

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20230094

数字出版日期: 2024-01-23; 数字出版网址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240122.1827.004>

## 植物乳杆菌 CS3 全基因组分析及对己醛的转化

呼振豪, 王文君, 李旭, 赵国忠

(食品营养与安全国家重点实验室, 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 大豆是传统酱油酿造的主要原料, 在酿造过程中容易发生氧化变质和酸败等现象, 从而产生不良风味和有害物质, 其原因是发酵过程中产生了不饱和脂肪醛类物质。本研究以植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) CS3 为研究对象, 在该菌株进行全基因组测序和己醛胁迫下的转录组分析的基础上, 筛选出转化己醛的关键基因 *AdhE* (双功能乙醛 CoA/酒精脱氢酶) 和己醛胁迫下的高表达转录因子 *FruR*。利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术, 将基因 *AdhE* 和 *FruR* 进行基因敲除验证, 敲除后的菌株在 MRS 培养基中代谢己醛的能力分别下降了 17.72% 和 56.72%。这表明两个基因在己醛转化过程中都发挥重要作用。这一结果为植物乳杆菌在酱油生产中降低醛类等有害物质的应用提供了理论支持。

**关键词:** 植物乳杆菌; 脂肪醛; 全基因组测序; CRISPR-Cas9

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2024)02-0016-09

## Whole Genome Analysis of *Lactobacillus plantarum* CS3 and Transformation of Hexanal

HU Zhenhao, WANG Wenjun, LI Xu, ZHAO Guozhong

(State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Engineering,  
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Soybean is the main raw material for traditional soy sauce brewing, which is prone to oxidative deterioration and rancidity during the brewing process, resulting in bad flavor and harmful substances. The reason is that Unsaturated fat aldehydes are produced during fermentation. In this study, *Lactiplantibacillus plantarum* CS3 was selected as the research subject. On the basis of the whole genome sequencing and transcriptome analysis of the strain under hexanal stress, the key gene *AdhE* (bifunctional acetaldehyde CoA/alcohol dehydrogenase) for hexanal transformation, and the high expression transcription factor *FruR* under hexanal stress were screened. Using the CRISPR-Cas9 gene knockout method, *AdhE* and *FruR* were validated for gene knockout. The ability of the knockout strains to grow and metabolize hexanal in MRS medium decreased by 17.72% and 56.72%, respectively. This indicates that both genes play an important role in the conversion of hexanal. This result has provide theoretical support for the application of *L. plantarum* in reducing aldehydes and other harmful substances in soy sauce production.

**Key words:** *Lactiplantibacillus plantarum*; fatty aldehydes; whole genome sequencing; CRISPR-Cas9

引文格式:

呼振豪, 王文君, 李旭, 等. 植物乳杆菌 CS3 全基因组分析及对己醛的转化[J]. 天津科技大学学报, 2024, 39(2): 16-24.  
HU Z H, WANG W J, LI X, et al. Whole genome analysis of *Lactobacillus plantarum* CS3 and transformation of hexanal[J]. Journal of Tianjin university of science & technology, 2024, 39(2): 16-24.

收稿日期: 2023-04-22; 修回日期: 2023-07-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972194, 32272458)

作者简介: 呼振豪(1997—), 男, 河北人, 硕士研究生; 通信作者: 赵国忠, 教授, zhaoguozechong@tust.edu.cn

在酱油酿造过程中, 乳酸菌的代谢功能在酱油香气和风味的形成中起着至关重要的作用, 例如嗜盐乳杆菌作为酱油发酵过程中的重要乳酸菌, 被认为是产生酸和保持酱油理想颜色、刺激酵母生长、增强理想风味和隐藏任何不想要味道的重要贡献者<sup>[1]</sup>。在酱油发酵过程中添加植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 可以显著提高酱油中活性物质 (大豆多肽、酚类和黄酮类物质) 的产量<sup>[2]</sup>。与传统的米曲霉单一发酵法相比, 在酱油发酵过程中添加植物乳杆菌可以提高酚类物质、总黄酮、有机酸、氨基酸、异黄酮的含量以及抗氧化能力<sup>[3]</sup>。此外, 植物乳杆菌还可以有效降解食品发酵过程中产生的亚硝酸盐, 是一种高效、有针对性、环保的新方法, 具有广阔的发展前景<sup>[4]</sup>。

大豆是传统酱油酿造的主要原料, 原料中的脂氧合酶会导致脂肪醛类物质的形成, 这也是多不饱和脂肪酸氧化降解的标志。酱油酿造过程中极易发生自动氧化, 原料中的脂肪氧合酶会加速大豆油脂氧化变质, 油脂氧化后常会形成小分子二级氧化产物, 如丙醛、戊醛、正己醛和庚醛等<sup>[5]</sup>。在酱油酿造过程中, 高温氧化会产生己醛、反-2-壬烯醛、反-2, 4-十二烯醛等特征产物, 其中己醛形成最早, 同时亚麻酸氧化也会产生己醛<sup>[6]</sup>。这些脂肪醛的积累会对酱油的味道产生负面影响, 尤其是己醛, 有一种刺鼻的、令人不愉快的腐臭气味, 而庚醛则散发出一种令人作呕的青草味, 反-2-壬烯醛同样会产生难闻的草味和豆味<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明, 使用植物乳杆菌发酵可以将这些醛类物质转化为理想的芳香化合物, 例如己醛等醛类物质经植物乳杆菌发酵后可转化为有机酸和乙醇等风味化合物<sup>[9]</sup>。这表明植物乳杆菌发酵可能是一种很有前途的

降解脂肪醛的方法。

乳酸菌有多种分子调节机制, 以确保它们在受到不同类型压力时保持生理性质稳定。植物乳杆菌对乳酸<sup>[10]</sup>、低 pH<sup>[10]</sup>、氧化<sup>[11]</sup>、溶剂<sup>[12-13]</sup>、胆汁<sup>[14]</sup>、寒冷<sup>[12]</sup>和热应激<sup>[12]</sup>等胁迫条件的基因表达响应已有报道。本研究以己醛为不饱和脂肪醛的标志产物, 研究植物乳杆菌 CS3 对脂肪醛类物质的转化机理, 对菌株进行全基因组测序和在己醛胁迫下的转录组分析, 利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术敲除基因 *AdhE* 和 *FruR*, 预测其在己醛转化中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与质粒

