

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20240198

网络首发日期: 2025-04-30; 网络首发地址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20250430.1327.005>

植物乳植杆菌 CRISPR 基因座分析

宁玉晨¹, 仲飞亮¹, 李秀娟^{1,2}, 侯莹^{1,2}, 罗学刚¹

(1. 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;
2. 哈尔滨美华生物技术股份有限公司, 哈尔滨 150000)

摘要: CRISPR/Cas 系统是细菌的一种获得性免疫系统,也是合成生物学等领域的重要基因编辑技术。然而,目前人们对乳酸菌 CRISPR/Cas 系统的解析及其应用开发依然有所不足。本研究对此前分离得到的益生菌新菌株植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) TCCC11824 及另外 12 株同种属益生菌的 CRISPR/Cas9 系统进行分析。结果发现: 13 株植物乳植杆菌的 CRISPR 系统类型均为 Type II A 型,在 CRISPR 序列侧翼具有特征性的 Cas9 及 Cas1、Cas2 和 Csn2。预测到 tracrRNA 位于 Cas9 与 Cas1 之间,但重复序列彼此有所不同,可以形成 5 个或 7 个碱基的稳定的二级结构。其中 8 株植物乳植杆菌 CRISPR 序列中的 spacer 序列可以一共靶向 12 种噬菌体。植物乳植杆菌 Cas9 蛋白识别最高效的 PAM 序列为 CC。本研究有助于了解乳酸菌进化过程中抵御外源遗传基因侵染的机制,并为其高效基因编辑系统的开发奠定基础。

关键词: 植物乳植杆菌; CRISPR 系统; spacer; Cas; PAM

中图分类号: Q933 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2026)02-0017-06

CRISPR Locus Analysis of *Lactiplantibacillus plantarum*

NING Yuchen¹, ZHONG Feiliang¹, LI Xiujuan^{1,2}, HOU Ying^{1,2}, LUO Xuegang¹

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
2. Harbin Meihua Biotechnology Co., Ltd., Harbin 150000, China)

Abstract: The CRISPR/Cas system is an acquired immune system of bacteria and has been an important gene editing technology in the field of synthetic biology. However, at present, the analysis and application of CRISPR/Cas system of lactic acid bacteria remain insufficient. This study analyzed the CRISPR/Cas9 system of *Lactiplantibacillus plantarum* TCCC11824, a novel probiotic strain isolated in our previous study, and 12 other strains of the same genus. The results showed that the CRISPR system types of the 13 strains of *L. plantarum* were all Type II A, with characteristic Cas9, Cas1, Cas2 and Csn2 genes flanking the CRISPR sequence. The tracrRNA was predicted to be located between Cas9 and Cas1, while the repeats differed from each other and could form a stable secondary structure of 5 or 7 bases. Among them, the spacer sequences in the CRISPR sequences of 8 strains of *L. plantarum* could collectively target a total of 12 phages. The most efficient PAM sequence for *L. plantarum* Cas9 protein recognition was CC. This study helps to understand the mechanism of lactic acid bacteria to resist genetic infection during the evolutionary process, and lays a foundation for the development of efficient gene editing systems.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum*; CRISPR system; spacer; Cas; PAM

引文格式:

宁玉晨, 仲飞亮, 李秀娟, 等. 植物乳植杆菌 CRISPR 基因座分析[J]. 天津科技大学学报, 2026, 41(2): 17-22.

NING Y C, ZHONG F L, LI X J, et al. CRISPR locus analysis of *Lactiplantibacillus plantarum*[J]. Journal of Tianjin uni-

收稿日期: 2024-10-07; 修回日期: 2024-12-20

基金项目: 天津市科技成果转化项目(24ZYCGSY00390)

作者简介: 宁玉晨(1997—), 男, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 罗学刚, 教授, luoxuegang@tust.edu.cn

versity of science and technology, 2026, 41 (2) : 17-22.

