

16S rRNA 和 *recA*、*groEL* 基因分类鉴定乳酸 乳球菌乳酸亚种和乳脂亚种的比较

徐海燕 吕媵 孙志宏 于洁 张家超 孟和毕力格 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 【目的】比较 16S rRNA 和 *recA*、*groEL* 基因部分序列用于乳酸乳球菌乳酸亚种和乳脂亚种分类鉴定的效果。【方法】对已鉴定的 8 株分离自传统发酵乳的乳酸乳球菌, 选取 *recA* 和 *groEL* 基因片段, 通过 PCR 扩增、测序, 将测序得到的序列比对后构建系统发育树, 并与 16S rRNA 基因序列分析技术进行比较。【结果】比较分析不同菌株 16S rRNA 和 *recA*、*groEL* 基因的亲缘关系, *recA*、*groEL* 基因可以准确地完成乳酸乳球菌乳酸亚种和乳脂亚种的区分和鉴定。【结论】*recA* 和 *groEL* 基因序列分析可以实现乳酸乳球菌乳酸亚种和乳脂亚种的区分, 因其具有快速、准确、稳定的特点, 可适合于乳酸乳球菌乳酸亚种和乳脂亚种间的快速分类鉴定。

关键词: 乳酸乳球菌乳酸亚种, 乳酸乳球菌乳脂亚种, *recA* 基因, *groEL* 基因, 分类鉴定

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA100902); 农业部现代农业产业技术体系建设项目(No. CARS-37); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(No. NJZY12 096)

*通讯作者: Tel: 86-471-4319940; 信箱: hepingsdd@vip.sina.com

收稿日期: 2012-12-26; 接受日期: 2013-02-28

Compared on classification and identification of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* based on 16S rRNA gene and *recA*, *groEL* gene

XU Hai-Yan LÜ Qiang SUN Zhi-Hong YU Jie ZHANG Jia-Chao
MENGHE Belige ZHANG He-Ping*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineering, Education Ministry of China, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Objective] Comparing the effects of 16S rRNA gene with *recA* and *groEL* gene used in the classification and identification of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris*. [Methods] Eight *L. lactis* isolated from the traditional fermented milk have been classified by 16S rRNA gene, the *recA* and *groEL* genes of these strains were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and the PCR products were sequenced, the phylogenetic trees were constructed including 16S rRNA gene and above-mentioned two housekeeping genes. [Results] Comparative analysis of genetic relationship of 16S rRNA gene and the *recA*, *groEL* genes, the *recA* and *groEL* genes possesses the superiority in classification and identification of *L. lactis* subsp. *lactis* and *cremoris*. [Conclusion] Distinction of *L. lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* can be achieved by *recA* and *groEL* genes sequence analysis. Due to the fast, accurate and stable characteristics, which were more appropriate for differentiation of *L. lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* at the levels of subspecies.

Keywords: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *recA* gene, *groEL* gene, Classification and identification

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)作为乳球菌属中最具代表性的菌种,在分类学中归于硬壁菌门(Firmicutes)、杆菌纲(Bacilli)、乳杆菌目(Lactobacillales)、链球菌科(Streptococcaceae)、乳球菌属(*Lactococcus*)。该菌为革兰氏阳性兼性厌氧菌,细胞对称生长呈球形或卵圆形,不生芽孢,不运动,无荚膜。最适生长温度为30℃,能在10℃生长,但在45℃高温和5%的NaCl条件下不能生长^[1]。*L. lactis*最初被鉴定为乳酸链球菌(*Streptococcus lactis*),直到1987年才由

Schleifer等^[2-3]重新划分为*L. lactis*。目前*L. lactis*包括4个亚种,分别为乳酸乳球菌乳酸亚种(*L. lactis* subsp. *lactis*)、乳酸乳球菌乳脂亚种(*L. lactis* subsp. *cremoris*)、乳酸乳球菌霍氏亚种(*L. lactis* subsp. *hordniae*)^[2]和*L. lactis* subsp. *tractae*^[4]。

