

高产细菌素植物乳杆菌的诱变选育研究

王芳 陆文俊 杨静 别小妹*
(南京农业大学食品科技学院 江苏南京 210095)

摘要:为获得细菌素高产菌株,以植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) JLA-9 为出发菌株,对其进行亚硝基胍(NTG)诱变、常压室温等离子体(ARTP)诱变,以及基因组改组。结果表明,亚硝基胍诱变的最佳浓度为 4 mg/mL,经筛选得到两株突变株 N4-26、N4-27,其抑菌效价分别为 2531.93、3057.32 IU/mL;常压室温等离子体诱变最佳时间为 10 s,经筛选得到两株突变株 ARTP10-37、ARTP10-61,其抑菌效价分别为 2974.27、3261.62 IU/mL。将上述抑菌效价提高的菌株经四轮基因组改组后,得到一株突变株 F4-2,其抑菌效价达到 7374.76 IU/mL,相对于原始菌株提高了 2.35 倍,且遗传稳定性良好。研究表明理化诱变结合基因组改组的方式是快速获得理想菌株的有效方法。

关键词:细菌素 植物乳杆菌 诱变 基因组改组

Study on screening of high-yield bacteriocin producing *Lactobacillus plantarum* stains induced by mutations

WANG Fang, LU Wen-jun, YANG Jing, BIE Xiao-mei*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to obtain a high-yield bacteriocin producing strain *Lactobacillus plantarum* JLA-9 was used as the starting strain and mutagenized with nitrosoguanidine (NTG), atmospheric and room temperature plasma (ARTP) and genome shuffling. The results showed that the optimal concentration of NTG was 4 mg/mL, and two mutants named N4-26, N4-27 were obtained, the antibacterial titer of which were 2531.93 IU/mL, 3057.32 IU/mL respectively. The optimal irradiation time of ARTP was 10 s, and two mutants named ARTP10-37, ARTP10-61 were obtained, the antibacterial titer of which were 2974.27 IU/mL, 3261.62 IU/mL respectively. The four strains with higher inhibitory activity were subjected to recursive protoplast fusion. After four rounds of genome shuffling, a strain named F4-2 was screened. The antibacterial titer of strain F4-2 was increased to 7374.76 IU/mL, 2.35 times compared with the wild-type strain. Research showed that physical and chemical mutagenesis combined with genome shuffling was an effective method for obtaining ideal strains.

Key words: bacteriocin; *Lactobacillus plantarum*; mutagenesis; genome shuffling

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)02-0191-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.028

细菌素是由核糖体合成的一些有生物活性的多肽或蛋白质,对亲缘关系较近的微生物有较强的抑制作用^[1-2],还有一些有广谱抑菌活性^[3-7]。几乎所有细菌都能产生细菌素^[8-9],因为其蛋白特性,可被蛋白酶降解,因此被广泛研究。但从自然界分离得到的菌株产细菌素能力较低,无法满足工业生产的需要,通过传统理化诱变及复合诱变获得高产菌株的研究较多^[10],但因其周期长、工作量大、诱变效率低^[11],人们开始寻找其他更有效的方法。

基因组改组被誉为菌株改良技术和代谢工程中的里程碑^[12],它是以原生质体融合的方式对亲本菌株进行整个基因组的随机重组,以期获得目的性状富集的菌株^[13]。与传统诱变方法相比,基因组改组更高效,更方便,不要求了解菌株的遗传背景、代谢途径等,可以避免公众对基因修饰菌的反感^[11,14-15]。

许多研究者先采用理化诱变方法获得性状提升的菌株,再经过几轮的基因组改组获得理想菌株,为了提高产物产量^[15-18],或为了提高菌株对不良环境抗性^[16-17],或为了提高底物转化率^[15,19-20]等等。实践证明,通过传统理化诱变与基因组改组相结合的方式改造菌株,是获得高产细菌素菌株的有效方式^[18,21]。

前期研究中,已分离出一株产广谱细菌素的植物乳杆菌,命名为 *Lactobacillus plantarum* JLA-9^[22]。本研究的目的是通过基因组改组提高该菌株的抑菌能力,用于基因组改组的菌株是原始菌株经亚硝基胍(NTG)和常压室温等离子体(ARTP)诱变得到的,以蜡样芽孢杆菌(AS 1.1846)作为指示菌。本研究将以 *L. plantarum* JLA-9 为原始菌株,通过亚硝基胍(NTG)和常压室温等离子体(ARTP)诱变得到的细菌素产量提高的菌株,并以此为亲本库进行基因组改

