

一株食窦魏斯氏菌的分离鉴定 及其质粒的序列分析

张广峰,张楠笛,赵婷婷,许琴,谭霄,向文良*

(西华大学食品与生物工程学院,四川省食品生物技术重点实验室,
古法发酵(酿造)生物技术研究,四川成都 610039)

摘要:目的:探究四川泡菜中含质粒的乳酸菌,并对质粒进行序列和功能分析。方法:采用平板涂布法和碱裂解法分离含质粒乳酸菌,通过菌落形态、生理生化和 16S rDNA 序列分析法对其进行鉴定。利用单酶酶切质粒,并在测序质粒片段的基础上设计引物扩增质粒的剩余片段,对拼接成功的质粒进行序列分析。结果:从四川泡菜中分离出一株含质粒的食窦魏斯氏菌 W5 (*Weissella cibaria*)。该菌株中质粒 pA010 全长为 11630 bp,GC 含量为 34.6%,编码了 4 个可识别功能蛋白,包括酪氨酸重组酶、复制蛋白、抗毒素 PemI 和毒素 PemK。比较酪氨酸重组酶和复制蛋白,推断该质粒为 θ 型复制质粒。其中 PemI 和 PemK 构成的 II-TA 系统对质粒的稳定有一定作用且可能提升食窦魏斯氏菌对周围环境的适应力。结论:食窦魏斯氏菌 W5 是一株含质粒乳酸菌,其序列分析为构建耐受环境胁迫的载体提供了可能。
关键词:四川泡菜,食窦魏斯氏菌,质粒,复制蛋白,TA 系统

Isolation and identification of *Weissella cibaria* and sequence analysis of its plasmid

ZHANG Guang-feng, ZHANG Nan-di, ZHAO Ting-ting, XU Qin, TAN Xiao, XIANG Wen-liang*

(College of Food and Bioengineering, Xihua University, Provincial Key Laboratory of Food Biotechnology of Sichuan,
Institute of Ancient Brewing Technology, Chengdu 610039, China)

Abstract: Objective: Lactic acid bacteria harbored plasmid was isolated from Sichuan pickles and the sequence and function of plasmid was detected. Methods: The lactic acid bacteria harbored plasmid was screened by traditional microbial separation and alkaline lysis and then the strain was identified by morphological and physiological characteristics and its 16S rDNA sequence. Plasmid was digested with single restriction enzymes and the target DNA fragments were purified and sequenced. Then the whole sequence was finally elucidated by primer design and PCR cloning. Results: A strain harbored plasmids was isolated from Sichuan pickles and identified as *Weissella cibaria*. A large plasmid designated as pA010 was isolated from *Weissella cibaria* W5 and was 11630 bp in length with GC content of 34.6%. Sequence analysis indicated that the plasmid pA010 contained four known proteins, including tyrosine recombinase, replicative protein, antitoxin PemI and toxin PemK. Based on tyrosine recombinase and replication protein, pA010 may belong to a theta-type replication plasmid. In addition, PemI and PemK, an II-TA system, may have a role in the stability of the plasmid and enhance the adaptability of bacteria to the surrounding environment. Conclusion: *Weissella cibaria* W5 harbored plasmid and the sequence analysis of its plasmid pA010 provided a probability for construction vectors benefited to environmental stress tolerance.

Key words: Sichuan pickles; *Weissella cibaria*; plasmid; replicative protein; TA system

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)08-0100-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.08.019

引文格式: 张广峰, 张楠笛, 赵婷婷, 等. 一株食窦魏斯氏菌的分离鉴定及其质粒的序列分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(8): 100-105.