分子生物学和高通量测序技术的发展使人类能够更高效且更便捷地获得某种生物的基因组信息。目前人类已经完成了上千种、上万株乳酸菌的全基因组测序,但是如何更精确地解读乳酸菌全基因组信息以及如何优化乳酸菌的益生功能是目前乳酸菌基因组学研究的重要任务。

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, 规律间隔成簇短回文重复序列)/Cas (CRISPR associated protein, CRISPR 关联性蛋白质)系统是细菌用来抵御外来遗传物质(如噬菌体、质粒等)的侵入损害的获得性免疫系统^[1-3]。该系统包含 CRISPR 序列和 Cas 蛋白,其中重复序列 (direct repeat, DR)和间隔序列 (spacer)交替排列构成 CRISPR 序列,而 Cas 则是一种具有核酸内切酶活性的蛋白质,可以利用 CRISPR 序列中间隔序列对应的 RNA 指引,识别并且切割特定的、与其序列互补的 DNA 链^[4]。CRISPR 序列在前导区的调控下会转录生成 pre-crRNA 和与 pre-crRNA 序列互补的 tracrRNA^[5-6],二者互补结合形成双链 RNA (dsRNA) 区域,被 RNase III 酶在 Cas 蛋白存在的条件下加工至成熟,最后与细菌自源性 Cas 核酸酶结合成为复合体^[7]。对于 Type II 型系统,外源 DNA 被 Cas9 蛋白识别的同时与 crRNA 配对结合,从而被靶向结合并破坏,细菌被保护免受进一步侵蚀^[8]。切割下来的序列成为间隔序列被储存在 CRISPR 序列中,用于下一次免疫过程中识别入侵 DNA 序列。因此,对乳酸菌 CRISPR/Cas 系统进行全面深入的探究,可以解析其在进化过程中防御外源遗传物质(如噬菌体、质粒等)侵染的机制。同时,随着 CRISPR/Cas 系统的机制和功能的日益清晰,该系统已成为基因编辑及合成生物学的热门技术。然而,目前人们对于乳酸菌的 CRISPR/Cas 系统缺乏深入且全面的了解,致使其在乳酸菌的基因编辑应用中还存在很多限制。

植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) 是乳酸菌的一种,广泛存在于发酵食物及肠道中。在发酵过程中,植物乳植杆菌可以将食品中的糖分转化为乳酸,同时产生多种有益人体健康的活性代谢产物,从而改善食品的营养价值,并且延长食品的保存时间。在肠道中,植物乳植杆菌有助于分解食物中的纤维和其他难以消化的物质,促进消化吸收,调节肠道菌群的平衡及免疫系统,并具有降低胆固醇^[1]、抗氧化^[2]等促进健康的作用,因此被视为一类重要的益生

菌。在前期研究中,本课题组筛选获得了一株具有优良益生功效的植物乳植杆菌新菌株 TCCC11824 (CGMCC NO. 8198),并完成了其基因组测序 (GenBank NO. CP169649)。然而,目前对该菌株 CRISPR/Cas 系统的分子特征及其与植物乳植杆菌其他菌株之间的异同之处尚属未知。鉴于此,本研究对 TCCC11824 等 13 株不同的植物乳植杆菌菌株的 CRISPR 系统进行比较分析,以期揭示更多关于益生菌免疫进化方面的新信息,同时为后续适用于植物乳植杆菌的 CRISPR/Cas 基因编辑系统的创建提供基础理论。

1 材料与方法

1.1 材料

NCBI Genbank 数据库中已公布全基因组序列的 12 株植物乳植杆菌,包括植物乳植杆菌 FLPL05 (NZ_CP046119.1)、植物乳植杆菌 IYO2065 (NZ_AP028145.1)、植物乳植杆菌 L55 (NZ_CP110536.1)、植物乳植杆菌 LPT52 (NZ_CP090819.1)、植物乳植杆菌 MSJK0048 (NZ_CP136670.1)、植物乳植杆菌 NCHBL-004 (NZ_CP141596.1)、植物乳植杆菌 SRCM103473 (NZ_CP035224.1)、植物乳植杆菌 UNQLp11 (NZ_CP031140.1)、植物乳植杆菌 VHProbi M25 (NZ_CP142771.1)、植物乳植杆菌 WLPL21 (NZ_CP122378.1)、植物乳植杆菌 ZDY04 (NZ_CP122406.1) 和植物乳植杆菌 ZDY2013 (NZ_CP065160.1),以及由本实验室前期筛选鉴定并完成基因组测序的自主知识产权菌株(授权发明专利号为 ZL201310491340.4 和 ZL202110166286.0)植物乳植杆菌 TCCC11824 (CGMCC NO. 8198)。