收稿日期: 2016-06-13

作者简介: 王芳(1990-)女,在读硕士研究生,研究方向:发酵工程, E-mail: 2014108001@njau.edu.cn。

* 通讯作者: 别小妹(1964-)女,博士,研究方向:食品微生物与生物技术, E-mail: bxm43@njau.edu.cn。

组,获得抑菌能力显著提高的菌株,并测试其遗传稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) JLA-9 由南京农业大学食品科学与技术学院酶工程实验室分离保藏,已保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC No.10686);指示菌蜡样芽孢杆菌(AS 1.1846)来源于中国普通微生物菌种保藏中心;MRS、NA培养基、生理盐水 参考文献配制^[10];Nisin标准品 抑菌效价 1000000 IU/g, Sigma公司。

SW-CJ-1FD型单人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司;LDZX-50KBS立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;隔水式电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂;Anke DL-5-B离心机 上海安亭科学仪器厂;UV-2450紫外可见分光光度计 SHIMADZU;DK-8D型电热恒温水槽 上海森信实验仪器有限公司;ARTP诱变育种仪 无锡源清天木生物科技有限公司;数显游标卡尺 上海恒量量具制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 *Lactobacillus plantarum* JLA-9 生长曲线测定

将于-20℃甘油管保存的*L.plantarum* JLA-9划线接种于MRS固体培养基平板上,37℃培养24h。然后将活化好的菌株接种于MRS液体培养基中(1%,v/v),在0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、36、40、44、48h时间点取样,测定其OD值、pH。以培养时间为横坐标,OD值、pH分别为纵坐标,绘制生长曲线。

1.2.2 Nisin效价标准曲线测定 通常情况下,细菌素以Nisin效价标准曲线法测定其相对抑菌效价。Nisin效价标准曲线建立方法如下^[10]:准确称取0.10g Nisin溶于10mL 0.02mol/L的稀盐酸中,得到效价为10000 IU/mL的母液,通过稀释分别得到效价为5000、2500、1000、500、250 IU/mL的Nisin溶液。采用牛津杯法做抑菌实验,以蜡样芽孢杆菌为指示菌,绘制Nisin效价对数值和抑菌圈直径之间的散点图,添加趋势线,得到Nisin效价标准曲线为: $Y = 0.2976X - 1.6382$, $R^2 = 0.9974$,式中:Y代表Nisin效价对数值;X代表抑菌圈直径,mm。

1.2.3 诱变方法 将培养至对数后期(16h)的菌液离心(8000 r/min,10 min)弃上清液,用生理盐水洗涤2次并重悬得到菌悬液(10^8 CFU/mL)。

1.2.3.1 亚硝基胍(NTG)诱变 移取1mL菌悬液于2mL灭菌离心管中,加入亚硝基胍母液(50 mg/mL)使其终浓度为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/mL。混匀后37℃水浴20 min,处理完成后立即用无菌生理盐水稀释至合适的梯度(10^{-5} ~ 10^{-6}),取100 μL涂布于MRS固体培养基,于37℃培养箱避光培养,以未经亚硝基胍处理的菌悬液作为对照,培养24h后菌落计数^[23]并计算致死率。挑取单菌落发酵(37℃培养箱静置培养48h)并进行抑菌实验^[24],计算正突变率。通过致死率和正突变率确定最佳的亚硝基胍诱

变浓度。多次在最佳亚硝基胍诱变浓度下诱变原始菌株,通过初筛和复筛筛选抑菌效价明显提高的菌株。

亚硝基胍母液(50 mg/mL):称取500 mg亚硝基胍固体,溶于10 mL丙酮,经0.45 μL滤膜过滤待用。
1.2.3.2 常压室温等离子体(ARTP)诱变 将小铁片在酒精灯上灼烧灭菌,置于灭过菌的培养皿中,待小铁片冷却后取10 μL菌悬液均匀涂在其上,放入ARTP诱变育种仪进行处理。处理时间分别为2、3、5、10、12、15 s,处理相应时间后用生理盐水稀释至合适的梯度(10^{-5} ~ 10^{-6}),取100 μL涂布于MRS固体培养基,于37℃培养箱培养,以未经ARTP诱变处理的菌悬液作对照,培养24h后菌落计数并计算致死率。挑取单菌落发酵并进行抑菌实验,计算正突变率。通过致死率和正突变率确定最佳的ARTP诱变时间。多次在最佳ARTP诱变时间下诱变原始菌株,通过初筛和复筛筛选抑菌效价明显提高的菌株。