魏斯氏菌属于乳酸菌,广泛分布于各类发酵食品、土壤等环境中。不仅具有 β -葡萄糖苷酶活性^[1]、产细菌素能力^[2-3]和较好的抗真菌性^[4-5],而且产生的乳

酸和胞外多糖对食品的风味有一定影响^[6]。故近年来,魏斯氏菌在微生物学、医药学、发酵工业、食品加工等方面的应用受到研究者的广泛关注^[7-8]。在以

收稿日期: 2017-09-13

作者简介: 张广峰(1985-),男,硕士,讲师,研究方向:食品加工, E-mail: 418284396@qq.com。

* 通讯作者: 向文良(1973-),男,博士,教授,研究方向:中国西南地区特色发酵食品微生物过程学, E-mail: xwllm7687@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31571935);四川省科技支撑计划项目(2016FZ0023);四川省教育厅重点项目(14ZA0110)。

往得到的研究成果中,乳酸菌的诸多生理功能都与其携带的质粒相关,如产胞外多糖、产细菌素、抗生素抗性等^[9]。因此对质粒生物学和遗传学的研究受到了极大关注。

许多魏斯氏菌拥有一个或多个天然质粒,但是相对于乳杆菌属、乳球菌属、肠球菌属等质粒,对魏斯氏菌质粒研究较少^[9-10]。Park^[11]、金红星^[12]、Kim^[13]等分别从食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)分别分离出3、2、6个质粒,王海娟等^[14]从融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*)中分离出了2个质粒,并对部分质粒完成了序列分析及载体构建。数据库中魏斯氏菌质粒的相关数据较少,以致于不能推断质粒阅读框中的具体功能^[13]。所以丰富魏斯氏菌质粒数据库对魏斯氏菌属质粒复制、遗传、进化、功能等方面具有重要意义。

中国泡菜中蕴含丰富的乳杆菌质粒资源^[15],因此本研究以中国四川泡菜为分离源,筛选其中含质粒乳酸菌并对质粒进行全序列测定及功能分析,以期构建良好的载体提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

泡菜液 四川盈宇食品有限公司;大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 α) 天根生化科技(北京)有限公司;pGEM-T Simple Vector 普洛麦格(北京)生物技术有限公司;溶菌酶、限制性核酸内切酶 美国 Thermo scientific;Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶 Promega 有限公司;质粒小量提取试剂盒 OMEGA 公司;胶回收试剂盒 天根生化科技有限公司;土壤 DNA Extraction 试剂盒 福际生物技术有限公司;LB 培养基、LB 液体培养基、MRS 液体培养基和改良 MRS 培养基(含 0.75 g/100 mL 的 CaCO₃) 均按文献^[16]配制。

Biometra PCR 仪 德国耶拿分析仪器有限公司;Allegra X-15R 冷冻离心机 贝克曼库尔特公司;720BR 电泳凝胶成像分析仪 Bip-rad(美国);SGSP-02 恒温隔水式培养箱 黄石恒丰器械有限公司;DYY-8C 型电泳仪 北京市六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的分离纯化 取 25 mL 泡菜液于 225 mL 灭菌生理盐水中混合均匀,经 10 倍梯度稀释后涂布于改良 MRS 培养基中,37 °C 倒置培养 48 h。挑取周围形成透明圈的菌落划线纯化,同时进行革兰氏染色和过氧化氢酶实验。将革兰氏染色结果为阳性、过氧化氢酶阴性的菌株初步判定为乳酸菌^[17]。

1.2.2 质粒 DNA 的提取 将纯化的乳酸菌接种至 MRS 液体培养基,37 °C 过夜培养。采用质粒小量提取试剂盒提取质粒 DNA,经过以下修改:菌体以转速 12000 r/min 离心 2 min,ddH₂O 洗涤后重悬于含有 30 mg/mL 溶菌酶的 Solution I 中,37 °C 温育 1 h,其余操作按照说明书进行。1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取质粒 DNA。

1.2.3 含质粒乳酸菌的鉴定 乳酸菌的生化特征分析按照《乳酸菌细菌分类鉴定及实验方法》^[18]进行。

参考文献^[19]方法提取含质粒乳酸菌基因组 DNA。16S rDNA 的 PCR 扩增引物为 Eu27F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') 和 1492R (5' - GGTTACCTTGTACGACTT-3')。扩增条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环,72 °C 保持 10 min。扩增产物连接到 pGEM-T 后转化到 *E.coli* DH5 α 中,筛选阳性克隆子对 16S rDNA 测序。所得序列提交至 NCBI 进行同源性比对,利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