1.2 方法

1.2.1 CRISPR/Cas 系统类型预测

应用 CRISPR-Cas++ (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>) 网站和 CRISPRdisco 软件寻找 13 株植物乳植杆菌基因组中 CRISPR 和 Cas 的方位,并确定 CRISPR/Cas 系统的类型。

1.2.2 TracrRNA 位置预测

tracrRNA 在 CRISPR 基因座内的位置并不保守^[9],经初步分析,本研究用到的 13 株植物乳植杆菌的 CRISPR/Cas 系统均属于 Type II A 型。对于 Type II 型 CRISPR 系统而言, tracrRNA 出现在 4 个典型

位置,分别为: Cas9 的上游、Cas9 和 Cas1 之间以及 CRISPR 序列的上下游。将 DR 序列与这 4 个位置的序列进行正向、反向比对,筛选出配对碱基数最多的位置,将该位置的序列挑选出来,应用 Promoter 2.0 prediction server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) 进行启动子的寻找,应用 ARNold (<http://rna.igmors.u-psud.fr/>) 进行终止子的寻找,其结果可以确定 tracrRNA 的方向。最后,将方向预测结果和 CRISPR 基因座预测结果绘制成示意图。

1.2.3 重复序列的二级结构分析

因为重复序列具有不完全回文性质,所以重复序列可能形成稳定的发夹二级结构^[4,10]。应用在线软件 RNAalifold (<http://nibiru.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAalifold.cgi>) 分析其二级结构,选择最小自由能法 (minimum free energy, MFE) 计算,剩余选项选择默认,以评估其形成的二级结构的稳定性。

1.2.4 Spacer 序列对噬菌体的靶向情况分析

当细菌被外来遗传物质入侵时,CRISPR/Cas 系统起到识别并剪切外来遗传物质的作用,其中被切割下来的序列(原间隔序列),就被作为新的间隔序列插入 CRISPR 序列中。应用 CRISPR target (http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html) 的噬菌体数据库,查找与植物乳植杆菌 CRISPR/Cas 系统中的间隔序列预期匹配的原间隔序列,最多允许 3 个错配,并将结果绘制成热图。

1.2.5 PAM 序列分析及对结果的可视化

应用 CRISPR target (http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html) 分析原间隔序列附近 10 bp 长度的碱基序列,应用 weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 进行可视化分析,从而初步分析出植物乳植杆菌 Cas9 蛋白对 PAM(proto-

spacer adjacent motif) 序列识别的偏好。

2 结果与分析

2.1 植物乳植杆菌的 CRISPR 基因座结构

13 株植物乳植杆菌的 CRISPR 序列见表 1。本研究涉及的 13 株植物乳植杆菌均只有 1 个已证实的 CRISPR 系统,均存在 4 种 Cas,分别为 Cas9、Cas1、Cas2、Csn2,位于 CRISPR 序列侧翼,表明这 13 株植物乳植杆菌的 CRISPR/Cas 系统的类型全部为 Type II A 型。CRISPR 序列的长度在 168 ~ 1 188 bp 之间,间隔序列的数目在 2 ~ 17 个之间。间隔序列长度为 30 bp 或 60 bp (存在于植物乳植杆菌 IYO2065 中)。13 株植物乳植杆菌 tracrRNA 的方向预测结果表明,其 tracrRNA 均位于植物乳植杆菌的 CRISPR/Cas 系统中的 Cas9 序列与 Cas1 序列之间,与 Cas 转录方向和 CRISPR 转录方向相反。tracrRNA 区与 repeat 区的配对数高达 34 bp,占 repeat 序列的绝大多数 (94.44%)。此外,分析还成功预测了 tracrRNA 的启动子与终止子,但准确序列尚需进一步通过 RNA 深度测序加以验证。将已预测的 CRISPR/Cas 系统和 tracrRNA 绘制成图,如图 1 所示。

2.2 对重复序列二级结构的预测

重复序列会转录成拥有特殊结构的非信使 RNA 以发挥生理功能。重复序列有其特殊性,转录成的 RNA 能够形成茎环结构,其茎长度在 4 ~ 8 个碱基之间。使用 RNAalifold 预测重复序列的 RNA 二级结构,评估植物乳植杆菌 CRISPR 重复序列形成稳定二级结构的可能性,结果如图 2 所示,共预测出 2 种二级结构。