主要实验菌种和质粒见表 1, 引物见表 2。

表 1 菌种和质粒

Tab. 1 Strains and plasmids

菌种/质粒	特征	来源
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	含有卡那霉素抗性基因	实验室保藏
<i>Lactobacillus plantarum</i> CS3	可以对脂肪醛类进行转化	实验室保藏
CS3- $\Delta$ <i>AdhE</i>	在植物乳杆菌 CS3 中缺失 <i>AdhE</i> 基因	本实验构建
CS3- $\Delta$ <i>FruR</i>	在植物乳杆菌 CS3 中缺失 <i>FruR</i> 基因	本实验构建
pLCP	含有卡那霉素抗性基因, 含 <i>Cas9</i> 基因	艾连中教授惠赠
pHSP01	含有 RECR/T 基因, 含有氯霉素抗性	艾连中教授惠赠
pLCP- $\Delta$ <i>AdhE</i>	敲除质粒, 含有红霉素、卡那霉素抗性	本实验构建
pLCP- $\Delta$ <i>FruR</i>	敲除质粒, 含有红霉素、卡那霉素抗性	本实验构建

表 2 引物

Tab. 2 Primers

引物	核酸序列 (5'-3')
$\Delta$ <i>AdhE</i> -up-F	CGGATCACATCTTTTTCTAAACTAGGGCCCGAAGTGCTTCCTCCGTTCAATTCCTTTGTGAATTAATTT
$\Delta$ <i>AdhE</i> -up-R	TAAACGTCATCGTGACCGCGTAACCCGGTGTGATGGACTTAAATTCCTCAATATCAACCCG
$\Delta$ <i>AdhE</i> -dn-F	GGTTACGCGGTCACGATGACGTTAATACACCGAATGCGATTTCGTCATTGACTG
$\Delta$ <i>AdhE</i> -dn-R	CCCTTTGTGAATTAAGGGAGCCCGCTCATGATGAGCGGGCTTTTTTG
$\Delta$ <i>AdhE</i> -sg-F	GCGGGCTCCCTTAATTCACAAAGGGAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC
$\Delta$ <i>AdhE</i> -sg-R	TGGACATACTATGATATATTCTAGAGATGCATTGGTCAAAGAATTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
$\Delta$ <i>AdhE</i> -up-F	CACATCTTTTTCTAAACTAGGGCCCAACGTCATCGTGACCGCGT
$\Delta$ <i>FruR</i> -up-R	TTCACAAAGGGCTATTTTTCTTAATCATGAAGTGCTTCCTCCGT
$\Delta$ <i>FruR</i> -dn-F	GGAAGCACTTCATGATTAAGGAAAAATAGCCCTTTGTGAATTAAGG
$\Delta$ <i>FruR</i> -dn-R	GCACCGAGTCGGTGCTTTTTTGAGATTGACTGCAAAGATCCCGTAA
$\Delta$ <i>FruR</i> -sg-F	GGTTACGGGGATCTTTCAGTCAATCTCAAAAAAGCACCGACTC
$\Delta$ <i>FruR</i> -sg-R	CAGAATGGACATACTATGATATATTCTAGAATGGCTTCTGACTTCACACG
YZ- <i>AdhEF</i>	GATGCCCAAACCCACGACATCATTA
YZ- <i>AdhER</i>	ATTCAAATGTCCGTCGAATTTCTTT
YZ- <i>FruRF</i>	TCCAGATTAGCTTCGGCATCCG
YZ- <i>FruRR</i>	TGCCCGTTAACAGCCTTATCTTT

## 1.2 培养基与溶液的配制

MRS 培养基: 蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 牛肉膏 10.0 g,  $K_2HPO_4$  2.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 吐温-80 1.0 mL, 无水乙酸钠 5.0 g,  $(NH_4)_2HC_6H_5O_7$  2.0 g,  $MgSO_4$  0.20 g,  $MnSO_4$  0.05 g, 用蒸馏水溶解并定容至 1 L, 115 °C 灭菌 20 min。

SGMRS 培养基: 含有 0.3 mol/L 蔗糖和 1% 甘氨酸的 MRS 培养基, 115 °C 灭菌 20 min。

SMRS 培养基: 含有 0.5 mol/L 蔗糖、0.1 mol/L  $MgCl_2$  和 2 mmol/L  $CaCl_2$  的 MRS 培养基, 115 °C 灭菌 20 min。

SM 缓冲液: 含有 952 mmol/L 蔗糖和 5 mmol/L  $MgCl_2$  的混合水溶液, 115 °C 灭菌 20 min。

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母膏 10 g, 氯化钠 5 g, 用蒸馏水溶解并定容至 1 L, 将 pH 调节为 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

脂肪醛衍生化试剂 DNPH: 准确称取 2, 4-二硝基苯肼 0.50 g, 用异丙醇溶解, 同时加入 3.5 mL 浓盐酸并定容至 100 mL, 超声助溶。

卡那霉素溶液: 称取 50 mg 卡那霉素, 用 1 mL  $ddH_2O$  溶解, 过滤除菌, -20 °C 保存, 保存质量浓度为 50 mg/mL。

红霉素溶液: 称取 100 mg 红霉素, 用 1 mL 无水乙醇溶解, 过滤除菌, -20 °C 保存, 保存质量浓度为 100 mg/mL。

氯霉素溶液: 称取 100 mg 氯霉素, 用 1 mL  $ddH_2O$  溶解, 过滤除菌, -20 °C 保存, 保存质量浓度为 100 mg/mL。

## 1.3 植物乳杆菌全基因组测序

将-80 °C 保存的植物乳杆菌 CS3 取出并活化 3 次, 在 MRS 培养基中培养 24 h, 离心收集菌体, 样品设置 3 个平行样, 后续由上海美吉生物科技有限公司进行全基因组测序及初步数据分析。