1.2.4 质粒序列测定 根据质粒条带,回收其中的大质粒命名为 pA010。分别利用不同的限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Pst* I 对分离纯化的质粒 pA010 进行酶切分析,回收酶切反应液。参照都立辉等^[17]方法补平酶切后的黏性末端并在 3' 端引入碱基 A,回收其中 DNA 片段同 pGEM-T 载体连接并转化到 *E.coli* DH5 α 中,筛选阳性克隆测序。以测序结果中最长序列片段为基础设计引物 W1CF (5' - TTTTCCACTTCGTTATTCTTG - 3') 和 W1CR (5' - TTGACAACGACAAGTATTAGAGC - 3') 扩增质粒 pA010 剩余片段。PCR 扩增条件:95 °C 5 min,95 °C 1 min,50 °C 1 min,72 °C 2 min,30 个循环,72 °C 10 min。将 PCR 扩增片段与载体连接、转化到 *E.coli* DH5 α ,挑选阳性克隆测序,拼接各个测定序列获得质粒 pA010 的全序列。

1.2.5 质粒的生物信息学分析 利用 NCBI 网站上的 ORF Finder (Open reading frame finder) 寻找该质粒可能存在的开放阅读框 (ORF),然后对质粒的核苷酸及氨基酸序列进行分析。DNAMAN 6.0 绘制质粒图谱,CDD 网站用于假定蛋白保守结构域的寻找,CLUSTAL X 实现序列的多重比对。通过分析质粒上的序列信息,推导质粒复制方式,并将该质粒全序列提交 GenBank 数据库。

2 结果与分析

2.1 含质粒菌株的分离鉴定

从四川泡菜中分离到 11 株含溶钙圈的菌株,编号为 W1~W11,均呈乳白色、边缘整齐的圆形菌落,油镜下观察显示菌体为杆状、紫色。对这 11 株菌进行质粒普查发现只有菌株 W5 携带 2 个天然质粒(图 1)。将其中大质粒命名为 pA010,分离纯化该质粒,通过酶切和 PCR 扩增对其进行序列测定。

对含质粒菌株 W5 进行常规生理生化实验,结果如表 1。根据形态学和生化特征,检索乳酸菌分类系统,初步确定该菌株属于魏斯氏属(*Weissella*)。提取含质粒菌株 W5 的基因组 DNA 并进行 16S rDNA 扩增,其扩增产物序列大小为 1463 bp。将菌株序列与 GenBank 数据库中标准菌株的序列进行 BLAST 比对发现,该菌株与食窦魏斯氏菌(*W. cibaria*)的 16S rDNA 相似性达 99%。该菌株与标准菌株的 16S rDNA 的系统发育表明,该菌株与食窦魏斯氏菌具有较大的亲缘关系(图 2)。一般来讲,在种分类等级上,如果 2 个分类单位间的 16S rDNA 序列同源性大于 97.5%,则认为属于同一个种^[20]。结合菌株的形态学和生理生化特征,这株含内源质粒的乳酸菌被

表1 含质粒菌株 W5 部分生理生化特征

Table 1 Part of physiological and biochemical results of strain W5 containing plasmid

指标	革兰氏染色	过氧化氢酶实验	1 ℃ 生长	37 ℃ 生长	3% NaCl 生长	6.5% NaCl 生长
结果	+	-	W	+	+	+
指标	葡萄糖产酸	葡萄糖产气	葡萄糖酸盐	阿拉伯糖	纤维二糖	果糖
结果	+	+	-	+	+	+
指标	半乳糖	乳糖	麦芽糖	蔗糖	蜜二糖	棉子糖
结果	-	-	+	+	-	-
指标	核糖	海藻糖	木糖	山梨醇	甘露醇	木糖醇
结果	+	-	+	-	-	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性，“W”表示弱阴性。