1.2.3.3 基因组改组 原生体制备、灭活与融合:将理化诱变得到的优良菌株培养至对数生长期后期,离心收集菌体,用原生质体缓冲液洗涤两次并重悬。向重悬菌液中加入溶菌酶溶液(50 mg/mL,20 μL),并于37℃水浴中处理10 min,处理完毕后立即离心(4000 r/min,15 min)去除酶液,并用原生质体缓冲液洗涤两次并重悬,得到原生质体液。将原生质体液分别采用紫外灭活(紫外照射距离为30 cm,照射时间为210 s)和热灭活(58℃水浴中处理50 min)方法进行灭活。取等量经紫外灭活和热灭活得到的原生质体液混合,离心去上清,重悬于一定量原生质体缓冲液中,加入9倍原生质体缓冲液体积的促融剂PEG6000,体积分数为40%,37℃水浴6 min,结束后立即用原生质体缓冲液稀释,离心重悬于原生质体缓冲液中。将融合后的原生质体溶液稀释一定倍数,涂于再生平板,37℃培养得到融合菌落。将融合后的原生质体溶液稀释到 10^{-3} ~ 10^{-4} ,涂于再生平板,37℃培养48h得到融合菌落。基因组改组:将NTG、ARTP诱变得到的菌株进行原生质体融合,将得到的融合子发酵进行抑菌实验,选择抑菌效价高的作为第一轮改组菌株F1。将F1再次进行原生质体制备、灭活、融合,筛选抑菌效价高的菌株作为第二轮改组菌株F2,以此类推。

溶菌酶溶液(50 mg/mL):1 g溶菌酶(索莱宝)溶于5 mL原生质体缓冲液,0.22 μL水相滤膜过滤除菌,-20℃冰箱保存。

原生质体缓冲液配制:Tris-HCl 1.21 g,蔗糖 171.14 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.07 g,双蒸水 1 L,pH6.8,115℃ 20 min灭菌备用。

再生培养基配制:在MRS培养基基础上,不加吐温-80,另加入明胶 2.5%,25 mmol/L $MgCl_2$,25 mmol/L $CaCl_2$,0.5 mol/L蔗糖,1.7%琼脂,115℃,30 min灭菌备用。

1.2.4 致死率与正突变率的计算 致死率(%) = (未处理平板菌落数-处理平板菌落数)/未处理平板菌落数 × 100

正突变率(%) = 抑菌效价提高菌落数 / 用于测定效价菌落数 × 100

1.2.5 细菌素高产菌株筛选

1.2.5.1 初筛 挑取单菌落用 2 mL 离心管进行发酵 (37 °C 培养箱静置培养 48 h), 采用打孔法^[10] 进行抑菌实验, 初步筛选出抑菌活性较好的菌株。

1.2.5.2 复筛 将初筛得到的菌株用三角瓶发酵, 采用牛津杯法^[10] 进行抑菌实验, 筛选得到抑菌相对效价明显提高的菌株, 用甘油管于 -20 °C 保藏。

1.2.6 细菌素高产菌株遗传稳定性测试 将复筛得到的抑菌效价最高的菌株连续传代 5 次, 于 37 °C 发酵培养 48 h 后测定其相对抑菌效价变化。

1.3 数据处理

所有数据都做三组平行实验, 结果以平均值 ± 标准差表示 (SD)。数据采用 Excel 进行分析。

2 结果与分析

2.1 *Lactobacillus plantarum* JLA-9 生长曲线测定

L. plantarum JLA-9 接种后, 在 0~2 h 处于延滞期, 生长缓慢, OD 值无明显变化; 在 2 h 之后, 菌株生长进入对数期, 菌体密度迅速增加, pH 迅速降低; 16 h 之后, 菌株生长进入稳定期, OD 值与 pH 均维持稳定状态, 发酵产物开始积累。菌株在对数生长期对诱变剂较敏感, 且生长状态比较同步, 为了保障一定的菌体量, 因此选择对数生长后期进行诱变处理。对于菌株 *L. plantarum* JLA-9, 选择 16 h 作为进行理化诱变和原生质体制备的菌株培养时间。

