular cloning, expression and characterization of *Oenococcus oeni* priming glycosyltransferases[J]. **Molecular Biotechnology**, 2017, 59(8):323-333.
- [19] GRANGEASSE C, NESSLER S, MIJAKOVIC I. Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights [J]. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, 2012, 367(1602):2640-2655.
- [20] 王英. 长双歧杆菌胞外多糖生物合成途径及其对镉胁迫下金鱼的保护作用[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2020.
- [21] HIDALGO-CANTABRANA C, SÁNCHEZ B, MILANI C, et al. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2014, 80(1):9-18.
- [22] XUE L, HE J T, GAO N, et al. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia[J]. **Scientific Reports**, 2017, 7:45176.
- [23] PERSSON E K, SCOTT C L, MOWAT A M, et al. Dendritic cell subsets in the intestinal *Lamina propria*: ontogeny and function [J]. **European Journal of Immunology**, 2013, 43(12):3098-3107.
- [24] FU L L, SONG J Y, WANG C, et al. Bifidobacterium infantis potentially alleviates shrimp tropomyosin-induced allergy by tolerogenic dendritic cell-dependent induction of regulatory T cells and alterations in gut microbiota [J]. **Frontiers in Immunology**, 2017, 8:1536.
- [25] SRUTKOVA D, SCHWARZER M, HUDCOVIC T, et al. Bifidobacterium longum CCM 7952 promotes epithelial barrier function and prevents acute DSS-induced colitis in strictly strain-specific manner[J]. **PLoS One**, 2015, 10(7):e0134050.
- [26] 吕锡斌, 何腊平, 张汝娇, 等. 双歧杆菌生理功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(16):353-358.
LV X B, HE L P, ZHANG R J, et al. Research progress in physiological functions of *Bifidobacterium* [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2013, 34(16):353-358. (in Chinese)
- [27] LEVANDER F, SVENSSON M, RÅDSTRÖM P. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002, 68(2):784-790.
- [28] 李盛钰, 曾宪鹏, 杨贞耐. 提高乳酸菌胞外多糖产量的途径[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3):289-293.
LI S Y, ZENG X P, YANG Z N. Strategies for increasing of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(3):289-293. (in Chinese)