

# 嗜热链球菌多位点序列分型及其特性测定

田辉<sup>1</sup>, 霍贵成<sup>1</sup>, 刘飞<sup>1</sup>, 陈玲玲<sup>2</sup>, 谷春涛<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

(2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:** 本文旨在研究嗜热链球菌多位点序列分型方法的可行性。利用多位点序列分型技术, 对实验室保藏的 8 株和全基因组公布的 6 株嗜热链球菌进行基因分型, 并分析菌株的同源性, 最后测定 8 株嗜热链球菌的产酸速率和蛋白质水解等表型特征。结果显示 8 株实验室菌株分属于 4 种基因型, 6 株全基因组菌株分属于 5 个基因型; 菌株亲缘关系远近不一, 其中分离自中国的 ND03、MN-ZLW-002 和 0# 具有较高同源性, 分离自新疆酸奶的 09086、09087 和 09088 具有较高同源性, 分离自内蒙古酸奶的菌株 09067、09078 和 09079 与分离自法国酸奶的 JIM8232 具有较高同源性, 分离自法国发酵剂的 s4 与分离自法国酸奶的 CNRZ1066 具有较高同源性; 8 株实验室菌株的产酸速率和蛋白质水解具有菌株特异性, 且表型特性与基因分型基本一致。多位点序列分型可对嗜热链球菌进行有效分型。

**关键词:** 嗜热链球菌; 多位点序列分型; 同源性; 特性

文章编号: 1673-9078(2015)9-81-86

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.014

## Multilocus Sequence Typing and Determining the Characteristics of *Streptococcus thermophilus*

TIAN Hui<sup>1</sup>, HUO Gui-cheng<sup>1</sup>, LIU Fei<sup>1</sup>, CHEN Ling-ling<sup>2</sup>, GU Chun-tao<sup>1</sup>

(1. Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

(2. College of Food Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the feasibility of multilocus sequence typing for *Streptococcus thermophilus*. Multilocus sequence typing technology was used to genotype eight in-house *S. thermophilus* strains and an additional six *S. thermophilus* strains for which whole-genome sequences have been published. The homology of these strains was also analyzed. Phenotypic characteristics including acid production rate and protein hydrolysis were determined for the eight in-house *S. thermophilus* strains. The results showed that these eight strains belonged to four genotypes, whereas the other six strains belonged to five genotypes. The phylogenetic relationships among all strains varied. Among them, ND03, MN-ZLW-002, and 0#, isolated from China, had relatively high homology; 09086, 09087, and 09088, isolated from Xinjiang yogurt, had relatively high homology; 09067, 09078, and 09079, isolated from Inner Mongolia yogurt, and JIM8232, isolated from French yogurt, had relatively high homology; and s4, isolated from a French fermentation agent, and CNRZ1066, isolated from French yogurt, had relatively high homology. The acid production rates and protein hydrolysis of the eight in-house strains were strain specific, and the phenotypic properties were largely in accord with the genotypes. In summary, multilocus sequence typing is effective for the genotyping of *S. thermophilus* strains.

**Key words:** *Streptococcus thermophilus*; multilocus sequence typing; homology; properties

嗜热链球菌是一种重要的工业用菌种, 在乳制品生产中, 其重要性仅次于乳酸乳球菌<sup>[1]</sup>。由于嗜热链球菌具有产酸快、改善产品质构特性和风味特征的特

收稿日期: 2014-12-03

基金项目: 国家 863 项目 (2011AA100902); 国家自然科学基金 (31401512)

作者简介: 田辉 (1984-), 男, 博士研究生, 研究方向: 乳酸菌性能研究与应用

通讯作者: 霍贵成 (1958-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 营养与食品安全

点, 因此被广泛应用于多种乳制品 (如酸奶和奶酪) 的生产中。不同的嗜热链球菌菌株之间具有一定的特性差异, 称为菌株特异性, 如糖代谢、蛋白质水解、尿素酶活力及对噬菌体的抵抗力等<sup>[2]</sup>。菌株分型可将具有不同发酵特性或进化特性的菌株进行分类和鉴定, 有利于深入研究菌株性能和应用。