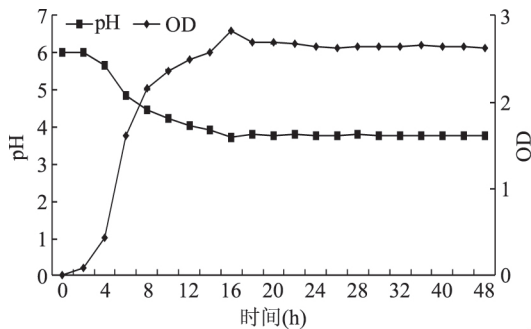


图1 *Lactobacillus plantarum* JLA-9 生长曲线

Fig.1 The growth curve of *Lactobacillus plantarum* JLA-9

2.2 亚硝基胍 (NTG) 诱变

选用终浓度为 1.0~6.0 mg/mL 的亚硝基胍对原始菌株进行诱变处理, 涂布培养后结果如图 2 所示。从图 2 中可以看出, 随着亚硝基胍浓度的增加, 乳酸菌致死率不断提高, 当亚硝基胍浓度达到 4 mg/mL 时, 致死率达到 75.5%, 正突变率相对较高, 为 16.7%, 因此选取 4 mg/mL 为最佳亚硝基胍诱变浓度。在此条件下进行诱变, 经筛选得到 8 株抑菌活性提高的菌株 (见图 3), 其中两株抑菌活性提高较大的菌株 N4-26、N4-27, 其抑菌效价分别为 2531.93、3057.32 IU/mL, 相对于原始菌株分别提高了 14.94%、38.79%。

2.3 常压室温等离子体 (ARTP) 诱变

选用 ARTP 诱变处理时间分别为 2、3、5、10、12、15 s 对原始菌株进行诱变处理, 涂布培养后结果如

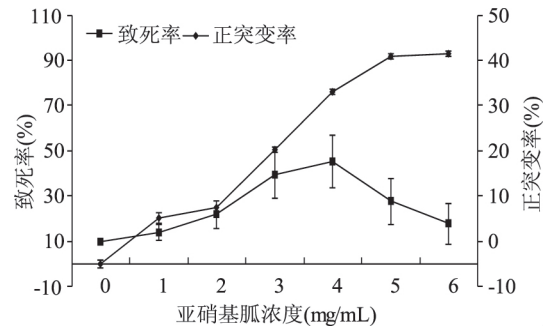


图2 NTG 诱变致死率与正突变率曲线

Fig.2 The fatality rate curve and positive mutation rate curve of NTG mutagenesis

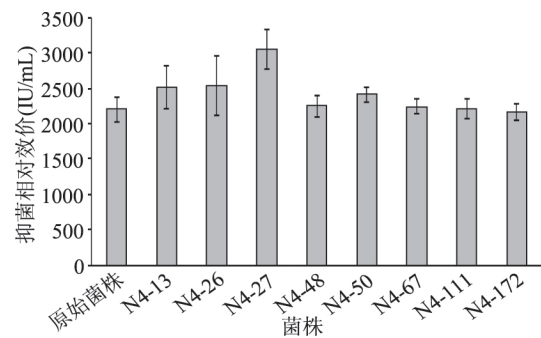


图3 *Lactobacillus plantarum* JLA-9 原始菌株与 NTG 诱变突变菌株相对效价的比较

Fig.3 Comparison of the wild-type and mutant strains of *Lactobacillus plantarum* JLA-9 with NTG for relative potency

图 4 所示。从图 4 中可以看出, 随着处理时间的增加, 乳酸菌致死率不断提高, 当处理时间为 10 s 时致死率为 87.8%。此时菌株发生正向突变的概率为 34.375%, 因此选择 10 s 作为 ARTP 最佳诱变时间。在此条件下进行诱变, 经筛选得到 8 株抑菌活性提高的菌株 (见图 5), 其中两株抑菌活性提高较大的菌株 ARTP10-37、ARTP10-61, 其抑菌效价分别为 2974.27、3261.62 IU/mL, 相对于原始菌株分别提高了 35.02%、48.06%。