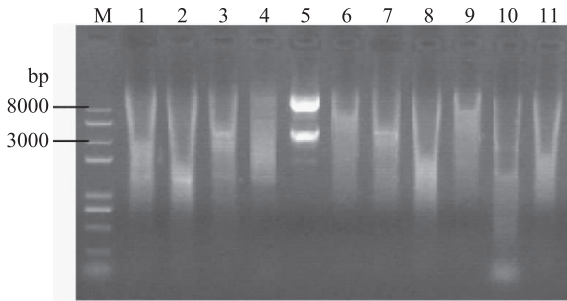


图1 四川泡菜中乳酸菌的质粒提取电泳图

Fig.1 Plasmid extracts electrophoresis of Lactic acid bacteria in Sichuan Pickle

注:M为DNA Marker;1~11为乳酸菌W1~11的质粒提取液。鉴定为食窦魏斯氏菌。

2.2 质粒全序列测定

将回收纯化的质粒 pA010 分别用限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Pst* I 进行酶切分析,发现该质粒仅有 4 个 *EcoR* I 酶切位点(图 3)。回收酶切反应液,末端补平后连入 pGEM-T,经测序分析 *EcoR* I 酶切的 4 个片段长度分别为 5762、2820、2677、371 bp。以最长序列片段为基础设计引物,对 pA010 进行 PCR 扩增,以确定各个质粒片段的连接顺序,最终得到 pA010 的完整序列(GenBank 登录号为 MF951102)。

2.3 质粒 pA010 的一般结构分析

食窦魏斯氏菌 W5 较大质粒 pA010 序列大小为

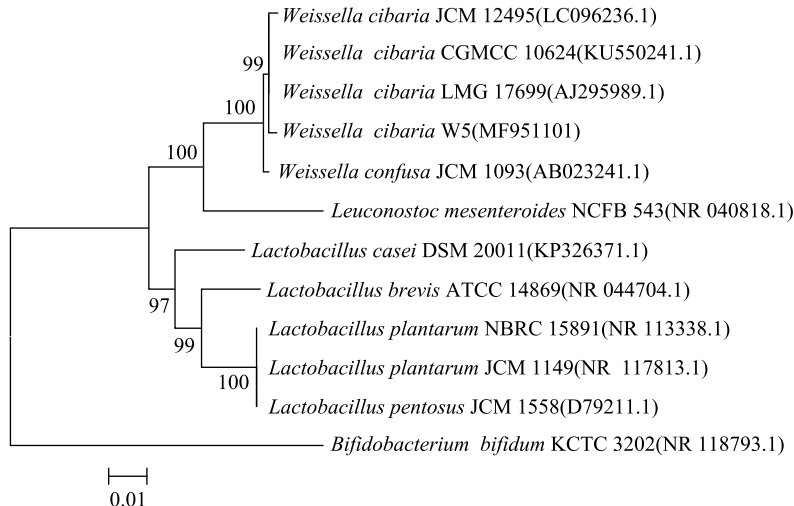


图2 含质粒菌株 W5 基于 16 S rDNA 序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of strain W5 containing plasmid based on 16S rDNA sequence

图3 质粒 pA010 酶切分析

Fig.3 Restriction enzyme analysis of pA010

注:M为DNA Marker;E、B、P分别代表 *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Pst* I 酶切 pA010。

11630 bp,为一个闭合环状双链 DNA 分子,其中 GC 含量 34.6%。通过 NCBI 网站上的 ORF Finder 软件查找 ORF,搜索到 12 个序列长度大于 300 bp 的 ORFs。由于一个具有起始密码子和终止密码子的 ORF 不一定是蛋白质的编码序列,因此搜索到的 ORFs 中还有非编码基因和重复序列,所以再将序列进行 BLASTp 蛋白质同源片段分析^[21]。12 个 ORFs 中有 4 个 ORFs 编码已知功能蛋白,其他 8 个 ORFs 编码假定蛋白(表 2)。通过 DANman6.0 查找质粒的 *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Pst* I 位点发现,质粒中无 *Bam*H I 和 *Pst* I 的酶切位点,4 个 *EcoR* I 酶切位点,此结果与

表2 质粒 pA010 推断的 ORFs 编码的蛋白质
Table 2 The putative ORFs and the encoded proteins of plasmid pA010