对嗜热链球菌的菌株进行基因型分型曾有很多研究<sup>[3]</sup>, 早期研究主要有随机扩增多态性 PCR (RAPD-PCR)<sup>[2, 4]</sup>和扩增片段长度多态性 (AFLP)<sup>[5]</sup>, 以及脉

冲场凝胶电泳技术 (PFGE)<sup>[6]</sup>等。这些方法只限于电泳条带的分析, 结果数据在不同实验室之间不能相互对比和分享。虽然全基因组序列有助于充分了解细菌遗传多样性, 但成本较高, 不适合大批量菌株分析。而多位点序列分型技术 (MLST) 则选取细菌约 6~8 个看家基因, 进行序列分析, 具有较高的可操作性和可靠性, 且分辨率较高, 可实现实验室之间的数据共享及比较<sup>[7]</sup>。Delorme C 等人利用 8 个等位基因的 MLST 技术, 将 27 株不同来源的嗜热链球菌分为 21 个基因型<sup>[8]</sup>, 于洁利用 MLST 技术, 对中国、俄罗斯、蒙古国和中国地区传统发酵乳中 221 株嗜热链球菌进行了多态性分析和遗传进化研究<sup>[9]</sup>, 但其中的菌株未包含本实验室菌株。

对嗜热链球菌来说, 产酸速率是评价其发酵性能的重要指标, 另外, 由于乳中的游离氨基酸和肽含量较少而酪蛋白含量较丰富, 因此蛋白水解力也是菌株更好地适应牛乳生长条件的重要性能之一。但是, 过快的产酸速率和蛋白水解力反而容易导致酸奶凝胶不稳定、乳清易析出等问题。所以, 评价嗜热链球菌发酵特性需要测定其在牛乳发酵过程中的产酸速率和蛋白水解力。

本文应用 MLST 技术, 测定本实验室保藏的 8 株嗜热链球菌的等位基因序列, 与全基因组序列已公布于 NCBI 的另外 6 株嗜热链球菌一起, 利用开放的 MLST 数据库(<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/strepto-thermophilus.html>), 进行基因分型, 并结合菌株特性分析其分类和进化关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

嗜热链球菌 s4、0#、09067、09078、09079、09086、09087、09088 为本实验室保藏。

参考菌株 CNRZ1066、LMG18311、LMD-9、MN-ZLW-002、ND03、JIM8232 为全基因组序列已公布的嗜热链球菌, 序列来自 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)。

### 1.2 试剂与仪器

#### 1.2.1 试剂

TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; TIANGEN 2×PCR MasterMix, 天根生化科技有限公司; 引物, 深圳华大基因科技有限公司; ddH<sub>2</sub>O、蒸馏水, 自制; M17 肉汤, 青岛高科园海博生物技术有限公司。

#### 1.2.2 主要仪器设备

SPX-150B 生化培养箱, 上海佳胜实验设备有限公司; CJ-20 超净工作台, 天津市泰斯特仪器有限公司; TGL-16C 离心机, 上海安亭科学仪器厂; 580BR 5360 型梯度 PCR 仪, 美国伯乐公司; DYY-10C 电泳仪, 北京六一仪器厂; UVP 凝胶成像系统, 美国 UVP 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌株培养

37 °C 条件下, 将嗜热链球菌在含 2% (m/V) 乳糖的 M17 肉汤中, 连续培养两代, 每代 24 h。

#### 1.3.2 基因组提取

根据 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明, 提取基因组。

#### 1.3.3 等位基因的扩增和测序

PCR 反应体系: 50 μL 反应体系, 包含 2.5 μL 的 DNA 模板, 2 μL 的正向引物, 2 μL 的反向引物, 25 μL 的 2×MasterMix, 18.5 μL 的 ddH<sub>2</sub>O。其中, 每个基因的正反向引物信息见表 1。

PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min, 30 个循环包括: 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min。最后 72 °C 再延伸 7 min。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中验证结果<sup>[7]</sup>, 随后送华大科技公司测定序列。

#### 1.3.4 基因序列比对与数据库搜索

8 株嗜热链球菌的基因序列测定后, 使用 MEGA 6 软件, 与标准序列进行比对, 获得与标准序列相同长度的待分析序列。另 6 株全基因组公布嗜热链球菌的等位基因由 NCBI 网站获得, 并与测定的 8 株菌共同分析。将 6 个等位基因测序结果与标准序列比对后, 提交至 MLST Pasteur 数据库(<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/>), 得到等位基因型和菌株序列型结果。

#### 1.3.5 数据处理同源性分析

将 14 菌株的 6 个等位基因连接起来, 使用 MEGA 6 软件通过 ClustalW 将 14 个序列比对后, 采用邻接法 (NJ) 方法构建系统发育树, 且自展值 (bootstrap value) 分析设置重复取样 1000 次。

#### 1.3.6 菌株产酸性能测定

配制 10% (m/V) 脱脂乳, 并用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 6.8, 于 110 °C 灭菌 10 min。按 2% (V/V) 比例接种脱脂乳, 42 °C 培养 12 h, 每隔 2 h 测定 pH 值。pH 值测定采用 pH 计直接测定。滴定酸度采用 GB 5413.34-2010。

表 1 嗜热链球菌 MLST 扩增引物

Table 1 MLST primers for *Streptococcus thermophilus*

序号	基因	所编码蛋白质	引物序列 (5'---3')
1	ddlA	D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶	F: TCAAGTGTGGCTATGGA R: GTAGATGGCTCCATCCTC
2	glcK	葡萄糖激酶	F: TGGGCAGAAACTCAAGA R: AACACCACCACCGATAAC
3	proA	γ-谷氨酰磷酸还原酶	F: CCCGTCTCATCCAAACTGTG R: TGGTTGAAGTTAGGGCCTCA
4	ptsI	磷酸烯醇丙酮酸-蛋白磷酸转移酶	F: ACGTACTAGTCACTCTGCAA R: CACGAAGCAAGGCACGTAAT
5	serB	磷酸丝氨酸磷酸酶	F: GGTCCAAGAAGAAGTAATTGA R: GACCTTATACAAATCTGGTT
6	tkt	转酮醇酶	F: GCAGCACACCAATGGGTTACAC R: GGAGCACCATGACCAATG

### 1.3.7 菌株蛋白质水解活力测定

菌株在 M17 肉汤中活化后, 10000 r/min 离心 2 min, 并使用磷酸盐缓冲液冲洗悬浮, 再以 1% (V/V) 比例接种入 10% (m/V) 脱脂乳中, 37 °C 培养 6 h 后, 使用 OPA 方法测定蛋白质水解活力<sup>[10]</sup>。

### 1.3.8 数据分析

使用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 16.0 对数据进行统计分析和绘图。所有操作平行进行 3 次, 取平均值表示。差异显著性采用单因素方差分析, 即  $p < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因扩增结果

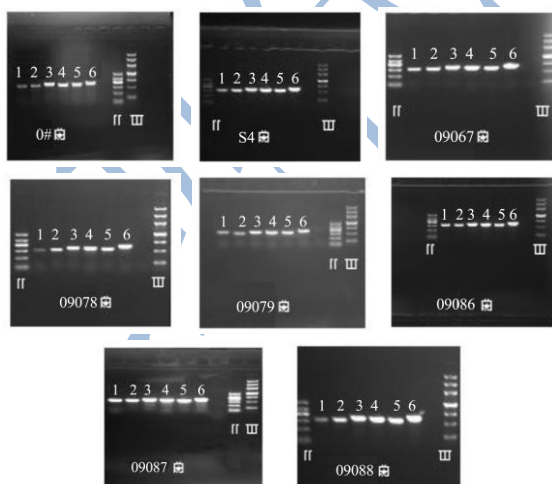


图 1 各菌株的 MLST 基因 PCR 电泳条带图

Fig.1 PCR electrophoresis bands of the MLST genes of *Streptococcus thermophilus* strains