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取后 DNA 的纯度和浓度。基因组测序使用 PacBio RS II 测序平台和 Illumina HiSeq 4000 测序平台组合, 测序数据用来评估基因组的杂合度、重复度、基因组大小以及是否存在质粒、是否被污染, 辅助后续组装策略的选择<sup>[15]</sup>。由于三代测序具有较高的测序错误率, 所以用二代测序数据对三代测序数据进行校正, 保证组装结果具有较高的准确度。

## 1.4 植物乳杆菌代谢己醛的转录组测序

将植物乳杆菌 CS3 活化 3 次, 然后添加到含有

200 mg/L 己醛的 MRS 培养基中, 经该处理后培养的植物乳杆菌为实验组, 对照组的 MRS 培养基中不添加己醛, 其余处理与实验组相同。菌种培养至  $A_{600}$  为 0.8, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集植物乳杆菌 CS3 细胞, 并立刻储存在-80 °C 冰箱中, 防止 RNA 降解。样品设置 3 个平行样, 后续由上海美吉生物科技有限公司进行转录组测序及初步数据分析。

按照 RNA 提取试剂盒说明书的提取程序, 从样品中提取总 RNA。按照试剂盒的说明提取去除总 RNA 中的核糖体 RNA 得到 mRNA。RNA 片段化后进行文库的构建, 将得到的 mRNA 用二价阳离子随机打断, 以成功碎片化的 mRNA 为模板合成双链 cDNA, 进行末端修复和 PCR 扩增。为了获得基因表达水平, 使用 Bowtie 软件将过滤后的测序序列与参考基因组进行比对, 可以对基因组进行定位分析。归一化后的碱基 Reads 表示基因表达水平。基于负二项分布模型的 DESeq 统计程序确定基因表达数据中的差异表达, 当  $P < 0.05$  和  $|\log_2 C| > 1$  (其中  $C$  表示 Fold Change, 即差异倍数) 时, 样本之间存在显著性差异。采用 PacBio RS II 测序平台和 Illumina HiSeq 4000 测序平台进行测序。为了准确获得基因的表达量, 使用 Bowtie 软件对过滤后的测序序列与参考基因组序列进行比对以分析基因, 归一化后的 RPKM 值 (reads per kilo bases per million reads) 用来表示基因的表达水平。

## 1.5 高效液相色谱法测定发酵液中己醛含量

### 1.5.1 己醛含量标准曲线的绘制

己醛含量的测定参考 Lin 等<sup>[16]</sup>的方法并稍作修改。将 10.0 mg 己醛标准品放入 10 mL 棕色容积瓶中, 用异丙醇固定容积溶解, 得到 1 mg/mL 标准母液。溶液至少搅拌 30 min, 确保反应完全, -20 °C 密封保存。用异丙醇稀释标准母液, 得到 0.2、0.5、1、2、20、50、100、150、200 mg/L 标准溶液, -20 °C 密封保存。将不同质量浓度的己醛标准溶液 1 mL 置于离心管中, 加入 DNPH 溶液 1 mL, 溶液在 40 °C 水浴中加热 30 min, 在冷水中停止反应, 用 0.22  $\mu$ m 有机过滤器过滤, 使用高效液相色谱法 (HPLC) 进行检测。以己醛质量浓度 (mg/L) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

### 1.5.2 高效液相色谱条件

色谱柱为 C18 XSELECTTMHSS TS (4.625 0 mm, 5 m), 检测器为紫外检测器, 流动相为乙腈水溶液 (乙腈与水的体积比为 3 : 1), 柱温为 50 °C, 紫外

检测波长为 365 nm, 流量为 1.5 mL/min, 单次进样量为 20  $\mu$ L。采用外标法对己醛的含量进行定量测定, 重复 3 次。

### 1.5.3 发酵液中己醛含量的测定

将植物乳杆菌 CS3 活化 3 次, 然后接种到己醛胁迫培养基(含有 200 mg/L 己醛的 MRS 培养基)中, 己醛添加量为 200 mg/L, 接种量为 3%。摇床振荡培养, 分别在 8、16、24、36、48 h 采集样品, 测定己醛含量。对照组不接种植物乳杆菌 CS3。细菌培养物离心后, 收集的上清液与 1 mL DNPH 溶液混合, 40  $^{\circ}$ C 水浴加热 30 min, 置于冷水中停止反应。使用 0.22  $\mu$ m 有机过滤器过滤混合物后进行 HPLC 检测。

## 1.6 植物乳杆菌 CS3 的 CRISPR-Cas9 敲除质粒的构建以及电转化

采用 CRISPR-Cas9 系统构建黏蛋白敲除菌株。首先, 将基因敲除或插入位点的上下行同源臂连接到 sgRNA (up-down-sgRNA) 上, 用编辑质粒 pLCP 骨架 (*Apa*I 和 *Xba*I 消化) 一步克隆, 得到敲除或插入质粒; 然后, 将辅助质粒 pHSP01 电转化导入植物乳杆菌 CS3, 得到菌株 CS3 (pHSP01); 最后, 以同样的方

法将敲除或插入质粒导入菌株 CS3 (pHSP01) 中, 在氯霉素抗性平板中进行筛选, 测序验证后得到目标菌株。

根据文献[17]的方法略作修改, 进行电转化感受态细胞的制备和植物乳杆菌 CS3 的电转化。将隔夜培养的接种量 3% 的菌种转移到 50 mL 新鲜 SGMRS 培养基中。当  $A_{600}$  为 0.3 ~ 0.5 时, 4  $^{\circ}$ C、2 105g 离心回收细胞。用 1 mmol/L  $MgCl_2$  溶液洗涤细胞 2 次, 在 0.5 mL SM 缓冲液中重新悬浮, -80  $^{\circ}$ C 保存。在 2 mm 比色皿中进行电穿孔(参数为 2.5 kV、200  $\Omega$ 、25  $\mu$ F)。将 1 mL 回收培养基加入比色皿中, 培养 2 ~ 3 h, 涂布在含有 10  $\mu$ g 红霉素和氯霉素的 MRS 琼脂培养基上。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物乳杆菌 CS3 的基因组基本特征