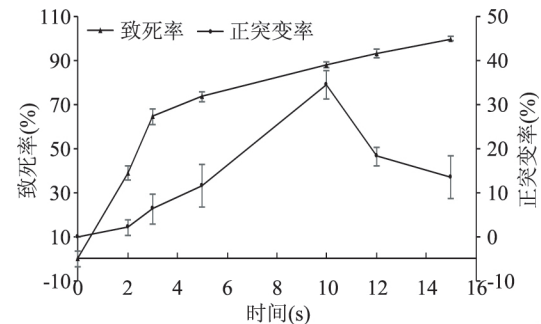


图4 ARTP 诱变致死率与正突变率曲线

Fig.4 The fatality rate curve and positive mutation rate curve of ARTP mutagenesis

2.4 基因组改组

以 NTG、ARTP 诱变获得的四株抑菌效价相对较高的菌株 N4-26、N4-27、ARTP10-37、ARTP10-61 为出发菌株进行基因组改组。经第一轮基因组改组, 筛选到四株抑菌效价高的菌株, 其中 F1-23 效价为

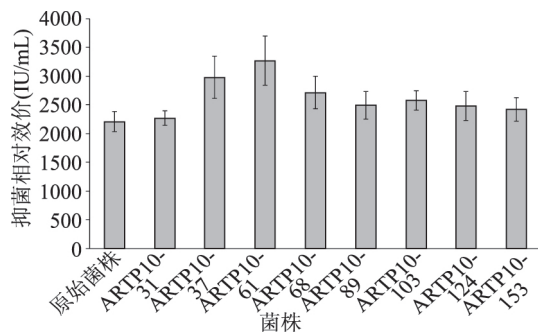


图5 *Lactobacillus plantarum* JLA-9 原始菌株与 ARTP 诱变突变菌株相对效价的比较

Fig.5 Comparison of the wild-type and mutant strains of *Lactobacillus plantarum* JLA-9 with ARTP for relative potency

2895.45 IU/mL 相对于原始菌株提高了 31.44%；经第二轮基因组改组,筛选到效价最高的菌株为 F2-4,其效价为 4026.17 IU/mL,相对于原始菌株提高了 82.77%；以此类推,经过四轮基因组改组,筛到一株抑菌效价最高的菌株 F4-2,其效价达到 7374.76 IU/mL,相对于原始菌株提高了 2.35 倍(见图 6)。

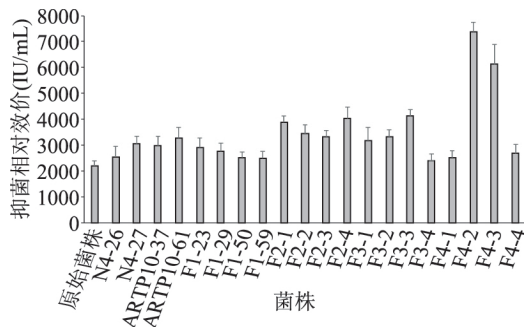


图6 *Lactobacillus plantarum* JLA-9 原始菌株与突变菌株相对效价的比较

Fig.6 Comparison of the wild-type and mutant strains of *Lactobacillus plantarum* JLA-9 for relative potency

2.5 细菌素高产菌株遗传稳定性测试

为观察筛选到的细菌素高产菌株 F4-2 的遗传稳定性,将其连续传代 5 次,以蜡样芽孢杆菌为指示菌,测定其相对抑菌效价变化。从图 7 可以看出,菌种传代 5 次以后抑菌效价无显著差异 ($p < 0.05$),说明该菌有较好的遗传稳定性,可作为后续应用研究的出发菌株。

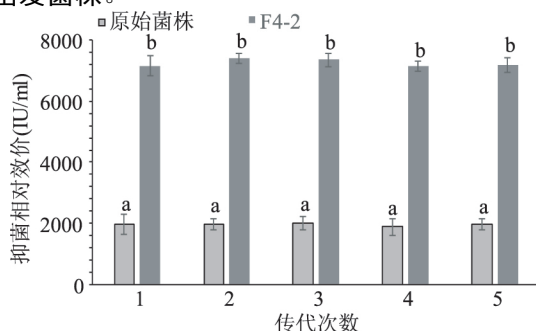


图7 F4-2 遗传稳定性

Fig.7 Genetic stability of F4-2 after five generation
注:不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

