一株用于青贮饲料制备的植物乳杆菌基因组特征及发酵功能分析

郝怡欣[1]，陈　萍[1]，张耀星[1]，赵煜炜[2]，聂言顺[3]，何文兴[1]，王文波[1*]

（1. 济南大学 生物科学与技术学院，山东 济南　250022；2. 烟台龙大养殖有限公司，山东 烟台　265200；
3. 丰唐生态农业技术研发（山东）有限公司，山东 泰安　271400）

摘　要　为解析优势乳酸菌（Lactic acid bacteria，LAB）对构叶青贮饲料品质的影响及与青贮发酵功能相关的基因组特征，从构叶青贮饲料中分离得到植物乳杆菌（*Lactiplantibacillus plantarum*）ZR、乳酸片球菌（*Pediococcus acidilactici*）RP、融合魏斯氏菌（*Weissella cibaria*）RW 和副干酪乳杆菌（*Lacticaseibacillus paracasei*）R8 四株优势菌株，作为菌种添加剂进行为期 50 d 的青贮发酵实验。结果发现 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 在构叶青贮饲料中干物质含量保持以及木质纤维素降解酶活性方面均优于其他菌株；酸性洗涤纤维（ADF）、中性洗涤纤维（NDF）和氨态氮等有害物质含量较其他处理组有不同程度降低。全基因组测序分析结果表明，*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 基因组全长 3 398 411 bp，包含 1 条染色体和 6 个质粒，GC 含量为 44.38%。CAZymes 注释结果表明，*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 基因组包含 534 个 CAZyme 基因和 30 个乳酸合成相关基因。比较基因组分析发现，*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 基因组局部位置中存在插入、缺失和倒位等现象，涉及 *scrR*、*bglA*、*malL*、*galE*、*agrA*、*oppA*、*opuA* 等基因。本研究结果表明，*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 具有较强的青贮发酵功能，揭示了 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 的基因组特征，为该菌株的工业应用提供参考。

关键词　乳酸菌；全基因组测序；构树青贮；乳酸合成途径；比较基因组

中图分类号　Q939.97　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1005－7021（2026）04－0028－14

doi：10.3969/j.issn.1005－7021.2026.04.003

Genomic Characteristics and Fermentation Function Analysis on a Strain of *Lactobacillus plantarum* Employed in Silage Preparation

HAO Yi-xin[1], CHEN Ping[1], ZHANG Yao-xing[1], ZHAO Yu-wei[2],
NIE Yan-shun[3], HE Wen-xing[1], WANG Wen-bo[1*]

（1. *School of Biological Science and Technology, University of Jinan, Jinan* 250022; 2. *Yantai Longda Breeding Co., Yantai* 265200;
3. *Fengtang ecological agriculture technology research and development (Shandong) Co., Taian* 271400）

Abstract　This study aims to investigate the effect ofdominant lactic acid bacteria（LAB）on the quality of silage feed and its genomic characteristics related to lignocellulose degradation and lactic acid metabolism. Four dominant strains of *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Pediococcus acidilacticiwere* isolated from silage feed and then used as microbial additives for a 50-day silage fermentation. The results showed that *Lactiplantibacillus plantarum* ZR exhibited superior performance compared to other lactic acid bacteria, with better retention of dry matter content and higher cellulase activity. Additionally, harmful substances such as ADF, NDF, and ammonia nitrogen were significantly reduced compared to other treatment groups. The genomic analysis revealed that *Lactiplantibacillus plantarum* ZR is 3 398 411 bp in length, consisting of 1 chromosome and 6 plasmids, with a GC content

基金项目：山东省重点研发计划项目（2023TZXD038）

作者简介：郝怡欣　女，硕士研究生。研究方向为微生物学。E-mail：hyx980730@163.com

* 通讯作者。男，副教授，博士，硕士生导师。研究方向为微生物生态学。E-mail：bio_wangwb@ujn.edu.cn

收稿日期：2025-12-02

of 44.38%. CAZyme analysis indicated that the genome of *Lactiplantibacillus plantarum* ZR contains 534 CAZyme genes, and 30 genes related to lactic acid synthesis. Comparative genomic analysis revealed the presence of insertions, deletions, and inversions in the genome of *Lactiplantibacillus plantarum* ZR, involving genes such as *scrR*, *bglA*, *malL*, *galE*, *agrA*, *oppA*, *opuA* and others. In conclusion, this study elucidates that *Lactiplantibacillus plantarum* ZR exhibiting robust silage fermentation capabilities. Additionally, it reveals the genomic characteristics of the strain *Lactiplantibacillus plantarum* ZR. These findings provide a theoretical basis for the application of this strain at an industrial level.