阅读框	碱基位置	氨基酸数	氨基酸相似性 (%)	相似性菌株	编码蛋白
ORF1	6602-5616	328	100	短乳杆菌 KB290	假定蛋白
ORF2	8747-9541	264	98	乳酸片球菌质粒 pSMB74	酪氨酸重组酶
ORF3	10955-11557	200	99	植物乳杆菌质粒 pG6302	复制蛋白
ORF4	4820-5401	193	99	马里乳杆菌	假定蛋白
ORF5	640-1158	172	99	植物乳杆菌	假定蛋白
ORF6	2679-2182	165	99	植物乳杆菌	假定蛋白
ORF7	10434-9943	163	98	植物乳杆菌	假定蛋白
ORF8	7686-8144	152	99	破布子乳酸菌	假定蛋白
ORF9	4548-4114	144	99	短乳杆菌	假定蛋白
ORF10	3726-3355	123	99	植物乳杆菌	假定蛋白
ORF11	8611-8267	114	100	乳酸片球菌质粒 pSMB74	PemK, 毒素
ORF12	8949-8605	114	94	乳酸片球菌质粒 pSMB74	PemI, 抗毒素

图4一致。为标识已知功能蛋白、假定蛋白和 *EcoR* I 酶切位点在质粒中的位置,通过 DANman6.0 构建质粒图谱,如图4所示。

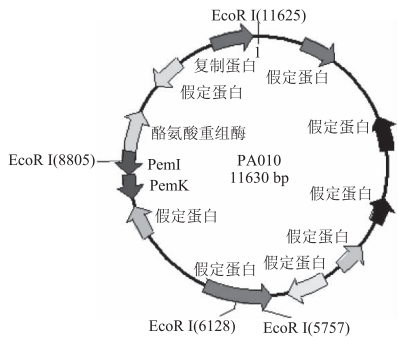


图4 食窦魏斯式菌 W5 中 pA010 的质粒图谱
Fig.4 Plasmid map of pA010 from *W. cibaria* W5

2.4 质粒 pA010 的功能分析

ORF2 编码了一个 INT_C_like_3,与植物乳杆菌中酪氨酸重组酶显示了 99% 的相似性,与乳酸片球

菌质粒 pSMB74 中的酪氨酸重组酶显示了 95% 的相似性。这个蛋白属于 DNA breaking/re-joining enzymes 超家族,可能与质粒多聚体的解离有关^[22]。Motlagh A 等^[23]表明,这个蛋白经常被发现在乳酸菌的 θ 型复制质粒。

ORF3 编码复制蛋白 Rep,与植物乳杆菌 G63 内源质粒 pG6302 复制蛋白的相似性达 100%,与植物乳杆菌内源质粒 pLME300 复制蛋白的相似性达 93%。这些同源 Rep 有一个保守的涉及质粒复制起始的 Rep_3 结构域 (pfam01051),这个结构域属于 RepA_N 质粒家族,一般为 θ 型复制质粒所有^[15]。而且 pLME300^[24] 和 pG6302^[25] 被认为是一种 θ 型复制的质粒,所以 pA010 被认为是一种 θ 型复制的质粒。复制蛋白的上游 515 bp 有类似起始质粒复制的重复序列,预测可能是复制起始区(图5)。复制子区域包含 3 个同向重复序列 (Direct repeats, DR) 和 3 个反向重复序列 (Invert repeats, IR),还有一段富含 A、T 序列。Xi 等^[26]认为正向重复序列是复制蛋白的目标且