3 结论

采用 NTG、ARTP 两种理化方式对植物乳杆菌 JLA-9(抑菌效价为 2202.84 IU/mL) 进行诱变,以期获得高产细菌素菌株。以致死率和正突变率为指标,发现 NTG 浓度为 4 mg/mL、ARTP 处理时间为 10 s 时,两种诱变方式均能获得较好的诱变效果。经过筛选,得到 4 株效价有所提高的菌株,分别为 N4-26、N4-27、ARTP10-37、ARTP10-61,其抑菌效价分别为 2531.93、3057.32、2974.27、3261.62 IU/mL。将上述 4 株菌株进行基因组改组,经 4 次改组后,获得一株抑菌效价明显提高的菌株 F4-2,其效价达到 7374.76 IU/mL,相较于原始菌株,其效价提高了 2.35 倍。实践证明,理化诱变结合基因组改组的方式是快速获得理想菌株的有效方法。

参考文献

- [1] Inglis R F, Bayramoglu B, Gillor O, et al. The role of bacteriocins as selfish genetic elements [J]. *Biology Letters* 2013, 9(3): 156-166.
- [2] Micenkova L, Staudova B, Bosak J, et al. Bacteriocin-encoding genes and ExPEC virulence determinants are associated in human fecal *Escherichia coli* strains [J]. *Bmc Microbiology*, 2014, 14(1): 1.
- [3] Gupta A, Tiwari S K. Plantaricin LD1: A Bacteriocin Produced by Food Isolate of *Lactobacillus plantarum* LD1 [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2014, 172(7): 3354-3362.
- [4] Miao J Y, Guo H X, Ou Y W, et al. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China [J]. *Food Control*, 2014, 42: 48-53.
- [5] Lu X, Yi L H, Dang J, et al. Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis* MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms [J]. *Food Control* 2014, 46: 264-271.
- [6] Lu X, Hu P, Dang Y, et al. Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China [J]. *Food Control*, 2014, 43: 276-283.
- [7] Zhu X, Zhao Y Z, Sun Y L, et al. Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008 [J]. *Food Chemistry* 2014, 165: 216-223.
- [8] Majeed H, Lampert A, Ghazaryan L, et al. The weak shall inherit: bacteriocin-mediated interactions in bacterial populations [J]. *PloS one* 2013, 8(5): e63837.
- [9] O' Connor P M, O' Shea E F, Guinane C M, et al. Nisin H Is a New Nisin Variant Produced by the Gut-Derived Strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484 [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 2015, 81(12): 3953-3960.
- [10] 党丽娟, 高钰淇, 别小妹, 等. Co60 γ 射线复合硫酸二乙酯诱变选育高产新型细菌素 Plantaricin 163-1 菌株的研究 [J]. *食品工业科技* 2015(15): 174-179.
- [11] Gong J X, Zheng H J, Wu Z J, et al. Genome shuffling:

- Progress and applications for phenotype improvement [J]. *Biotechnology Advances* 2009 27(6):996-1005.
- [12] Stephanopoulos G. Metabolic engineering by genome shuffling - Two reports on whole - genome shuffling demonstrate the application of combinatorial methods for phenotypic improvement in bacteria [J]. *Nature Biotechnology* 2002 20(7):666-668.
- [13] Hida H, Yamada T, Yamada Y. Genome shuffling of *Streptomyces* sp U121 for improved production of hydroxycitric acid [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007 73(6):1387-1393.
- [14] Skelley A M, Kirak O, Suh H, et al. Microfluidic control of cell pairing and fusion [J]. *Nature Methods* 2009 6(2):147-152.
- [15] John R P, Gangadharan D, Nampoothiri K M. Genome shuffling of *Lactobacillus delbrueckii* mutant and *Bacillus amyloliquefaciens* through protoplasmic fusion for L-lactic acid production from starchy wastes [J]. *Bioresource Technology* 2008 99(17):8008-8015.
- [16] Yu L, Pei X, Lei T, et al. Genome shuffling enhanced L-lactic acid production by improving glucose tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* [J]. *Journal of Biotechnology* 2008 134(1-2):154-159.
- [17] Wang Y H, Li Y, Pei X L, et al. Genome-shuffling improved acid tolerance and L-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus* [J]. *Journal of Biotechnology* 2007 129(3):510-515.
- [18] Wang H K, Sun Y, Chen C, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus plantarum* for improving antifungal activity [J]. *Food Control* 2013 32(2):341-347.
- [19] Dai M H, Copley S D. Genome shuffling improves degradation of the anthropogenic pesticide pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723 [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 2004 70(4):2391-2397.
- [20] Kumar M. Improving polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by genome shuffling [J]. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci* 2007 9(1):145-149.
- [21] Zheng H J, Gong J X, Chen T, et al. Strain improvement of *Sporolactobacillus inulinus* ATCC 15538 for acid tolerance and production of D-lactic acid by genome shuffling [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010 85(5):1541-1549.
- [22] Zhao S M, Han J Z, Bie X M, et al. Purification and Characterization of Plantaricin JLA-9: A Novel Bacteriocin against *Bacillus* spp. Produced by *Lactobacillus plantarum* JLA-9 from Suan-Tsai, a Traditional Chinese Fermented Cabbage [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2016 64(13):2754-2764.
- [23] 刘慧. 现代食品微生物学实验技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社 2006.
- [24] Gong H S, Meng X, Wang H. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream from China [J]. *Food Control* 2010 21(1):89-96.