Keywords lactic acid bacteria; genome-wide sequencing; *Broussonetia papyrifera* silage; lactic acid biosynthesis pathway; comparative genomics

近年来,集约化畜牧业在我国迅速发展,玉米、大豆等传统饲料原料供应缺口较大,开发新型本地非常规饲料是缓解“人畜争粮”问题,促进畜牧业可持续发展的重要手段[1]。构树(*Broussonetia papyrfera* L.)具有生长速度快、适应性强、营养价值高等特点[2],广泛种植于我国多数地区。杂交构树是由中国科学院培育的新品种,其生长速度更快、抗逆性更强,可多轮刈割,且叶和嫩枝的蛋白质含量更高,可用作高蛋白质饲料[3]。但构叶存在含水量高、水溶性碳水化合物(WSC)含量低的缺点[4],单独青贮容易导致梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)大量繁殖,难以获得高质量青贮饲料。济南大学何文兴教授课题组(本实验室)前期研究发现,在构叶青贮时添加麦麸,可显著改善微生物群落结构和种间关系,降低木质纤维素含量,提高青贮饲料等级[5]。通常高质量青贮饲料的 pH 值低于 4.2,乳酸在有机酸中占比越高,饲料质量越好;氨态氮与粗蛋白比值越小,饲料品质越高,优质饲料比例通常在 10% 以下。乳酸菌在青贮饲料的制备过程中起着关键作用,其能快速产生乳酸,抑制腐败菌繁殖,还可降低氨态氮含量,直接影响青贮饲料发酵品质[6]。研究发现,青贮过程中的优势菌群主要有乳酸杆菌属(*Lacticaseibacillus*)[7]、魏斯氏菌属(*Weisseria*)和片球菌属(*Pediococcus*)[8]。长期以来,国内外有关青贮饲料乳酸发酵的研究主要围绕微生物群落结构、青贮饲料添加剂开发以及青贮饲料发酵品质和化学特性评价等方面[9-11],然而,由于乳酸菌的多样性,研究优质青贮发酵菌株的基因组特征、乳酸代谢途径和发酵功能基因类型具有重要意义。前期研究发现,当构叶与麦麸混合发酵比例为 65∶35 时,发酵效果最好[5]。基于此,本研究设置两种构叶与麦麸混合比例:BP100%(构叶 100%、麦麸 0%)和 BP65%(构叶 65%、麦麸 35%)(BP 表示构叶与麦麸的混合配比处理),并分别添加筛选到的乳酸菌进行为期 50 d 的青贮发酵实验,分析其对 BP100% 和 BP65% 青贮饲料的发酵品质、发酵酶活性以及乳酸菌数量动态变化的影响。同时,对一株具有较强青贮发酵功能的菌株进行全基因组测序分析,以期解析该菌株的基因组特征、潜在的乳酸代谢和木质纤维素降解途径,探究其作为青贮微生态制剂的应用潜力,为进一步改善青贮饲料品质,提高青贮发酵效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *实验原料* 供试原材料:本研究所用新鲜构叶采自山东省泰安市某构树种植基地(35.82°N、116.85°E),所选构叶均来自植株高度 80 ~ 120 cm 的杂交构树,其含水量 78% ~ 82%,粗蛋白含量 25% ~ 32%,粗纤维含量 8% ~ 12%。麦麸为市场所购,其含水量通常为 10% ~ 15%,蛋白质含量 14% ~ 18%。供试菌株:本研究所用菌株由本实验室从自制的构叶青贮饲料中分离。

1.1.2 *培养基* MRS 培养基(海博生物技术有限公司)。

1.1.3 *主要试剂与仪器设备* 纳他霉素、盐酸万古霉素(北京酷莱博科技有限公司);水杨苷、3,5-二硝基水杨酸、微晶纤维素、羧甲基纤维素钠等均为国产分析纯级试剂。低温高速离心机(Velocity 18R Pro, Dynamica);高温高压灭菌器(LDZM-40KCY,上海仪天科学仪器有限公司);超微量分光光度计(UV-5100,北京凯奥科技发展有限公司);恒温振荡器(TS-200B,上海精其仪器有限公司);凯氏定氮仪(K9860,海能技术);纤维素测