注: 每个菌株共 6 个条带, 从左到右依次为 1 (ddlA),

2(glcK)、3(proA)、4(ptsI)、5(serB)、6(tkt)和阴性对照; II 为 DNA 标准品 marker II, 每个条带的碱基数由上至下依次为 1200、900、700、500、300 和 100bp; III 为 DNA marker III, 每个条带的碱基数由上至下依次为 4500、3000、2000、1200、800、500 和 200 bp。

通过 MLST Pasteur 数据库得知, 6 个等位基因 (ddlA、glcK、proA、ptsI、serB 和 tkt) 的长度分别为 530 bp、539 bp、599 bp、589 bp、570 bp 和 660 bp。经过基因扩增, 8 个菌株的 6 个等位基因都能成功扩增, 见图 1 所示, 其序列长度在 500~700 bp 之间, 与文献报道相符<sup>[8]</sup>。不同菌株的各等位基因电泳条带都在同一位置, 基因差别在于其序列中的某几个碱基的不同, 测定基因序列后可比对分析这些差别, 由于等位基因的长度较小, 因此方便进一步进行序列测定, 序列结果可用于网络共享, 从而避免了不同实验室或不同操作而引起的电泳条带的误差。

### 2.2 等位基因序列比对和分型结果

将菌株的 6 个等位基因序列提交到数据库中后, 如果所提交序列与数据库中收藏序列相同, 则提交序列获得该收藏序列的等位基因号, 如果提交序列与数据库中序列无匹配, 则该提交序列属于新型等位基因。每个菌株的 6 个等位基因的基因号的组合, 构成了该菌株的基因型, 见表 2 所示等位基因分型。

6 个等位基因的不同序列可以组合出大量的基因型, 其中 MLST Pasteur 数据库关于嗜热链球菌的基因型有 116 个, 此外, 仍有许多新的基因型未被录入该数据库。

提交结果发现, 8 株菌中 5 株菌分属于 MLST 中的 1、3、5 基因型。其中, 09067、09078 和 09079 同

属于基因型 1, 09086、09087 和 09088 的 6 个等位基因也都相同, 属于同一基因型, 但数据库中未有匹配型, 因此属于新基因型。

全基因组公布的 6 株菌, 其基因型则分属于 5 个

基因型, 其中 MN-ZLW-002 和 ND03 都是分离自中国西部地区的菌株, 属于同一基因型 3。而 CNRZ1066 和 LMD-9 由于具有数据库中不能匹配的一个基因 (glcK), 因此属于新基因型。

表 2 嗜热链球菌 6 个等位基因的 MLST 分型

Table 2 MLST genotyping of six allelic genes of *Streptococcus thermophilus* strains

菌株名称	来源	ddlA	glcK	proA	ptsI	serB	tkf	序列型
S4	发酵剂分离	2 <sup>a</sup>	5	1	4	4	1	5 <sup>b</sup>
0#	新疆酸奶	1	1	3	3	3	3	3
09067	内蒙古酸奶	1	1	2	3	3	7	1
09078	内蒙古酸奶	1	1	2	3	3	7	1
09079	内蒙古酸奶	1	1	2	3	3	7	1
09086	新疆酸奶	2	n-1	n-2	n-3	n-4	3	n
09087	新疆酸奶	2	n-1	n-2	n-3	n-4	3	n
09088	新疆酸奶	2	n-1	n-2	n-3	n-4	3	n
CNRZ1066	法国酸奶	2	n-5	1	4	4	1	n
LMG18311	英国酸奶	2	1	1	2	1	1	6
LMD-9	美国奶酪	1	n-6	3	5	3	7	n
MN-ZLW-002	甘肃酸奶	1	1	3	3	3	3	3
ND03	青海发酵乳	1	1	3	3	3	3	3
JIM8232	法国牛乳	1	1	4	3	3	7	2