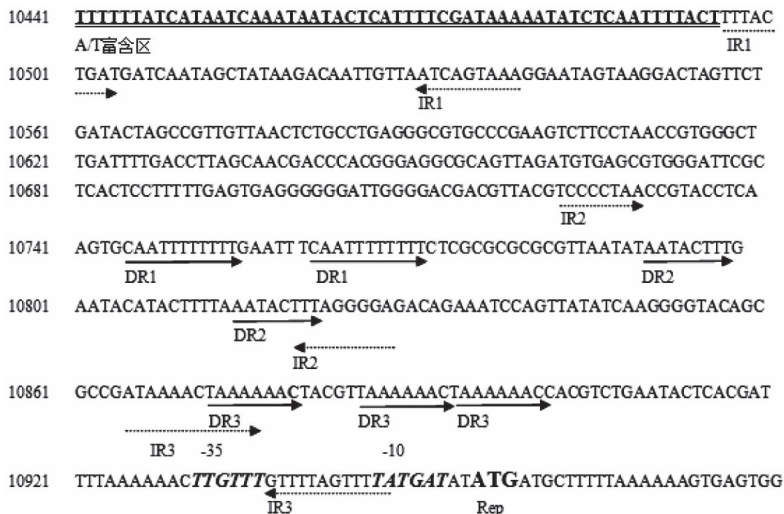


图5 质粒 pA010 假定的复制起始区

Fig.5 The predicted origin region of replication of pA010

注:双下划线为 A/T 富含区;实线箭头为正向重复 (DR);虚线箭头为反向重复 (IR);加粗斜体字母为-10 和-35 区;加粗 ATG 为复制蛋白 (Rep) 的起始点。

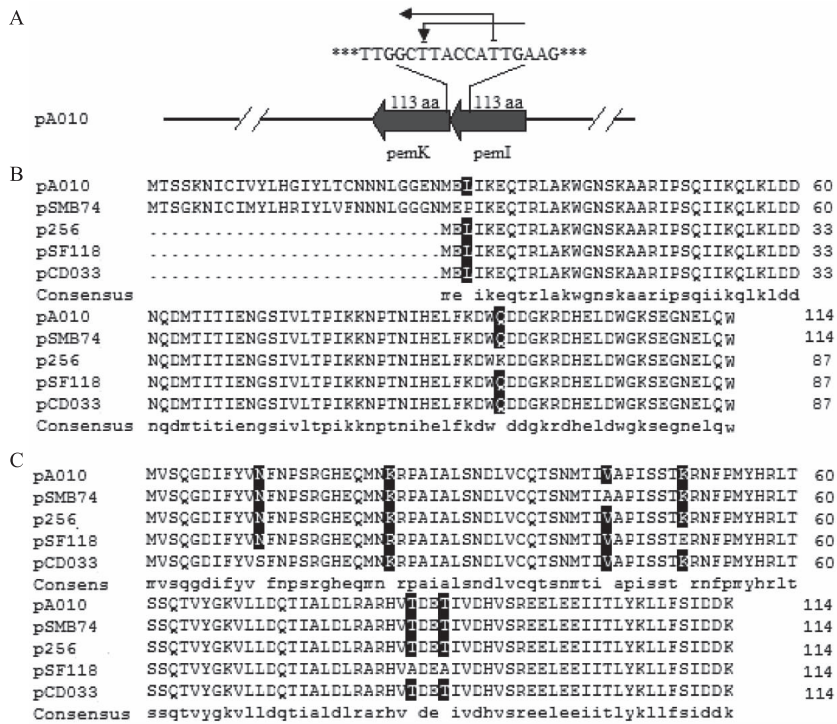


图6 pemI、pemK在pA010上的遗传结构及其蛋白序列同源性比对

Fig.6 Genetic structure and sequence alignment of the pemI/pemK locus in pA010

注:A为pemI/pemK遗传结构示意图,箭头所示pemI和pemK的转录方向;B为pemI编码产物与PemI蛋白序列比对;