植物乳杆菌 CS3 的基因组由 1 条染色体和 3 个质粒组成(图 1)。

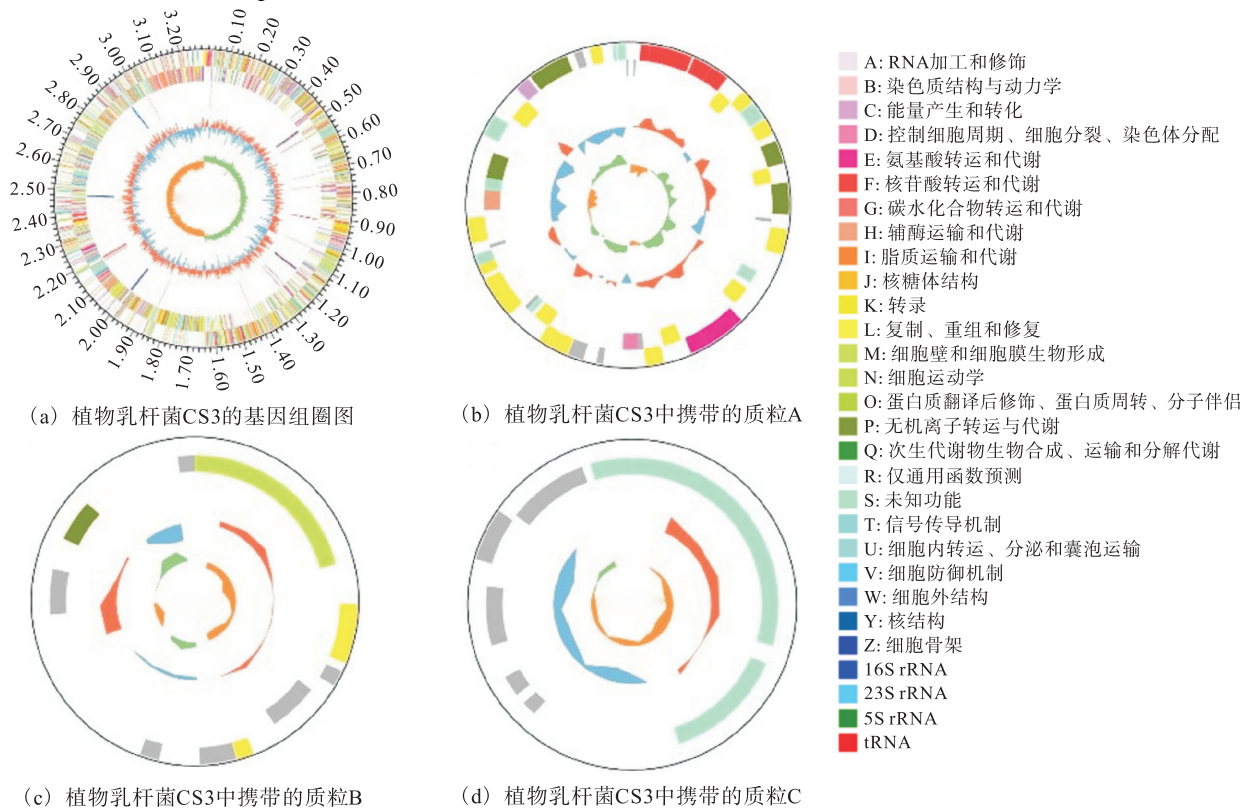


图 1 植物乳杆菌 CS3 的基因组

Fig. 1 Genome of *L. plantarum* CS3

基因组圈图的最外层圈代表基因组大小, 第 2 圈代表正义链上的 CDS 区域(编码区), 第 3 圈为反义

链上的 CDS 区域, 第 4 圈为 rRNA 和 tRNA; 最内圈代表 GC 含量; 不同的颜色表示 CDS 区域被分到不

同的 COG (clusters of orthologous groups of proteins) 功能分类。基因组共包含 3 322 081 个碱基对, GC 含量为 44.41%; 共鉴定出 3 111 个编码序列, 平均长度为 903 个碱基对, 占基因长度的 93.00%; 包含 70 个氨酰-tRNA 基因, 能够与 20 种天然氨基酸对应, 其对应的氨基酸包括半胱氨酸、丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、色氨酸、丝氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、赖氨酸、蛋氨酸和组氨酸。此外, 基因组中还含有 16 个 rRNA 基因。研究<sup>[18]</sup>表明, 许多乳酸菌中存在的质粒往往携带多种重要的遗传性状。植物乳杆菌 CS3 基因组序列中含有 3 个质粒, 其中质粒 A 编码 13 个基因, 质粒 B 编码 10 个基因, 质粒 C 编码 9 个基因。质粒 A 编码的基因 27, 它编码了 RelB/DinJ 家族的 II 型毒素-抗毒素复合物, 毒素-抗毒素复合物往往与两个主要的生物学功能有关, 一是可以隔离毒素并迫使其失活, 二是在稳态生长条件下抑制其自身操纵子的转录。