表 1 13 株植物乳植杆菌的 CRISPR 序列

Tab. 1 CRISPR sequence of 13 *L. plantarum* strains

菌株	CRISPR 长度/bp	Spacer 数量	DR 长度/bp	DR 序列
<i>L. plantarum</i> TCCC11824	1 091	16	36	GTCTTGAATAGTAGTCATATCAAACAGGTTTAGAAC
<i>L. plantarum</i> SRCM103473	168	2	36	GTCTTGAATAGTAGTCATATCAAACAGGTTTAGAAC
<i>L. plantarum</i> UNQLp11	234	3	36	GTTCTAAACCTGTTTGATATGACTACTATTCAAGAC
<i>L. plantarum</i> LPT52	564	8	36	GTCTTGAATAGTAGTCATATCAAACAGGTTTAGAAC
<i>L. plantarum</i> ZDY2013	1 025	15	36	GTCTTGAATAGTAGTCATATCAAACAGGTTTAGAAC
<i>L. plantarum</i> VHProbi M25	498	7	36	GTCTTGAATAGTAGTCATATCAAACAGGTTTAGAAC
<i>L. plantarum</i> NCHBL-004	1 092	16	36	GTTCTAAACCTGTTTGATATGACTACTATTCAAGAC
<i>L. plantarum</i> MSJK0048	696	10	36	GTCTTGAATAGTAGTCATATCAAACAGGTTTAGAAC
<i>L. plantarum</i> IYO2065	1 188	17	36	GTCTTGAATAGTAGTCATATCAAACAGGTTTAGAAC
<i>L. plantarum</i> ZDY04	1 026	15	36	GTCTTGAATAGTAGTCATATCAAACAGGTTTAGAAC
<i>L. plantarum</i> WLPL21	1 026	15	36	GTCTTGAATAGTAGTCATATCAAACAGGTTTAGAAC
<i>L. plantarum</i> FLPL05	1 026	15	36	GTCTTGAATAGTAGTCATATCAAACAGGTTTAGAAC
<i>L. plantarum</i> L55	1 092	16	36	GTCTTGAATAGTAGTCATATCAAACAGGTTTAGAAC