C为pemK编码产物与PemK蛋白序列比对,pSMB74、p256、pSF118、pCD033分别表示

P.acidilactici H、*L.plantarum* NC7、*L.salivarius* UC118、*L.plantarum* CD033中的质粒。

在质粒的不相容性上有重要作用,而且A/T富含区被认为是复制的起始。

ORF11和ORF12编码的蛋白分别与乳酸片球菌H中质粒pSMB74的PemK和PemI蛋白显示了100%和94%的相似性。Fang等^[25]报道,PemK和PemI是一个II型毒素和抗毒素系统(type II Toxin and Antitoxin system, II-TA),其中PemK编码稳定的毒素,PemI编码不稳定的抗毒素。ORF11和ORF12之间重叠7个碱基,提示两个基因可能共同构成一个操纵子(图6)。细菌质粒编码的TA系统作为沉溺系统(plasmid addiction systems, PAS),通过细胞分裂后死亡的机制维持质粒的稳定性^[27]。而且TA系统利于细菌滞留感染的形成(细菌进入一种低生长或休眠状态),在这种状态下细胞对周围环境的适应力可以得到很大提升,如对抗生素的耐药增加、在有害环境下保持一部分生存个体等^[28]。在植物乳杆菌NC7中的质粒p256^[29]、植物乳杆菌CD033中质粒pCD033^[26]和唾液乳杆菌UCC118中的质粒pSF118^[27]中都编码了一个TA系统。近年来,乳酸菌中TA研究受到了相当的重视,不仅是因为质粒携带的TA基因维持细胞质粒的遗传稳定性,更是由于乳酸菌中TA的研究对乳酸菌中菌株的多样化的元基因组分析以及乳酸菌开发有重要意义^[30]。

3 结论

本实验以四川泡菜为分离源,从中筛选到一株含质粒的食窦魏斯氏菌。其中大质粒pA010全序列结果显示该质粒全长11630 bp,GC含量为34.6%,同

时编码了四个可识别功能蛋白:酪氨酸重组酶、复制蛋白、抗毒素PemI和毒素PemK。通过分析这些蛋白的功能发现,该质粒可能是 θ 型复制质粒,而且毒素-抗毒素系统对质粒稳定以及魏斯氏菌耐受周围环境提供了可能。

参考文献

- [1] Lee K W, Han N S, Kim J H. Purification and characterization of beta-glucosidase from *Weissella cibaria* 37 [J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2012, 22(12): 1705-1713.
- [2] Li S W, Chen Y S, Lee Y S, et al. Comparative genomic analysis of bacteriocin-producing *Weissella cibaria* 110 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(3): 1-11.
- [3] 王筱梦, 江芸, 孙芝兰, 等. 1株产细菌素乳酸菌的鉴定及所产细菌素的诱导合成现象[J]. *食品科学*, 2016, 37(21): 170-175.
- [4] Baek E, Kim H, Choi H, et al. Antifungal activity of *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa* in rice cakes [J]. *J Microbiol*, 2012, 50(5): 842.
- [5] 常伟, 饶瑜, 胡怀容, 等. 一株抗真菌食窦魏斯氏菌AT6的特性分析及培养条件优化[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(6): 193-196.
- [6] Galle S, Schwab C, Arendt E, et al. Exopolysaccharide-forming *Weissella* strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(9): 5834.
- [7] 王海娟, 戴雨珂, 潘渠. 魏斯氏菌的研究现状[J]. *成都医学院学报*, 2014, 9(6): 747-750.