注: a 为等位基因序列编号, b 为菌株基因型编号。

### 2.3 等位基因系统发育树

使用 MEGA 6 软件通过 ClustalW 进行序列比对, 并使用 NJ 方法构建系统发育树, 结果如图 2 所示, 其中, 分离自新疆酸奶的三株菌 09086、09087 和 09088 属于同一 MLST 基因型, 同时, 分离自内蒙古酸奶的菌株 09067、09078 和 09079 也属同一 MLST 基因型, 因此等位基因拼接序列相同, 系统发育树中具有同源性。另外, 菌株 09067、09078 和 09079 与分离自法国酸奶的 JIM8232 具有较高同源性。

与这两株同源性较高的是 0#菌株, 而 0#菌株是本实验室从新疆酸奶中分离所得。ND03、MN-ZLW-002 和 0#菌株属于同一基因型, 且都分离自中国西部地区, 因此, 这 3 株嗜热链球菌可能具有区域进化关联性。

与菌株 s4 进化关系较近的是 CNRZ1066, 两者 6 个等位基因中, 仅 glcK 不同。前者是本实验室从法国罗地亚特生产的商业酸奶发酵剂中分离, 而 CNRZ1066 则最早分离自法国酸奶。

### 2.4 菌株产酸性能

由图 3 中 pH 变化曲线可知, 8 株嗜热链球菌在脱脂乳中产酸趋势在 12 h 时基本稳定, 其中, 菌株 09067、09078 和 09079 产酸力较强, 发酵 4 小时便达到 pH 4.9~4.7 之间, 此后产酸开始趋于平稳, 至 12 h 时达到 4.3~4.2 之间; 而其他 5 株菌产酸力相对较弱, 发酵至 8h 时开始趋于平稳, pH 值在 5.3~4.9 之间, 至 12 h 时, pH 值达到 5.0~4.7。图 4 中菌株的滴定酸度与图 3 中 pH 曲线是一致的, 其中菌株 09067、09078 和 09079 产酸力远大于其它菌株, 发酵 4 h 时, 该三株菌的滴定酸度已达到 64~72 °T 之间, 而其它菌株仅在 19~33 °T 之间; 发酵 12 h 时, 三株菌滴定酸度达到 93~97 °T 之间, 而其它菌株在 61~66 °T 之间。由于菌株 09067、09078 和 09079 具有过强的产酸力, 其

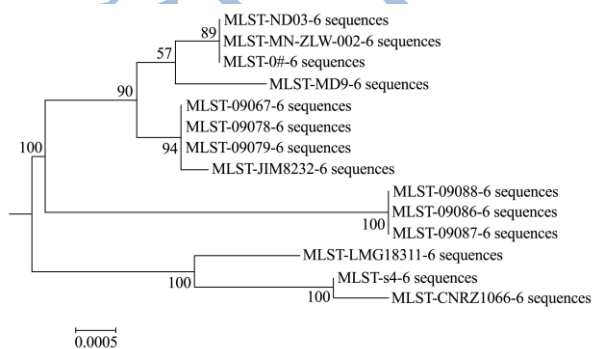


图 2 菌株等位基因系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of *Streptococcus thermophilus* allelic genes

菌株 ND03 与菌株 MN-ZLW-002 都来自中国, 其中 ND03 分离自青海<sup>[11]</sup>, MN-ZLW-002 分离自甘肃<sup>[12]</sup>。