其中,*L. lactis* subsp. *lactis*和*L. lactis* subsp. *cremoris*最为常见,常用于食品发酵特别是干酪制作,对发酵乳制品的货架期维持和感官品质的形成都有着重要作用^[5]。例如,在生产切达干酪时,*L. lactis* subsp. *cremoris*可以通过降解苦肽来

改良风味^[6]。一些 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *L. lactis* subsp. *cremoris* 的质粒也有着重要的作用, 是基因工程的理想载体, 可以编码细菌素, 可以提高宿主对噬菌体浸染的抵抗力, 还可以表达各种胞壁蛋白等^[7]。但是, *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *L. lactis* subsp. *cremoris* 亲缘关系较近, 采用 16S rRNA 基因序列分析, 其分辨率不高, 以至于不能很好地完成这两种乳酸乳球菌的分类鉴定。

随着分子生物学和基因诊断技术的迅速发展, 产生了许多新的分类方法, 如 DNA-DNA 杂交^[8], SSU rRNA 基因序列^[9], 16S rRNA-PCR 指纹图谱分析^[10]等已经用来鉴定 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *L. lactis* subsp. *cremoris*, 但是由于重现性和分辨率等原因, 使得这些方法在其分类研究中都存在着一定的局限性。本文以 *recA*、*groEL* 基因对 8 株 *L. lactis* 分离株以及 2 株模式菌株和 8 株已完成全基因组测序的参考菌株在亚种水平上进行分类鉴定, 并与 16S rRNA 基因序列分析方法比较, 综合评价 *recA*、*groEL* 基因序列分析用于 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *cremoris* 分类鉴定的可能性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株: 本研究所用 8 株 *L. lactis* 分离株由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供, 具体菌株分离地和 16S rRNA 基因序列号见表 1, 所用 2 株模式菌株和 8 株已完成全基因组测序的参考菌株序列号见表 2。

1.1.2 主要仪器: Applied biosystems 公司的 PCR 仪, Gene Company Limited 的 ND-1000 型微量紫外分光光度计, 金坛市正基仪器有限公司的 HHSI-NI 恒温水浴槽, 北京赛智创业科技有限公司的 CDS8000 型 UPV 凝胶成像分析系统, 上海一恒科技有限公司的 DHP-9272 型电热恒温培养箱, 上海精天电子仪器有限公司的 PL303/01 电子天平, Eppendorf 的 5810R 型高速冷冻离心机, 北京市六一仪器厂的 DYY-12 电泳仪等。

1.1.3 主要试剂和引物: 本试验 PCR 扩增试剂为 TaKaRa Ex Taq (DRR001C); 所用 PCR 扩增引物由上海桑尼生物科技有限公司合成(表 3)。

表 1 试验所用菌株
Table 1 Strains used in this study

菌株 Strains	分离地 Isolated location	GenBank 注册号 GenBank accession numbers		
		16S rRNA	<i>recA</i>	<i>groEL</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IMAU80857	甘肃	HM059017	KC117341	KC117326
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IMAU10881	内蒙古	HM218589	KC117342	KC117327
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IMAU10921	内蒙古	HM218629	KC117343	KC117328
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IMAU60096	西藏	FJ749817	KC117344	KC117329
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IMAU11075	内蒙古	HM218776	KC117345	KC117330
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IMAU11113	内蒙古	HM218813	KC117346	KC117331
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IMAU11111	内蒙古	HM218811	KC117347	KC117332
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IMAU11112	内蒙古	HM218812	KC117348	KC117333

表 2 参考菌株和模式菌株
Table 2 Reference strains and type strains

菌株 Strains	GenBank 注册号 GenBank accession numbers		
	16S rRNA	<i>recA</i>	<i>groEL</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCDO 607 ^T	AB100802	—	—
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> A76	CP003132	CP003132	CP003132
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	AM406671	AM406671	AM406671
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	CP000425	CP000425	CP000425
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000	CP002094	CP002094	CP002094
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 ^T	AB100803	—	—
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KF147	CP001843	CP001843	CP001843
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IO-1 DNA	AP012281	AP012281	AP012281
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CV56	CP002365	CP002365	CP002365
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> I11403	AE005176	AE005176	AE005176

注: —: 菌株未测序的基因.