- [8] Lee K W, Park J Y, Jeong H R, et al. Probiotic properties of *Weissella strains isolated from human faeces* [J]. *Anaerobe*, 2012, 18:96-102.
- [9] 孙大庆, 李洪飞, 宋大巍, 等. 乳杆菌属天然质粒研究进展 [J]. *食品科学*, 2015, 36(11):251-255.
- [10] 孙大庆, 李洪飞, 杨健. 植物乳杆菌编码复制起始蛋白天然质粒的系统进化分析 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(5):1047-1055.
- [11] Park M S, Kim S H, Kim J D, et al. Molecular characterization of plasmid DNA from *Weissella cibaria* isolated from Kimchi [J]. *Korean Journal of Genetics*, 2007, 29(1):29-35.
- [12] 金红星, 杨希寅, 成文玉. 辣白菜中分离含内源性质粒的魏斯氏菌及其鉴定 [J]. *中国酿造*, 2012, 31(1):77-79.
- [13] Kim S Y, Oh C G, Lee Y J, et al. Sequence analysis of a cryptic plasmid pKW2124 from *Weissella cibaria* KLC140 and construction of a surface display vector [J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2013, 23(4):545.
- [14] 王海娟, 戴雨珂, 苏森森, 等. 一个融合魏斯氏菌隐蔽质粒的序列分析 [J]. *生物技术通报*, 2016, 32(4):217-221.
- [15] 杨四佳, 王颖, 李宇婷, 等. 泡菜中乳杆菌的快速检出和乳杆菌质粒资源的初步调查 [J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(6):639-644.
- [16] 杜连祥, 路福平. *微生物学实验技术* [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2014:349-354.
- [17] 都立辉, 霍贵成, 鞠兴荣, 等. 一株植物乳杆菌的分离鉴定及其隐蔽质粒的序列分析 [J]. *食品科学*, 2010, 31(17):236-239.
- [18] 凌代文. *乳酸细菌分类鉴定及实验方法* [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999:117-127.
- [19] Xiang W L, Liang H Z, Liu S, et al. Isolation and performance evaluation of halo tolerant phosphate solubilizing bacteria from the rhizospheric soils of historic Dagong Brine Well in China [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(11):2629-2637.
- [20] Stackebrand T E, Gebel B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(4):846-849.
- [21] Silvia H, Reingard G, Stefan H. Characterization of the *Lactobacillus plantarum* plasmid pCD033 and generation of the plasmid free strain *L. plantarum* 3NSH [J]. *Plasmid*, 2015, 81(11):9-20.
- [22] Rob V H, Raphael L, Gipsi L M, et al. Towards a more accurate annotation of tyrosine-based site-specific recombinases in bacterial genomes [J]. *Mobile DNA*, 2012, 3(1):6.
- [23] Motlagh A, Bukhtiyarova M, Ray B. Complete nucleotide sequence of pSMB 74, a plasmid encoding the production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1994, 18(6):305.
- [24] Gfeller K Y R, Melle L, Teuber M, et al. Sequence and genetic organization of the 19.3-kb erythromycin- and dalfofristin-resistance plasmid pLME300 from *Lactobacillus fermentum* ROT1 [J]. *Plasmid*, 2003, 50(3):190-201.
- [25] Fang F, Flynn S, Li Y, et al. Characterization of endogenous plasmids from *Lactobacillus salivarius* UCC118 [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2008, 74(10):3216-3228.
- [26] Xi X, Fan J, Hou Y, et al. Characterization of three cryptic plasmids from *Lactobacillus plantarum* G63 that was isolated from Chinese pickle [J]. *Plasmid*, 2013, 70(3):321-328.
- [27] 孙瑞, 宁德刚. 细菌 II 型毒素-抗毒素系统活性的调控 [J]. *微生物学通报*, 2016, 43(12):2714-2719.
- [28] 楚海荣, 付玉荣, 伊正君. 细菌毒素-抗毒素系统研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(2):271-274.
- [29] Sørvig E, Skaugen M, Naterstad K, et al. Plasmid p256 from *Lactobacillus plantarum* represents a new type of replicon in lactic acid bacteria, and contains a toxin-antitoxin-like plasmid maintenance system [J]. *Microbiology*, 2005, 151(2):421-431.
- [30] 徐谓, 李洪军, 贺雅非. 乳酸菌中毒素-抗毒素系统研究进展 [J]. *食品科学*, 2015, 36(19):260-264.
- [13] Bester M, Schönfeldt H C, Pretorius B, et al. The nutrient content of selected South African lamb and mutton organ meats (offal) [J]. *Food Chemistry*, 2018, 238:3.
- [14] Russell J B, O' Connor J D, Fox D G, et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation [J]. *Journal of Animal Science*, 1992, 70(11):3551.
- [15] 中华人民共和国农业部. NY/T798-2015 复合微生物肥料 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2015.

(上接第 99 页)

201.

- [9] 章和珍, 张保根, 万美兰. 复混肥中氮、磷、钾的简易测定法 [J]. *江西农业科技*, 1996(4):21-22.
- [10] 王治泽, 魏琬. 复混(复合)肥料中氮、磷、钾含量测定标准解读 [J]. *山东化工*, 2016, 45(8):56-57, 60.
- [11] 陈倩倩, 刘波, 王阶平, 等. 微生物发酵床猪舍不同发酵等级垫料中大肠杆菌的分离鉴定 [J]. *中国畜牧兽医*, 2017(1):268-274.
- [12] 李增胜, 张庆, 徐世艾. 搅拌和溶氧对黄原胶发酵的影响 [J]. *食品科学*, 2009, 30(17):253-257.

欢迎订阅 《食品工业科技》