### 2.2 COG 数据库注释结果

植物乳杆菌 CS3 的 COG 注释分类统计如图 2

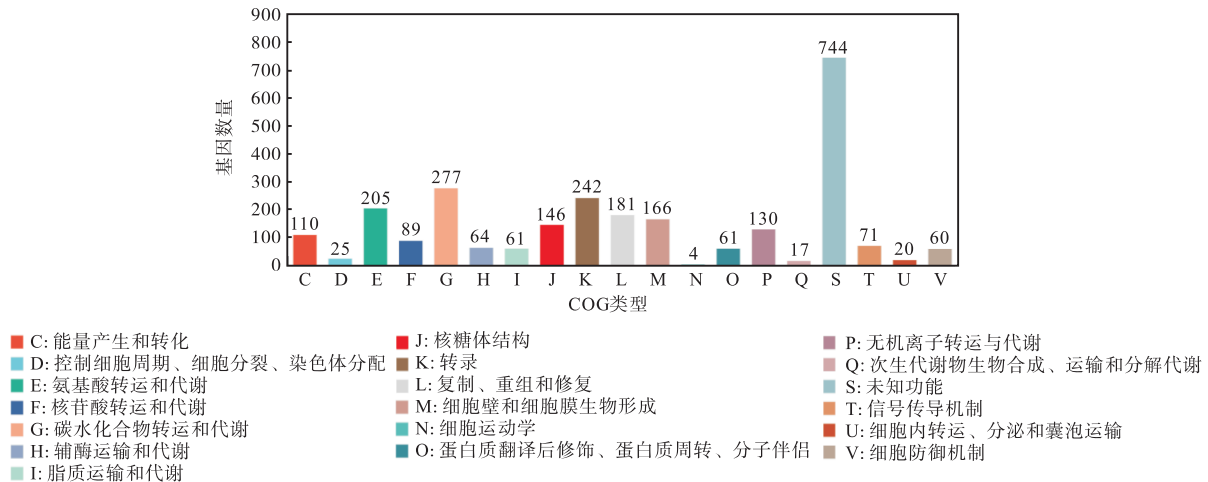


图 2 植物乳杆菌 CS3 的 COG 注释分类统计

Fig. 2 COG annotated taxonomic statistics of *L. plantarum* CS3

### 2.3 发酵液中己醛含量的测定

在酸性条件下, 醛的羰基与 DNPH 的氨基反应, 通过 DNPH 衍生化实现了醛的定量。该反应生成的 2, 4-二硝基苯腙衍生物对紫外线更敏感, 具有疏水性, 便于通过 HPLC 分离。在 340~380 nm 波长范围内使用紫外-可见分光光度法对衍生物进行定量分析。由于己醛是一种挥发性物质, 很容易在发酵过程中蒸发, 导致潜在低估实际发酵液中的己醛含量, 因此对照组与实验组在相同条件下进行实验。植物乳杆

菌 CS3 对己醛转化能力的分析如图 3 所示。对照组 24 h 后己醛残留量为 175.78 mg/L, 损失率为 12.10%; 48 h 后己醛含量为 140.55 mg/L, 损失率为 29.72%。在己醛胁迫发酵培养基中加入植物乳杆菌 CS3, 24 h 后己醛含量降至 8.55 mg/L, 损失率为 95.72%, 48 h 后已经检测不到己醛, 说明 24 h 内己醛转化率达到 83.62%。该结果表明植物乳杆菌 CS3 可以高效代谢己醛, 代谢产物性质稳定, 短期内不会发生可逆反应而重新形成己醛。

菌 CS3 对己醛转化能力的分析如图 3 所示。对照组 24 h 后己醛残留量为 175.78 mg/L, 损失率为 12.10%; 48 h 后己醛含量为 140.55 mg/L, 损失率为 29.72%。在己醛胁迫发酵培养基中加入植物乳杆菌 CS3, 24 h 后己醛含量降至 8.55 mg/L, 损失率为 95.72%, 48 h 后已经检测不到己醛, 说明 24 h 内己醛转化率达到 83.62%。该结果表明植物乳杆菌 CS3 可以高效代谢己醛, 代谢产物性质稳定, 短期内不会发生可逆反应而重新形成己醛。

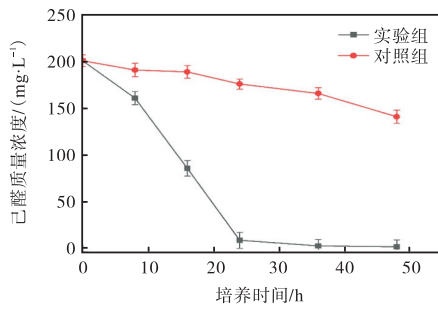


图 3 植物乳杆菌 CS3 对己醛转化能力的分析

Fig. 3 Analysis of conversion ability of hexanal by *L. plantarum* CS3

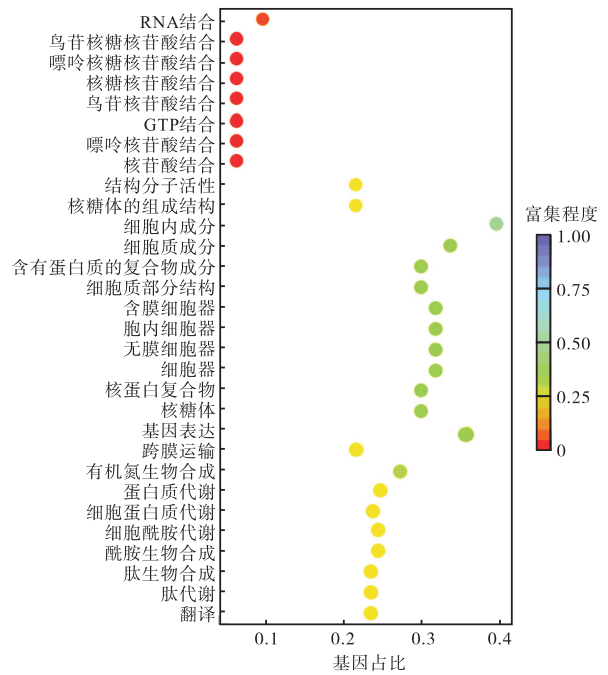
2.4 植物乳杆菌 CS3 代谢己醛的转录组学分析

植物乳杆菌 CS3 具有转化外源加入己醛的能力。为了更深入地了解这一转化背后的机制,通过转录组学进行进一步分析。己醛胁迫下的 GO 富集分析与植物乳杆菌 CS3 基因表达的变化如图 4 所示,其中  $P < 0.05$ ,  $|\log_2 C| > 1$ 。

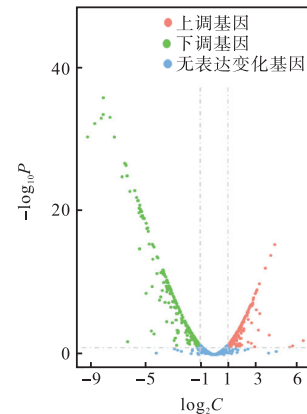
如图 4(a) 所示,对所有差异基因进行 GO 功能分类,选出功能分类排名前 20 位的基因。添加己醛后表达水平出现变化的基因主要涉及细菌的物质代谢,包括碳水化合物、脂肪酸和氨基酸代谢以及抗生素和次生产物合成、物质转运等。上调的基因包括与核糖体多肽代谢、氨基酸代谢、蛋白质代谢、跨膜运输相关的基因。由于应激反应,细胞代谢活性降低,导致能量和质子动力学、生长能力和活力的下降。这些反应有助于利用其他碳源,激活蛋白质水解系统并分解游离氨基酸以适应环境。细菌通过调节不同的基本代谢途径增加腺苷三磷酸(ATP)的产量,确保在糖酵解过程受到抑制时通过其他途径继续生产 ATP,从而增强其耐受性<sup>[14]</sup>。