Note: —: The gene was no sequenced.

表 3 *recA* 和 *groEL* PCR 引物
Table 3 Primers of *recA* and *groEL* genes

引物 Primer	核苷酸序列 Sequence (5'→3')	核苷酸数目 Size (bp)
<i>recA</i>	TTCACCTTATGCGACTTGG	18
	TTGGGTCTTGTTATCTCC	18
<i>groEL</i>	AGGATTTGGTGATCGTCGTA	20
	GGGTCCATTGGAGGCATA	18

注: 引物设计以 *L. lactis* subsp. *lactis* I11403 为模板.

Note: *L. lactis* subsp. *lactis* I11403 was the template of primer design.

1.2 方法

1.2.1 菌株基因组 DNA 的提取: 采用改良的 CTAB-冻融方法提取菌株基因组 DNA^[11], 即用液氮反复冻融后进行提取。

1.2.2 *recA* 和 *groEL* 基因 PCR 扩增: 使用表 3 中对应的引物, 对 8 株 *Lactococcus lactis* 分离株进行扩增。扩增条件如下: 95 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。

1.2.3 电泳检测和 PCR 产物测序: 取 2 μL 的 PCR 产物与 2 μL 6×Loading buffer 混合, 加样于预先制备的 1%琼脂糖凝胶点样孔中进行电泳, 电压 100 V, 在 0.5×TBE 电泳液中进行 20 min。

电泳后用溴化乙锭(EB)染色 20 min, 紫外灯下观察检测, 将扩增成功的 2 个基因的扩增产物由上海桑尼生物科技有限公司纯化、测序, 得到分离株 2 个基因选定片段的核苷酸序列。

1.2.4 系统发育树构建: 从 GenBank 数据库中下载供试菌株和模式菌株的 16S rRNA 基因序列及已完成全基因组测序菌株的 16S rRNA 基因、*recA* 基因和 *groEL* 基因序列, 与本试验测序得到的供试菌株的 *recA* 基因和 *groEL* 基因序列(表 1、2) 采用 ClustalW 比对, 并用 MEGA 4.0 软件计算菌株进化距离, 运用 NJ (Neighbor-Joining) 法分别构建 16S rRNA 基因和 *recA*、*groEL* 基因的系统

发育树, 其中自展检验(Bootstrap)重复抽样 1 000 次^[12]。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因序列分析

从 GenBank 数据库中下载供试菌株、2 株模式菌株和参考菌株的 16S rRNA 序列, 利用软件 MEGA 4.0 计算进化距离, 采用 NJ 法构建系统发育树(图 1)。8 株供试菌株和 8 株参考菌株以及 2 株模式菌株的一致性达到 99.5%。系统发育树显示, 16S rRNA 基因序列法可以将 8 株供试菌株分成 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *L. lactis* subsp. *cremoris* 两类, 其中 IMAU11075、IMAU11113、IMAU11111、IMAU11112 和 *L. lactis* subsp. *cremoris* 的模式菌株以及参考菌株聚成一类, 4 株供试菌株初步鉴定为 *L. lactis* subsp. *cremoris*, 而其它 4 株供试菌株和 *L. lactis* subsp. *lactis* 的模式菌株以及参考菌株聚在一个分支上, 初步鉴定为 *L. lactis* subsp. *lactis*, 且两个分支的展次都大于 50%, 意味着两个拓扑结构稳定。但由于遗传距离极为接近, 两个亚种的种系发育区分的并不明显, 分类效果不显著, 这可能是由于 16S rRNA 基因序列在 *L. lactis* 的两个亚种间相对保守, 进化速度太慢而导致。张家超等^[13]曾用 16S rRNA 基因序列鉴定这两个亚种, 把它们和其它乳酸菌一起构建 16S rRNA 基因序列的系统发育树, 其中 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *L. lactis* subsp. *cremoris* 聚成一类, 一致性高达 99.0% 以上, 16S rRNA 基因测序分析并没有有效区分这两个亚种。1998 年 Lawrence 等^[14]扩增 31 株 *L. lactis* 的 16S rRNA 基因序列, 对得到的扩增片段采用连接酶链式反应(LCR)和限制性酶消化两种方法来区分 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *cremoris*, 结果发现 31 株表型是 *L. lactis* subsp. *lactis* 中有 21 株菌是 *L. lactis* subsp. *cremoris*。因此单纯采用 16S rRNA 基因序列分析的方法, 有可能使得这两个亚种的鉴定不够准确。