(上接第190页)

- 克隆及序列分析 [D]. 天津: 天津大学 2007.
- [13] 邹宇, 胡立明, 胡文忠, 等. 单增李斯特菌在牛奶中生长曲线的拟合和预测模型的建立 [J]. *食品工业科技* 2014 35(11):69-73.
- [14] 周小红, 李学英, 杨宪时, 等. 接种量对单增李斯特菌生长期及生长界面的影响 [J]. *食品工业科技* 2014 35(18):180-184.
- [15] 古丽孜帕·夏热浦汗不同来源产单核细胞李斯特菌株对不同环境因子的抗性研究 [D]. 石河子: 石河子大学 2015.
- [16] Valero A, Carrasco E, Pérez-Rodríguez F, et al. Growth/no growth model of *Listeria monocytogenes*, as a function of temperature, pH, citric acid and ascorbic acid [J]. *European Food Research & Technology* 2006 224(1):91-100.
- [17] 邵美丽, 许岩, 赵燕丽, 等. 一多重耐药单增李斯特菌株的生长特性及毒力分析 [J]. *微生物学杂志* 2011 31(2):24-28.
- [18] 田霞, 李远钊, 张培正, 等. 即食菜卷和肉汤中单增李斯特菌生长模型及控制研究 [J]. *食品与发酵工业* 2005 31(10):68-71.
- [19] Phan-Thanh L, Mahouin F, Aligé S. Acid response of *Listeria monocytogenes* [J]. *International Journal of Food Microbiology* 2000 55(1-3):121-126.
- [20] 刘洁, 史贤明. 两种乳酸菌及其发酵液对单核细胞增生李斯特菌生长的抑制作用 [J]. 上海交通大学: 农业科学版, 2006 24(3):221-225.
- [21] 段效辉, 许红岩, 刘宁, 等. 水产品中单核细胞增生李斯特氏菌的乳酸控制研究 [J]. *食品研究与开发* 2013(23):130-133.
- [22] 陈晨, 胡文忠, 何煜波, 等. Nisin 和柠檬酸对纯培养及鲜切黄瓜中单增李斯特菌的杀菌效果 [J]. *食品工业科技* 2014 35(5):273-276.
- [23] 王旭, 孙晓红, 潘迎捷, 等. 单增李斯特菌 WaX12 及其 sigB 缺失突变株在不同 pH 下生长动力学的比较 [J]. *食品与生物技术学报* 2016(5):477-484.
- [24] 宣晓婷, 丁甜, 刘东红. 食品中亚致死损伤单增李斯特菌的研究进展 [J]. *食品科学* 2015 36(3):280-284.
- [25] 刘柳, 孔保华. 温度及气调包装对冷却猪肉中单核细胞增生性李斯特菌生长的影响 [J]. *食品科学* 2008 29(1):334-337.
- [26] Mead P S, Dunne E F, Graves L, et al. Nationwide outbreak of Listeriosis due to contaminated meat [J]. *Epidemiology & Infection* 2006 134(4):744-751.
- [27] 黄韵. 冷鲜肉中单增李斯特菌活菌分子检测技术研究 [D]. 广州: 华南理工大学 2014.
- [28] 张亚红, 王娉, 杨海荣, 等. 预测微生物学在乳及乳制品中的应用 [J]. *检验检疫学刊* 2015 25(6):62-65.
- [29] 丁甜, 董庆利, 王璐, 等. 单增李斯特菌在营养肉汤中最大比生长速率的预测模型 [J]. *华中农业大学学报* 2010 29(4):522-526.
- [30] 邱红玲, 唐晓阳, 王李伟, 等. 复原乳中三种常见致病菌的生长动力学模型构建 [J]. *上海预防医学* 2016(5):288-293.