可用于快速发酵的产品生产中如奶酪，如用于酸奶生产会导致酸奶乳清析出、后酸化等不良现象。

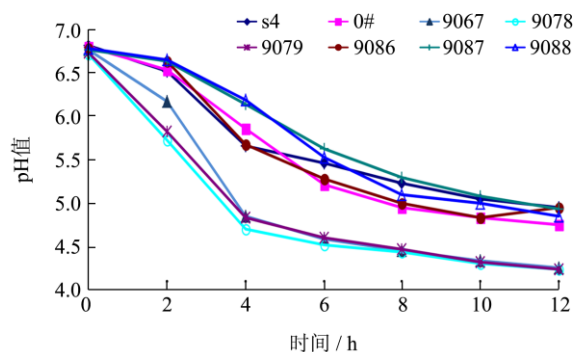


图3 不同菌株的pH变化曲线

Fig.3 pH curves of various *Streptococcus thermophilus* strains

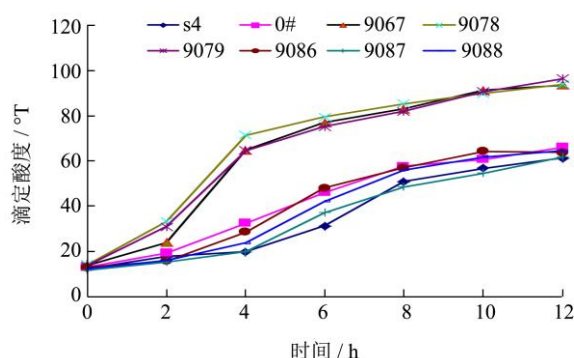


图4 不同菌株的滴定酸度变化曲线

Fig.4 Titratable acidity curves of various *Streptococcus thermophilus* strains

嗜热链球菌广泛应用于酸奶和奶酪生产中，具有产酸迅速的特点，尤其是与保加利亚乳杆菌联合使用时，双菌的产酸力和发酵速度大大超越了球菌杆菌单独发酵时性能。嗜热链球菌的产酸力因菌株不同而不同，其产酸过程主要为通过乳糖渗透酶（LacS）和β-半乳糖苷酶（LacZ）来转运和分解乳糖，进而产生乳酸<sup>[13]</sup>。嗜热链球菌能够快速代谢乳糖产生乳酸，是其长期生存于乳中，而对乳环境中以乳糖为碳源的一种进化和适应<sup>[1]</sup>。8株嗜热链球菌中，产酸力最强的3株菌（09067、09078和09079），其MLST基因型也一致，都为1型，说明这3株嗜热链球菌具有相同的起源，且进化过程中都保留了较强产酸力的特性。

### 2.5 菌株蛋白水解性能

由图5可知，8株嗜热链球菌中菌株09067蛋白质水解活力最强，与菌株s4、0#和09078具有显著性差异（ $p < 0.05$ ），而该菌株产酸力也是最强的3株菌之一。菌株09088仅次于菌株09067，而活力最小的菌株为s4。

嗜热链球菌中部分菌株具有较强的蛋白质水解

力，而该特性主要是由于菌株具有一种结合在细胞壁上的胞外蛋白酶，称为PrtS<sup>[8,14]</sup>，在嗜热链球菌的单菌培养过程中，PrtS对其在乳中的快速生长和产酸能起到重要作用<sup>[15]</sup>。从MLST基因分型和菌株产酸特性方面来看，菌株09067不仅具有较强产酸力，且同样具有较强的蛋白质水解作用，然而与其同属一个MLST基因型的其它2菌株（09078和09079），其蛋白质水解作用与其它6菌株相比却不具有显著差异，说明嗜热链球菌蛋白质水解力与基因分型不一致。这是由于嗜热链球菌PrtS基因可能是在乳品工业应用中通过水平基因转移获得的<sup>[7]</sup>，而MLST基因是较保守的管家基因，从而导致菌株特性和基因型有时不一致。