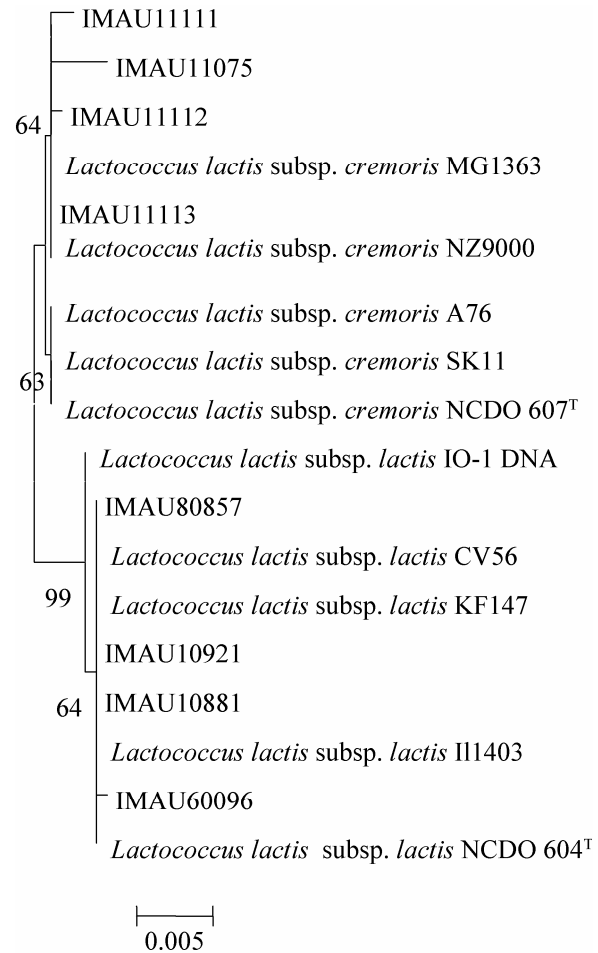


图 1 8 株供试菌株与模式菌株、参考菌株 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the 16S rRNA gene of 8 isolates and type strains, reference strains

注: 分支点上的数字为 Bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的几率; 比例尺显示水平线的长度, 代表碱基替换数。

Note: The numbers of nodes indicate bootstrap values, and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together. The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position.

2.2 *recA* 和 *groEL* 基因序列分析

通过 PCR 扩增、测序, 获得 8 株供试菌株 *recA* 和 *groEL* 部分基因的序列, 将序列与测序峰图进行比较后去掉有差错和模糊的碱基, 上传 GenBank 获得登录号(表 1)。利用软件 MEGA 4.0

中的 NJ 法构建系统发育树(图 2, 图 3)。从图中可以看出, 两个基因的系统发育树和 16S rRNA 基因序列的发育树基本一致, 但不同的是 *recA* 和 *groEL* 基因较 16S rRNA 基因的系统发育树分型效果更明显、更理想, 更清晰地显示了两个亚种的亲缘关系。