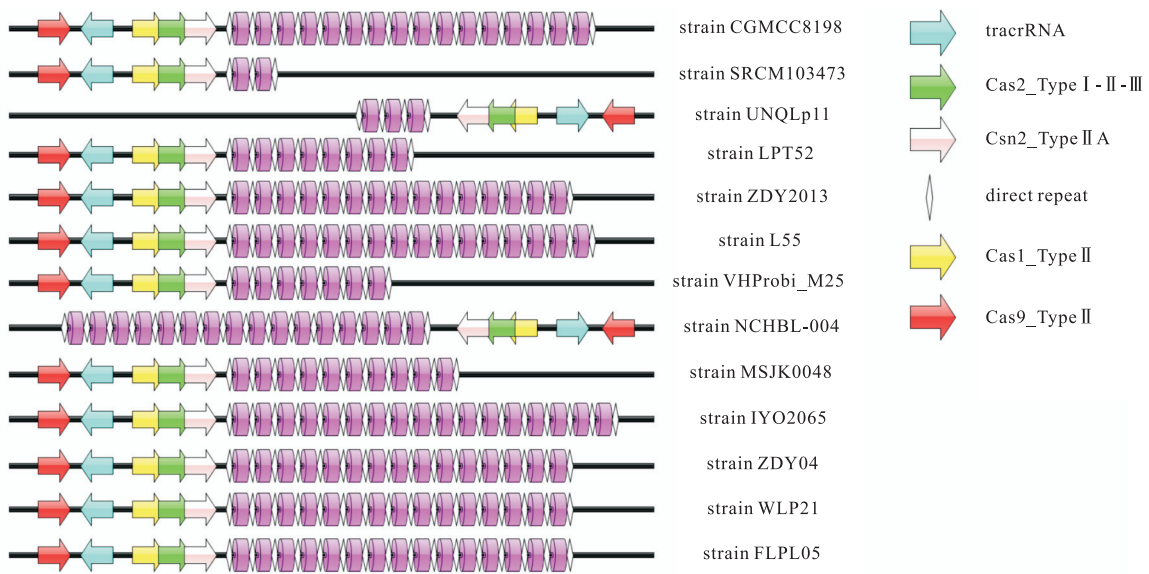


图1 植物乳植杆菌的 CRISPR 基因座结构
Fig. 1 CRISPR locus structure of *L. plantarum*

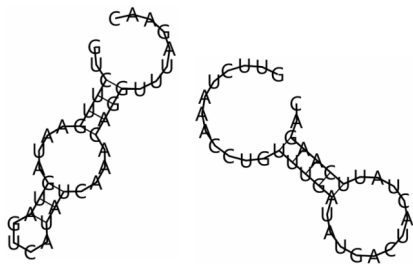


图2 重复序列的 RNA 二级结构
Fig. 2 Secondary structure of repeated RNA

图 2 中左图的二级结构对应植物乳植杆菌菌株为: MSJK0048、VHProbi M25、IYO2065、WLPL21、ZDY04、FLPL05、L55、LPT52、ZDY2013、SRCM 103473、TCCC11824, 最小自由能为-3.35 kJ/mol, 茎长度为 7 个核苷酸序列。图 2 中右图的二级结构对应菌株为植物乳植杆菌 UNQLp11、植物乳植杆菌 NCHBL-004, 最小自由能为-3.35 kJ/mol, 茎长度为 5 个核苷酸序列。这两种二级结构均稳定。

2.3 间隔区对噬菌体的靶向情况分析

间隔区序列(spacer)通常来源于外来遗传物质, 在细菌行使免疫功能的过程中, Cas9 蛋白(Type II 型 CRISPR/Cas 系统)会在识别特定序列后将其剪切下来, 并插入自己的 CRISPR 序列中。为了探究这些植物乳植杆菌可能遭受过的噬菌体侵染, 使用 CRISPRTarget 的噬菌体数据库对 13 株植物乳植杆菌 CRISPR 序列中的间隔序列进行分析, 结果如图 3 所示。

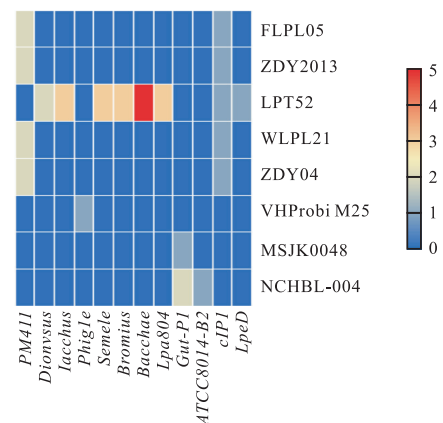


图3 植物乳植杆菌间隔序列对噬菌体的靶向情况
Fig. 3 Targeting situation of *L. plantarum*

在错配 3 个以内的条件下, 图 3 中每个菌株都有靶向的噬菌体, 8 株植物乳植杆菌共靶向 12 种噬菌体, 剩余 5 株在错配 3 个以内的条件下没有靶向噬菌体。靶向噬菌体种类最多的菌株是植物乳植杆菌 LPT52, 可以靶向 *Bromius*、*Bacchae*、*Lpa804* 等 8 种噬菌体。

2.4 植物乳植杆菌 Cas9 蛋白识别 PAM 序列的预测

PAM 序列是位于目标 DNA 上与 CRISPR/Cas 系统识别和切割密切相关的一段特定短序列, 通常紧邻被靶向的 DNA 区域。PAM 序列是 Cas 蛋白识别目标 DNA 的重要标志。PAM 序列的存在增加了 CRISPR/Cas 系统识别目标核酸的特异性和准确性, 使 Cas 蛋白能够更精准地找到并切割外来入侵核酸,

而不会对宿主细胞自身的其他正常 DNA 序列进行非特异性切割。本研究分析结果显示:在这些植物乳植杆菌的原间隔序列的 5'端和 3'端附近均发现有 PAM 序列,长度为 2 个或者 3 个碱基,其中 5'端的 PAM 序列偏好 CCN(图 4 上),3'端 PAM 序列偏好 CC(图 4 下),因此推测植物乳植杆菌 CRISPR 系统识别效率最高的 PAM 序列为 CC。