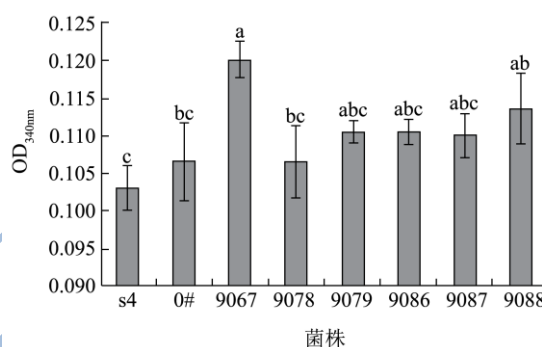


图5 不同菌株的蛋白质水解力

Fig.5 Protein hydrolysis capabilities of various *Streptococcus thermophilus* strains

注：显著性水平  $p$  为 0.05，各组字母不同表示差异性显著  $p < 0.05$ 。

### 3 结论

3.1 多位点序列分型可有效对嗜热链球菌进行基因分型，8株实验室嗜热链球菌分为4个MLST基因型，其中3株菌属于新基因型。6株全基因组公布菌株分属于5个MLST基因型，其中有2株菌株属于新基因型。

3.2 部分菌株菌株的同源性与分离地域具有一定关系。

3.3 8株嗜热链球菌产酸特性因菌株不同而不同，其中3株菌产酸迅速，产酸力强。部分菌株的蛋白质水解能力差异显著，其中蛋白水解最强的菌株同样具有较强的产酸力。

3.4 菌株表型特性与基因型基本一致。

### 参考文献

[1] Hols P, Hancy F, Fontaine L, et al. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics [J]. FEMS

- Microbiology Reviews, 2005, 29(3): 435-463
- [2] Mora D, Fortina MG, Parini C, et al. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products [J]. J. Appl. Microbiol., 2002, 93(2): 278-287
- [3] El-Sharoud WM, Delorme C, Darwish MS, et al. Genotyping of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional Egyptian dairy products by sequence analysis of the phosphoserine phosphatase (serB) gene with phenotypic characterizations of the strains [J]. J. Appl. Microbiol., 2011, 112(2): 329-337
- [4] Andrighetto C, Borney F, Barmaz A, et al. Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheeses [J]. International Dairy Journal, 2002, 12(2): 141-144
- [5] Lazzi C, Bove CG, Sgarbi E, et al. Application of AFLP fingerprint analysis for studying the biodiversity of *Streptococcus thermophilus* [J]. J. Microbiol. Methods, 2009, 79(1): 48-54
- [6] Erkus O, Okuklu B, Yenidunya AF, et al. High genetic and phenotypic variability of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from artisanal Yuruk yoghurts [J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 58(2): 348-354
- [7] 王中强,邱少富,王勇,等.多位点序列分型技术及其研究进展[J].军事医学科学院院刊,2010,34(1):76-79  
WANG Zhong-qiang, QIU Shao-fu, WANG Yong, et al. Progress in Research on Multilocus Sequence Typing Technique [J]. Bull. Acad. Mil. Med. Sci., 2010, 34(1): 76-79
- [8] Delorme C, Bartholini C, Bolotine A, et al. Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2010, 76(2): 451-460
- [9] 于洁.中国、俄罗斯和蒙古国地区传统发酵乳制品中嗜热链球菌的多位点序列分型研究[D].内蒙古农业大学,2013  
YU Jie. Multilocus Sequence Typing of *Streptococcus thermophilus* from Traditional Fermented Dairy Products in China, Russia and Mongolia [D]. Inner Mongolia Agricultural University, 2013
- [10] Shihata A, Shah NP. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria [J]. International Dairy Journal, 2000, 10(5-6): 401-408
- [11] Sun Z, Chen X, Wang J, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03 [J]. J. Bacteriol., 2011, 193(3): 793-794
- [12] Kang X, Ling N, Sun G, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain MN-ZLW-002[J]. J. Bacteriol., 2012, 194(16): 4428-4429
- [13] Derzelle S, Bolotin A, Mistou MY, et al. Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71(12): 8597-8605
- [14] Fernandez-Espla MD, Garault P, Monnet V, et al. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66(11): 4772-4778
- [15] Courtin P, Monnet V, Rul F. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk [J]. Microbiology, 2002, 148(Pt 11):3413-3421w