早在 2000 年, Thompson 等^[15]利用 *recA* 作标记研究弧菌科细菌的系统发育关系, 表明 *recA* 基因比 16S rRNA 基因具有更好的辨别能力, 适合作为细菌分类鉴定的工具。图 2 是 *recA* 基因构建的系统发育树, *recA* 基因同样把 8 株供试菌株和 8 株参考菌株分成两个分支, 其中 IMAU60096、IMAU80857、IMAU10921 和 IMAU10881 四株

菌和 *L. lactis* subsp. *lactis* 的参考菌株聚成一类, 且较其它两株参考菌株与 *L. lactis* subsp. *lactis* CV56 的亲缘关系更近。而 IMAU11075、IMAU11113、IMAU11111 和 IMAU11112 聚在 *L. lactis* subsp. *cremoris* 的分支上, 与 *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 和 NZ9000 聚在一个小的分支上。通过相似性比对, 发现 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *L. lactis* subsp. *cremoris* 间平均差异达到 8.2%, 较 16S rRNA 基因序列有更大的差异性, 分辨力更强。2001 年, Torriani 等^[16]用 *recA* 部分基因测序和特异性 PCR 技术将 *L. pentosus*、*L. paraplantarum* 和 *L. plantarum* 清晰地区分, 也说明 *recA* 基因在乳酸菌的分类鉴定中有很高的分辨力。

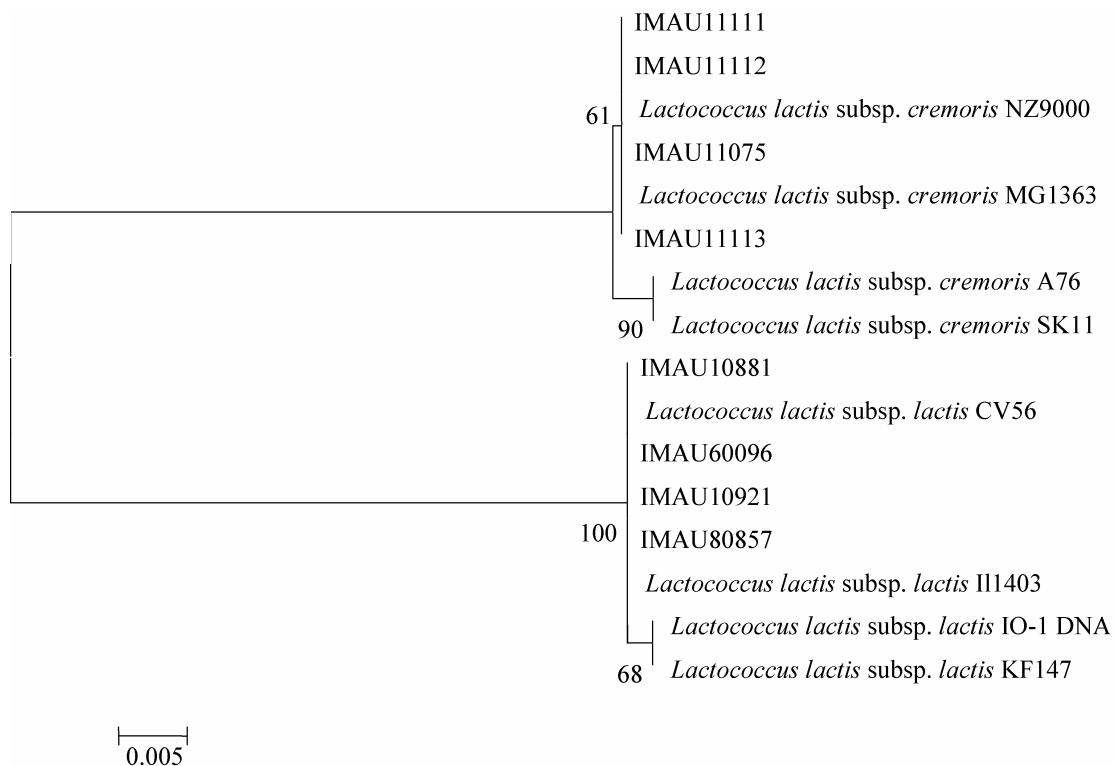


图 2 8 株供试菌株与参考菌株 *recA* 基因序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the *recA* gene of reference strains and 8 isolates

注: 分支点上的数字为 Bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的几率; 比例尺显示水平线的长度, 代表碱基替换数。

Note: The numbers of nodes indicate bootstrap values, and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together. The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position.