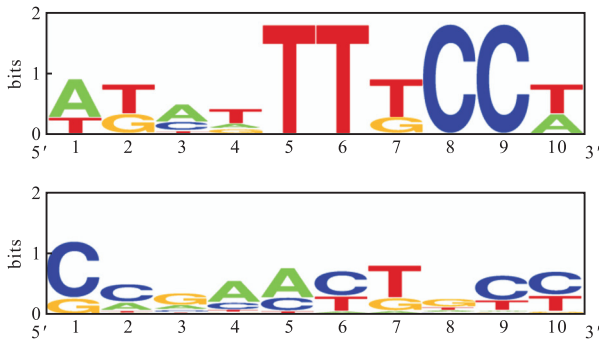


图 4 植物乳植杆菌 CRISPR 系统识别 PAM 分析

Fig. 4 PAM recognition analysis of CRISPR system in *Lactiplantibacillus plantarum*

3 讨论

研究^[11-13]显示,至少在 46% 的细菌基因组以及 84% 的古细菌基因组中都存在 CRISPR/Cas 系统。CRISPR 序列和 Cas 蛋白共同完成细菌免疫功能,外源间隔序列在被捕获后由 Cas1—Cas2 复合物整合到 CRISPR 序列中,每个间隔序列均由重复序列分隔开^[14],间隔序列体现入侵者的特定遗传信息。当宿主再次遭遇相同的外源遗传物质侵入感染时,CRISPR 序列可以更快地识别相同入侵者,并引导 Cas 破坏入侵者序列,使其免疫作用再次被成功发挥。此过程需要宿主 CRISPR 的间隔区序列参与。间隔区在 CRISPR 基因座上的排列顺序对应着进化时间,新获取的间隔区序列总是被整合到 CRISPR 位点的前导序列和第一个重复单元之间^[11]。由此可以推断:间隔区的位置可以代表它们被获取的先后顺序,在一定程度上也反映细菌受到外来遗传物质侵染的顺序,这也为细菌提供了一种基于独特基因座的分型方法^[15]。

Cas 在不同的免疫阶段中体现出不同类型的酶活性,例如核酸酶活性、解旋酶活性和聚合酶活性等。通常将 CRISPR/Cas 系统分为两大类(Class1 和 Class2)、6 种类型(Type I—Type VI)。Class1 系统通过多种 Cas 蛋白复合物参与降解外源遗传物质,包括 Type I 型、Type III 型、Type IV 型。Class2 系统通

过使用单个大 Cas 蛋白执行相同的功能,包括 Type II 型、Type V 型、Type VI 型。这种分类分型方法的依据是干扰阶段起作用的 Cas 蛋白的不同。本研究揭示植物乳植杆菌的 CRISPR/Cas 系统属于 Type II 型,而 II 型 CRISPR-Cas 系统具有结构简单紧凑和较为清晰的遗传背景的优点,在基因编辑工具中被广泛应用^[16]。

目前,CRISPR-Cas 基因编辑系统应用广泛的 Cas9 蛋白,大部分来源于酿脓链球菌等非乳酸菌微生物基因组中,在乳酸菌中的应用效率普遍不高,这就使基于 CRISPR/Cas 的基因编辑系统在乳酸菌中的应用受到很大限制。而事实上,乳酸菌基因组上同样含有丰富的 CRISPR-Cas 资源,对乳酸菌自源性 CRISPR/Cas 系统进行深入预测并基于预测结果开发适合乳酸菌的 CRISPR/Cas 基因编辑系统,对乳酸菌遗传改良具有重要的应用价值。但是,不同乳酸菌的 CRISPR/Cas 类型及特征会存在明显差异。目前,已有嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)、加氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)、卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)等若干种乳酸菌的 CRISPR/Cas 系统被表征解析,但对植物乳植杆菌的 CRISPR/Cas 系统的研究还相对较少^[15]。本研究对 13 株不同植物乳植杆菌的 CRISPR 系统进行了较为系统的分析,预测了 tracrRNA 位置,并对 PAM 序列进行了初步预测,为开发适用于植物乳植杆菌等乳酸菌基因编辑的 CRISPR/Cas9 系统提供了重要理论基础,为基于益生菌及肠道微生物的合成生物学研究给予了新的理论依据,且为解决乳酸菌工业发酵中噬菌体侵染这一产业难题提供了重要的理论思路。

参考文献:

- [1] 于长青,李琳,樊磊,等. 降胆固醇植物乳杆菌差异表达蛋白的筛选与鉴定[J]. 中国食品学报,2018,8(4): 277-283.
- [2] 吕芳,王光强,夏永军,等. 植物乳杆菌 AR501 的抗氧化作用及机制研究[C]//中国食品科学技术学会. 第十四届益生菌与健康国际研讨会摘要集. 上海:上海理工大学医疗器械与食品学院上海食品微生物工程技术研究中心,2019:2.
- [3] MAKAROVA K S, WOLF Y I, KOONIN E V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria[J]. Nucleic acids research, 2013, 41(8): 4360-4377.