研究发现植物乳杆菌 CS3 具有利用代谢基因转化己醛胁迫的能力。在己醛胁迫下,植物乳杆菌 CS3 基因表达显著改变,如图 4(b) 所示,共鉴定出 660 个差异表达基因,其中上调基因 323 个,下调基因 337 个,无表达变化基因 2 074 个。为了更好地了解植物乳杆菌 CS3 在己醛胁迫下的主要反应机制,本研究重点分析了己醛胁迫下的实验组与不含己醛胁迫的对照组相比上调最显著的基因 ( $|\log_2 C| > 1$ )。己醛胁迫下高表达的基因见表 3。

AdhE 酶是酒精发酵过程中重要的代谢酶。AdhE 有两个催化结构域 N-端乙醛脱氢酶(ALDH)结构域和 C-端乙醇脱氢酶(ADH)结构域。N-端乙醛脱氢酶负责将乙酰辅酶 A 转化为乙醛,然后乙醛再由 C-端乙醇脱氢酶转化为乙醇。在转化过程中最重要的结



(a) GO 富集分析



(b) 植物乳杆菌 CS3 基因表达的变化

图 4 己醛胁迫下的 GO 富集分析与植物乳杆菌 CS3 基因表达的变化

Fig. 4 GO enrichment analysis under hexanal stress and changes of *L. plantarum* CS3 gene expression under hexanal stress

表 3 己醛胁迫下高表达的基因

Tab. 3 Genes highly expressed under hexanal stress

基因描述	基因家族	RPKM		$\log_2 C$
		己醛胁迫	对照	
双功能乙醛辅酶 A/醇脱氢酶	AdhE	20.546	4.751	2.002
1-磷酸果糖激酶	Fruk	703.759	32.861	4.431
DeoR 蛋白家族转录调节因子	FruR	731.439	40.801	4.153
PTS(细菌磷酸转移酶系统)	FruB	1 587.327	117.055	3.756
果糖转运体亚基 IIC				
MerR 家族转录调节因子	AdhR	1 147.482	425.703	1.419
LacI 家族转录调节因子	LacI	141.043	50.574	1.468
ArsR 家族转录调节因子	HTH_5	522.231	164.858	1.652
TetR 家族转录调节因子	TetR_N	21.049	2.428	3.097

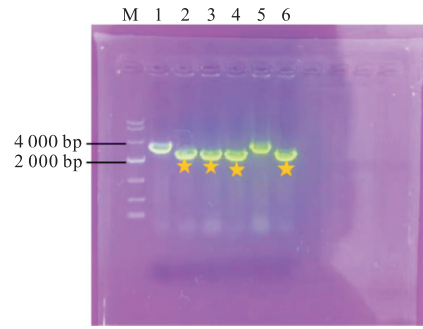
构域是 C-端乙醇脱氢酶, 醛完全生成相应的羧酸是 ADH 介导的歧化过程, 通常与 ALDH 结合。提高 pH 通常会增加形成的酸, 即使是具有不利的酸性条件, ADH 也可以用于醛的氧化, 前提是  $\text{NAD}^+$  能够进行有效再生<sup>[19]</sup>。

ADH 是乙醇发酵的关键酶, 它作为一种高度专业化和多功能的催化剂, 将一级或二级醛转化为相应的醇<sup>[20]</sup>。罗伊氏乳杆菌 (*L. reuteri*) 中存在的 ADH 能转化各种类型的醛, 有助于改善食品的风味特征。这些酶有促进还原反应的倾向。热细胞梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 能够通过催化氧化过程将木质纤维素转化为乙醇。当从热细胞梭菌中去除 *AdhE* 时, 实验发现乙醇的产量几乎为 0<sup>[21]</sup>。研究还发现了 TetR 家族中的 AcrR 调节因子, 它可以在 *L. plantarum* NF92 中调节 *AdhE* 的表达并参与乙醇合成<sup>[22]</sup>。AcrR 是 TetR 家族的调控因子, 可以通过调控 *AdhE* 的表达参与乙醇的合成。AdhR 是 MerR 家族的调节因子, 可调节巯基依赖性甲醛脱氢酶 (AdhA) 和半胱氨酸蛋白酶 (YraA), 防止甲醛等碳基化合物引起的氧化毒性<sup>[22]</sup>。DeoR 家族转录因子 GlpR 常作为碳源吸收和分解代谢的特异性调控因子, 经常发挥分解代谢的作用<sup>[23]</sup>。与对照组相比, DeoR 家族中的转录因子 FruR 的表达量与对照组基因表达量差异较大。LacI 家族成员可以感知糖和非碳水化合物反应, 并参与调控碳水化合物代谢途径相关基因的表达。

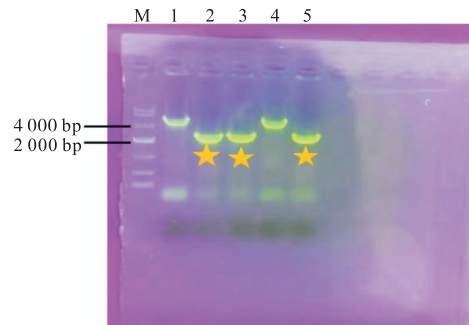
植物乳杆菌的果糖操纵子由 3 个基因组成: FruR 产生是 DeoR 家族中转录调控因子, FruB 表达果糖磷酸转移酶系统, FruK 表达产生 1-磷酸果糖激酶。在乳酸乳球菌中, FruRCA 也位于同一操纵子中, FruR 基因失活后, 由 FruRCA 启动子驱动的 *LuxAB* 报告基因的表达量显著增加<sup>[24]</sup>。这说明在乳酸菌中 FruR 对基因 FruK 和 FruB 表达具有调控作用。与对照组相比, 植物乳杆菌 CS3 果糖操纵子中 3 个基因的表达水平在己醛胁迫下升高 (表 3)。己醛可能激活 FruR 的高表达, FruR 控制 FruB 和 FruK 的表达水平。FruK 是参与糖酵解的酶之一, FruK 表达量的提高有助于植物乳杆菌 CS3 糖酵解水平的提升, 最终产生更多的 ATP, 使植物乳杆菌 CS3 的代谢水平提高, 加速对己醛的转化。