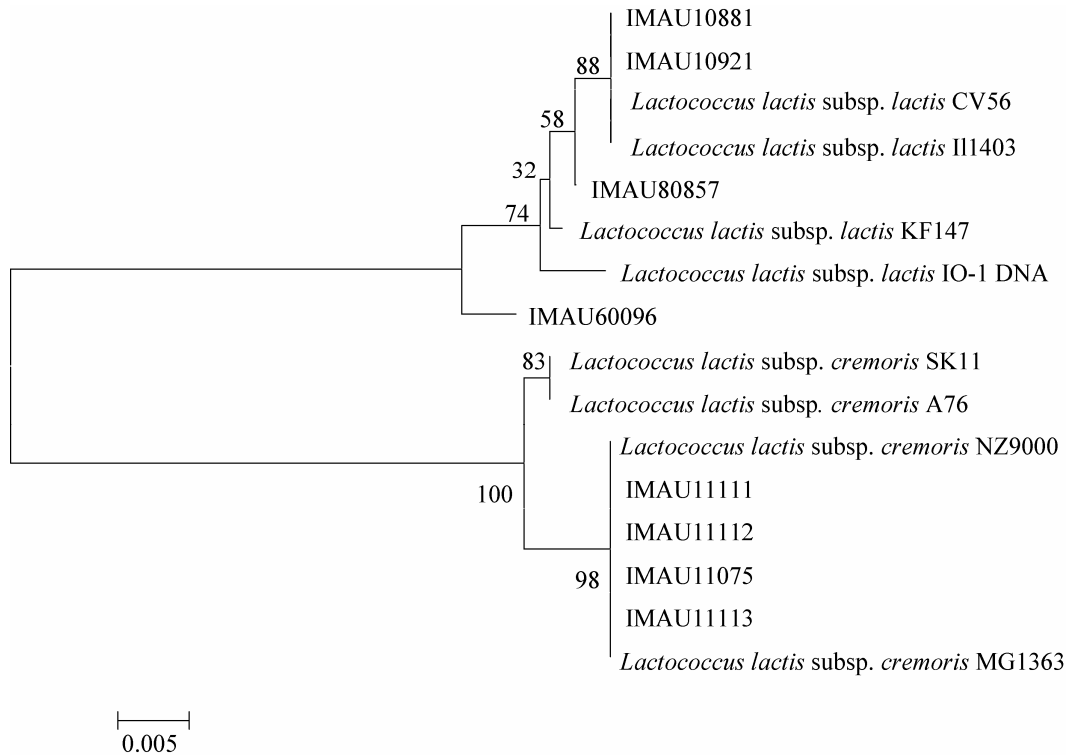


图 3 8 株供试菌株与参考菌株 *groEL* 基因序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the *groEL* gene of reference strains and 8 isolates

注: 分支点上的数字为 Bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的几率; 比例尺显示水平线的长度, 代表碱基替换数。

Note: The numbers of nodes indicate bootstrap values, and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together. The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position.