- [4] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2551–2561.
- [5] VISWANATHAN P, MURPHY K, JULIEN B, et al. Regulation of *dev*, an operon that includes genes essential for *Myxococcus xanthus* development and CRISPR-associated genes and repeats[J]. *Journal of bacteriology*, 2007, 189(10): 3738–3750.
- [6] KARVELIS T, GASIUNAS G, MIKSYS A, et al. CrRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*[J]. *RNA Biology*, 2013, 10(5): 841–851.
- [7] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607.
- [8] VAN DER OOST J, JORE M M, WESTRA E R, et al. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes[J]. *Trends in biochemical sciences*, 2009, 34(8): 401–407.
- [9] CHYLINSKI K, LE RHUN A, CHARPENTIER E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems[J]. *RNA Biology*, 2013, 10(5): 726–737.
- [10] HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167–170.
- [11] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [12] MARRAFFINI L A, SONTHEIMER E J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1843–1845.
- [13] PINILLA-REDONDO R, RUSSEL J, MAYO-MUNOZ D, et al. CRISPR-Cas systems are widespread accessory elements across bacterial and archaeal plasmids[J]. *Nucleic acids research*, 2022, 50(8): 4315–4328.
- [14] BARRANGOU R, HORVATH P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications[J]. *Nature microbiology*, 2017, 2: 17092.
- [15] BRINER A E, LUGLI G A, MILANI C, et al. Occurrence and diversity of CRISPR-Cas systems in the genus *bifidobacterium*[J]. *PLOS One*, 2015, 10(7): e0133661.
- [16] 朱青, 徐琛, 张书文, 等. 利用内源 CRISPR-Cas 系统开展乳酸菌基因编辑的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(7): 2447–2458.

责任编辑: 郎婧

(上接第 16 页)

- ergosterol and vitamin D₂ generated by UV irradiation[J]. *European food research and technology*, 2022, 249(3): 713–726.
- [5] SERVOUSE M, KARST F. Regulation of early enzymes of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemical journal*, 1986, 240(2): 541–547.
- [6] 谢宗良. 产麦角固醇酵母菌的筛选、诱变与发酵条件优化[D]. 保定: 河北大学, 2007.
- [7] BIKMURZIN R, BANDZEVIČIŪTĖ R, MARŠALKA A, et al. FT-IR method limitations for β -glucan analysis[J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4616.
- [8] 李海军, 王庆波, 张英华, 等. 利用廉价原料生产聚谷氨酸的研究[J]. *食品与药品*, 2022, 24(1): 36–39.
- [9] 王绍杰, 郭雪娜, 何秀萍, 等. 酵母菌利用糖蜜发酵产麦角甾醇的工艺条件优化[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(11): 1676–1680.
- [10] 王纪, 薛小莉. 离子注入麦角甾醇酵母选育及发酵工艺[J]. *微生物学杂志*, 1998, 18(4): 25–28.
- [11] 谭天伟, 戚以政, 郭文彦. 用酵母生产麦角固醇的发酵工艺研究[J]. *微生物学通报*, 1998, 18(4): 25–28.
- [12] 张博润, 何秀萍, 铁翠娟, 等. 麦角固醇高产菌株的构建及其培养条件优化研究[J]. *生物工程学报*, 1999, 15(1): 46–51.
- [13] 莫湘筠, 黄玲, 万宁. 产麦角固醇酵母的选育及其发酵条件的研究[J]. *食品与发酵工业*, 1990(6): 20–23.
- [14] 蔡文, 吴鑫颖, 张倩颖, 等. 高斯芽孢杆菌产中性蛋白酶条件优化及其对烟叶发酵的影响[J]. *食品与发酵科技*, 2022, 58(3): 92–98.
- [15] 吴迪, 程艺超, 姜娇, 等. 酵母中葡萄糖阻遏作用机制研究进展[J]. *微生物学报*, 2023, 63(9): 3409–3427.

责任编辑: 郎婧