### 2.5 *AdhE* 和 *FruR* 基因敲除验证及其对己醛代谢能力的影响

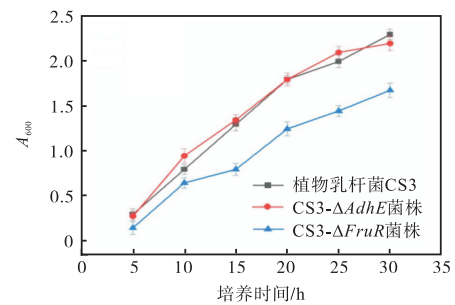
采用 CRISPR-Cas9 方法对 *AdhE* 和 *FruR* 两个基因进行敲除, 结果如图 5 所示。



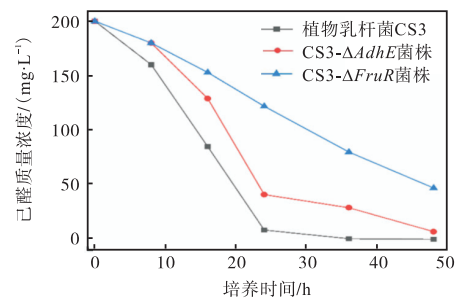
M. 核酸 Marker; 1 和 5. 野生型; 2、3、4、6. CS3- $\Delta$ *AdhE*  
(a) 野生型和 CS3- $\Delta$ *AdhE* 菌株琼脂糖凝胶电泳图



M. 核酸 Marker; 1 和 4. 野生型; 2、3、5. CS3- $\Delta$ *FruR*  
(b) 野生型和 CS3- $\Delta$ *FruR* 菌株琼脂糖凝胶电泳图



(c) 己醛胁迫下菌株生长曲线的变化



(d) 菌株代谢己醛能力的变化

图 5 *AdhE* 和 *FruR* 基因敲除验证及其对己醛代谢能力的影响

Fig. 5 Verification of *AdhE* and *FruR* gene knockout and its effect on hexanal metabolism ability

图 5(b) 显示了基因被成功敲除。为了进行敲除验证, 在同源臂的外侧设计引物。使用野生型引物

YZ-*AdhE*F 和 YZ-*AdhE*R 扩增得到 4 934 bp 的序列,而成功敲除基因的菌株的序列长度为 2 330 bp。利用 YZ-*FruR*F 和 YZ-*FruR*R 引物对目的基因序列进行验证,如图 5(a)所示,野生型菌株扩增出 3 047 bp 的序列,敲除基因菌株扩增出 2 129 bp 的序列,表明基因敲除成功。在本实验中研究了己醛胁迫对植物乳杆菌 CS3 野生型和敲除基因菌株生长速度的影响。植物乳杆菌 CS3 野生型和 CS3- $\Delta$ *AdhE* 菌株的生长曲线相似,说明敲除 *AdhE* 对己醛胁迫条件下植物乳杆菌 CS3 的生长没有显著影响。然而如图 5(c)所示,CS3- $\Delta$ *FruR* 菌株的生长速度低于野生型菌株。*FruR* 基因可以调节 1-磷酸果糖激酶的表达。1-磷酸果糖激酶是一种在糖酵解过程中起关键作用的酶。在 CS3- $\Delta$ *FruR* 菌株中观察到生长速度的下降,可能是由于其糖酵解能力受损,导致生长速度变慢。

为了评价菌株 CS3- $\Delta$ *AdhE* 和 CS3- $\Delta$ *FruR* 对己醛的转化能力,将终质量浓度为 200 mg/L 的己醛溶液加入 MRS 培养基中。图 5(d)的实验结果表明,CS3- $\Delta$ *AdhE* 和 CS3- $\Delta$ *FruR* 菌株的己醛转化率都有所下降,后者的转化率下降更明显。CS3- $\Delta$ *FruR* 菌株发酵 24 h 后,剩余己醛质量浓度为 122 mg/L,转化率仅为 26.9%,比野生型菌株降低了 56.72%。这种己醛转化能力的下降可能归因于 *FruR* 转录因子的缺失,这导致 *FruK* 表达量减少。CS3- $\Delta$ *AdhE* 菌株 24 h 的转化率为 65.9%,比野生型菌株降低了 17.72%。*AdhE* 基因在己醛的转化中起着至关重要的作用,它的缺失需要使用其他通路进行己醛的转化。此前进行的一项研究表明,罗伊氏乳杆菌可用于奶酪生产,罗伊氏乳杆菌中的乙醇脱氢酶可以将醛转化为醇,以此减轻由乙醛引起的难闻气味的产生。因此,植物乳杆菌同样可能存在不同的代谢途径应对己醛胁迫的应激反应。

### 3 结 语

植物乳杆菌是传统酱油酿造中的重要功能性菌株,能够在酱油发酵过程中降低由多不饱和脂肪酸氧化造成的脂肪醛类物质的积累,在保证酱油风味和品质方面发挥了至关重要的作用。本研究通过全基因组测序结合转录组分析技术,分析植物乳杆菌 CS3 代谢己醛的关键基因 *AdhE* 和 *FruR*,并通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术完成基因功能的验证。

(1) 通过全基因组测序及拼接得到植物乳杆菌

CS3 的基因组完整序列。该基因组由 1 条染色体和 3 个质粒组成,基因组总长度为 3 322 081 个碱基对,GC 含量为 44.41%,共鉴定出 3 111 个编码序列,平均长度为 903 个碱基对,占基因长度的 93.00%。

(2) 对实验组(己醛胁迫)和对照组(未添加己醛)菌株进行转录组基因测序分析,通过比较两组中表达具有显著差异的基因,筛选到植物乳杆菌 CS3 代谢己醛的关键基因 *AdhE* 和 *FruR*。