2008 年, Blaiotta 等^[17]对乳杆菌的 43 个种共 116 株乳杆菌 *groEL* 基因序列进行系统分析, 发现多变区的区分能力显著高于 16S rRNA 基因, 有效地将乳杆菌区别开来, 同时表明 *groEL* 基因比经典的 16S rRNA 基因分析技术分辨率高, 可适用于大量乳酸菌的分离鉴定研究。图 3 为 *groEL* 基因部分序列构建的系统发育树分析, 供试菌株同样聚成两类, 且两个亚种间遗传距离约为 88.9%, 明显高于 16S rRNA 基因序列的差异性。供试菌株 IMAU11075、IMAU11113、IMAU11111 和 IMAU11112 与 *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 和 NZ9000 的一致性为 100%, 聚在一个分支, 与该亚种的另外两个参考菌株亲缘关系较远, 一致性是 98.7%, 这与 16S rRNA 基因序列同

源性分析结果相似。虽然两个类群间的进化关系较为稳定, 但在分支内部, 特别是 *L. lactis* subsp. *lactis* 亚种中, 菌株与其最邻近种的关系出现了变化。该基因清晰地把 IMAU60096、IMAU80857、IMAU10921 和 IMAU10881 四株供试菌株分成了 2 个分支, 其中 IMAU60096 单独在一个分支, 它与 IMAU80857、IMAU10921 和 IMAU10881 相比, 与 *L. lactis* subsp. *lactis* 的参考菌株的亲缘关系较远。同时, 系统发育树中还清晰地显示出 IMAU80857、IMAU10921 和 IMAU10881 与 *L. lactis* subsp. *lactis* CV56 的亲缘关系, IMAU80857 较其它 2 株供试菌株与该参考菌株的亲缘关系远, 一致性是 99.4%, IMAU10921 和 IMAU10881 与其的一致性为 100%。由此可以得出, *groEL* 基

因相对于 16S rRNA 基因序列能够更好地对 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *cremoris* 进行区分, 建议将 *groEL* 基因作为一种用于 *L. lactis* 两个亚种快速、准确的鉴定方法。

3 讨论

比较 16S rRNA 基因序列和 *recA*、*groEL* 部分基因序列构建的系统发育树, 发现系统发育树分型结果基本一致, 都可以把 8 株供试菌株鉴别成 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *L. lactis* subsp. *cremoris* 两个亚种。其中菌株 IMAU60096、IMAU80857、IMAU10921 和 IMAU10881 被鉴定为 *L. lactis* subsp. *lactis*, 菌株 IMAU11075、IMAU11113、IMAU11111 和 IMAU11112 被鉴定为 *L. lactis* subsp. *cremoris*。但 *recA*、*groEL* 基因部分序列两个亚种的遗传距离远远大于 16S rRNA 基因序列, 可以更准确、清晰地展现两个亚种的亲缘关系。Blaiotta 等^[18]在 2002 年研究 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *L. lactis* subsp. *cremoris* 的 16S rRNA 全基因序列只在前 200 bp 中存在 9–10 个碱基的差异, 而对于 16S rRNA 基因序列全长 1 500 bp 左右, 其差异不足 1%, 是无法有效区分这两个亚种的。本试验比较的 16S rRNA 基因序列在系统发育树中虽然可以把两个亚种区分开来, 但由于同源性高, 亲缘关系近, 并不能给出一个准确的区分。同样早在 1991 年, Koehler 等^[19]应用传统生理生化鉴定的方法和 16S rRNA 基因序列分析技术对乳酸菌进行了分类鉴定, 鉴定结果显示也无法将 *L. lactis* 准确地区分到亚种水平。

相对于 16S rRNA 基因, 应用 *recA*、*groEL* 两个管家基因对 *L. lactis* subsp. *cremoris* 和 *lactis* 两个亚种进行区分, *recA*、*groEL* 基因的分辨能力更强。其中 *recA* 基因序列两个亚种的遗传距离约为 8.2%, 而 *groEL* 基因显示的两个亚种的遗传距离为 11.1%左右, 这都明显高于 16S rRNA 基因序

列。将 *recA* 基因和 *groEL* 基因的系统发育树图谱进行比较, 发现 2 个管家基因的分型效果存在一定的差异, *groEL* 基因序列的差异性高于 *recA* 基因, 在有效区分两个亚种的同时, 还清晰地展示了 *L. lactis* subsp. *lactis* 族的各菌株间的亲缘关系。其中分离自西藏地区的菌株 IMAU60096 独自形成一个分支, 而 *L. lactis* subsp. *lactis* 族的其它菌株形成另一个分支。这可能是由于西藏地区海拔高、气候多变等环境因素造就了菌株不同于其它菌株的进化。同时分离自甘肃的菌株 IMAU80857 与分离自内蒙古的 IMAU10921 和 IMAU10881 分别聚在两个小分支上, 这也说明了菌株进化可能与地区环境有关。Cai 等^[20]采用 6 个等位基因的 MLST 技术分析了 40 株分离自植物、人肠道、人血液以及不同地区干酪中 *L. casei*, 其结果也表明分离自不同环境中的菌株由于特定的环境使其发生了特定的遗传进化, 其遗传特性与分离环境息息相关。

总之, 本试验比较了 16S rRNA 基因和 *recA*、*groEL* 基因序列对 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *cremoris* 的区分能力, 并有效地将其鉴定到亚种水平。其中 *groEL* 基因在 *L. lactis* subsp. *lactis* 和 *cremoris* 两个亚种的分型中显示了更好地分辨力, 可用于这两个亚种的快速分类鉴定。

参 考 文 献

- [1] 张刚. 乳酸细菌——基础、技术和应用[M]. 北京: 北京化学工业出版社, 2007: 60–61.
- [2] Schleifer KH. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 1987, 46(3): 201–203.
- [3] Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, et al. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov.[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1985, 69(2): 183–195.
- [4] Pérez T, Balcázar JL, Peix A, et al. *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. nov. isolated from the

- intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(8): 1894–1898.
- [5] Smit G, Smit BA, Engels WJ. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(3): 591–610.
- [6] Vedamuthu ER, Sandine WE, Elliker PR. Flavor and texture in cheddar cheese. I. Role of mixed strain lactic acid starter cultures[J]. Journal of Dairy Science, 1966, 49(2): 144–150.
- [7] McKay LL. Functional properties of plasmids in lactic streptococci[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1983(49): 259–274.
- [8] Erlandson K, Batt CA. Strain-specific differentiation of lactococci in mixed starter culture populations using randomly amplified polymorphic DNA-derived probes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(7): 2702–2707.
- [9] Mangin I, Corroler D, Reinhardt A, et al. Genetic diversity among dairy lactococcal strains investigated by polymerase chain reaction with three arbitrary primers[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 86(3): 514–520.
- [10] Salama M, Sandine W, Giovannoni S. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57: 1313–1318.
- [11] 乌日娜, 张和平, 孟和毕力格. 酸马奶中乳杆菌 *L. casei* Zhang, ZL12-1 的 16S rDNA 基因序列及聚类分析[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(6): 4–9.
- [12] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [13] 张家超, 王芳, 徐海燕, 等. 6种区分乳酸乳球菌乳酸亚种和乳酸乳球菌乳脂亚种的分子生物学方法的比较[J]. 微生物学报, 2010, 50(12): 1670–1676.
- [14] Lawrence JH, Julie CS, Graham P. Two methods for the genetic differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris* based on differences in the 16S rRNA gene sequence[J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 166(1): 15–20.
- [15] Thompson CC, Thompson K, Vandemeulebroecke K, et al. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(3): 919–924.
- [16] Torriani S, Felis GE, Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(8): 3450–3454.
- [17] Blaiotta G, Fusco V, Ercolini D, et al. *Lactobacillus* strain diversity based on partial *hsp60* gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation[J]. Applied and Environment Microbiology, 2008, 74(1): 208–215.
- [18] Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, et al. 16S–23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2002, 25(4): 520–527.
- [19] Koehler G, Ludwig W, Schleifer KH. Differentiation of *Lactococci* by 16S rRNA gene restriction analysis[J]. FEMS Microbiology Letters, 1991, 84(3): 307–312.
- [20] Cai Hui, Beatriz T, Zhang Wei, et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity[J]. Microbiology, 2007, 153(8): 2655–2665.