(3) 通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术,将 *AdhE* 和 *FruR* 成功敲除。敲除后的菌株代谢己醛的能力分别下降了 17.72% 和 56.72%,表明在己醛胁迫条件下植物乳杆菌 CS3 可以通过提高 *AdhE* 和 *FruR* 的表达水平对己醛进行转化,当敲除 *AdhE* 和 *FruR* 基因后,会导致植物乳杆菌 CS3 代谢己醛的能力明显降低。

### 参考文献:

- [1] CUI Y, QU X, LI H, et al. Isolation of halophilic lactic acid bacteria from traditional Chinese fermented soybean paste and assessment of the isolates for industrial potential[J]. *European food research and technology*, 2012, 234: 797-806.
- [2] ZHANG X, LIU Z, KANG B, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* or *Enterococcus faecalis* as co-inoculants with *Aspergillus oryzae* in koji making on the physico-chemical properties of soy sauce[J]. *Journal of food science*, 2022, 87(2): 714-727.
- [3] 刘冲. 酱油胁迫条件下植物乳杆菌转化己醛的机理研究[D]. 天津:天津科技大学, 2021.
- [4] HUANG Y Y, LIU D M, JIA X Z, et al. Whole genome sequencing of *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010 and its effect on growth phenotype under nitrite stress[J]. *LWT-Food science and technology*, 2021, 149: 111778.
- [5] 王勇, 黄昭先, 李晓龙, 等. 丙醛+正己醛含量评价 DHA/ARA 粉末油脂氧化情况的可行性研究[J]. *中国油脂*, 2018, 43(8): 29-31.
- [6] VONG W C, LIU S Q. Bioconversion of green volatiles in okara (soybean residue) into esters by coupling enzyme catalysis and yeast (*Lindnera saturnus*) fermentation[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2018, 102: 10017-10026.
- [7] HASANLI F, MOHAMMADIAZAR S, BAHMAEI M, et al. Coating of sol-gel film on silver nanodendrite as a novel solid-phase microextraction fiber for determination of volatile aldehydes in edible oils[J]. *Food analytical*



- methods, 2018, 11 : 2149–2157.
- [8] LI C, LI W, CHEN X, et al. Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains[J]. LWT-Food science and technology, 2014, 57(2) : 477–485.
- [9] LIU W, PU X, SUN J, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* on functional characteristics and flavor profile of fermented walnut milk[J]. LWT-Food science and technology, 2022, 160 : 113254.
- [10] LIU Y, HAN J, CHEN Z, et al. Engineering cell signaling using tunable CRISPR-Cpf1-based transcription factors[J]. Nature communications, 2017, 8(1) : 2095.
- [11] SERRANO L M, MOLENAAR D, WELS M, et al. Thioedoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Microbial cell factories, 2007, 6(1) : 1–14.
- [12] FIOCCO D, CAPOZZI V, GOFFIN P, et al. Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2007, 77 : 909–915.
- [13] VAN BOKHORST-VAN DE VEEN H, ABEE T, TEMPELAARS M, et al. Short- and long-term adaptation to ethanol stress and its cross-protective consequences in *Lactobacillus plantarum*[J]. Applied and environmental microbiology, 2011, 77(15) : 5247–5256.
- [14] BRON P, MEIJER M, BONGERS R, et al. Dynamics of competitive population abundance of *Lactobacillus plantarum* *ivi* gene mutants in faecal samples after passage through the gastrointestinal tract of mice[J]. Journal of applied microbiology, 2007, 103(5) : 1424–1434.
- [15] 程雯, 蒲桂洪, 牛国清, 等. 奥利万星中间体 A82846B 产生菌拟孢囊菌 CCTCC M2020063 全基因组序列分析与 *mbtH* 类基因的验证[J]. 微生物学报, 2021, 61(12) : 3977–3990.
- [16] LIN Y L, WANG P Y, HSIEH L L, et al. Determination of linear aliphatic aldehydes in heavy metal containing waters by high-performance liquid chromatography using 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization[J]. Journal of chromatography A, 2009, 1216(36) : 6377–6381.
- [17] HUANG H, SONG X, YANG S. Development of a RecE/T-assisted CRISPR-Cas9 toolbox for *Lactobacillus*[J]. Biotechnology journal, 2019, 14(7) : 1800690.
- [18] KÖNST D P, MERKENS D H, KARA D S, et al. Corridendum: enantioselective oxidation of aldehydes catalyzed by alcohol dehydrogenase[J]. Angewandte chemie international edition, 2012, 51(48) : 11924.
- [19] SIEZEN R J, TZENEVA V A, CASTIONI A, et al. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches[J]. Environmental microbiology, 2010, 12(3) : 758–773.
- [20] KÖNST P, MERKENS H, KARA S, et al. Enantioselective oxidation of aldehydes catalyzed by alcohol dehydrogenase[J]. Angewandte chemie, 2012, 51(39) : 9914–9917.
- [21] LO J, ZHENG T, HON S, et al. The bifunctional alcohol and aldehyde dehydrogenase gene, *AdhE*, is necessary for ethanol production in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*[J]. Journal of bacteriology, 2015, 197(8) : 1386–1393.
- [22] YANG X P, TENG K L, SU R N, et al. AcrR and Rex control mannitol and sorbitol utilization through their cross-regulation of aldehyde-alcohol dehydrogenase (*AdhE*) in *Lactobacillus plantarum*[J]. Applied and environmental microbiology, 2018, 85(4) : e02035-18.
- [23] MARTIN J H, SHERWOOD RAWLS K, CHAN J C, et al. GlpR is a direct transcriptional repressor of fructose metabolic genes in *Haloferax volcanii*[J]. Journal of bacteriology, 2018, 200(17) : e00244-18.
- [24] BARRIERE C, VEIGA-DA-CUNHA M, PONS N, et al. Fructose utilization in *Lactococcus lactis* as a model for low-GC gram-positive bacteria: its regulator, signal, and DNA-binding site[J]. Journal of bacteriology, 2005, 187(11) : 3752–3761.

责任编辑: 郎婧