定仪(F800,海能技术)。

1.2 方法

1.2.1 *青贮饲料制备方法* ①筛选乳酸菌用青贮饲料的制备:将采集的新鲜构叶粉碎后带回实验室,按每袋 30 g 分装于真空袋中,37 ℃恒温培养箱中厌氧发酵 30 d,用于筛选乳酸菌。②不同配比青贮饲料的制备:将筛选到的乳酸菌经摇瓶培养至菌体浓度为 10^8 CFU/mL 时,以 10:1(新鲜饲料10 g:菌液 1 mL)的比例离心去除培养基,再用 1 mL 无菌水重悬菌体沉淀,分别添加至 BP100%(构叶 100%、麦麸 0%,质量分数,下同)和 BP65%(构叶 65%,麦麸 35%)的饲料中,对照组(CK 组)为按照上述比例添加等量的无菌水,密闭抽真空,37 ℃恒温厌氧发酵 50 d。

1.2.2 *青贮饲料乳酸菌的分离筛选、鉴定及发酵菌株的选择* 分别取 1.2.1①中发酵第 5 天、第 15 天和第 30 天的构叶青贮饲料样品各 1 g,加入至含有 9 mL 无菌水的离心管中,35 ℃、150 r/min 培养 15 min,静置后取上清液作为 10^{-1} 稀释液。梯度稀释后,分别取 10^{-5}、10^{-6} 和 10^{-7} 稀释液各 200 μL 均匀涂布于含 0.2 g/L 的万古霉素和 0.1 g/L 的纳他霉素的 MRS 固体培养基,37 ℃倒置培养 24 ~ 48 h,观察菌株生长情况,挑取形态不同的单菌落进行多次分离纯化,直至得到单一菌株。并将分离纯化后的菌株送至擎科生物科技有限公司(青岛分公司)进行 16S rRNA 测序。

1.2.3 *青贮乳酸菌的发酵功能检测* 将待选乳酸菌分别添加至 BP100% 和 BP65% 中,28 ℃厌氧发酵,在发酵的第 30 天取样,分析青贮发酵饲料的化学成分及木质纤维素降解酶活性,分别在发酵第 5、15、30、50 天取样,检测乳酸菌数量动态变化。①发酵品质分析及其酶活测定:取 1 g 青贮饲料样品,加入含有 9 mL 无菌水的离心管中,37 ℃、140 r/min 恒温振荡 40 min,再通过 16 层纱布过滤收集滤液。采用 pH 计测定 pH 值,对羟基联苯比色法测定乳酸含量[12],氨态氮(NH_3-N)含量采用苯酚-次氯酸钠比色法测定[13],DNS 比色皿法测定 β-葡萄糖苷酶活、内切葡聚糖酶活和外切葡聚糖酶活[14]。另外,干物质含量采用 105 ℃烘干法测定,粗蛋白含量使用 K9860 全自动凯氏定氮仪测定,中性洗涤纤维(Neutral Detergent Fiber, NDF)和酸性洗涤纤维(Acid Detergent Fiber, ADF)含量使用 F800 纤维素测定仪测定。②青贮过程中乳酸菌数动态变化分析:基于上述筛选结果,选取 4 株具有较好青贮发酵潜力的乳酸菌 *Lacticaseibacillus paracasei* R8、*Lactiplantibacillus plantarum* ZR、*Weissella cibaria* RW、*Pediococcus acidilactici* RP,对其在青贮过程中的数量动态变化进行测定。特异性引物序列如表 1 所示,PCR 反应和程序如表 2 所示,PCR 反应体系:2 × Taqmix 15.0 μL,Forward Primer 1.0 μL,Reverse Primer 1.0 μL,DNA template 1.0 μL,ddH_2O 12.0 μL。PCR 产物采用薄型琼脂糖凝胶回收试剂盒进行胶回收,再采用 PMD18-T Vector Cloning Kit 和质粒小量抽提试剂盒进行克隆测序,最后进行定量 PCR。

表 1 四种乳酸菌的特异性引物序列

Table 1 Specific primer sequences of four lactic acid bacteria

乳酸菌	引物	引物序列(5′-3′)	序列长度/bp
R8	R8-F	GGAGAAGAATGGTCGGCAG	212
	R8-R	AAGTTTCCCAGTTTCCGATG	212
RP	RP-F	CTAATCTCTTAGGTTGGCAG	204
	RP-R	GATTACTAAGTGTTGGAGGG	204
ZR	ZR-F	TTTGAGTGAGTGGCGAACTG	179
	ZR-R	CCACCATCTAGCTAATACGC	179
RW	RW-F	ATCCGAACTGAGACGTACT	193
	RW-R	ATTACTAGTTGCCAGCATTC	193

表 2 PCR 反应程序

Table 2 PCR reaction program

温度/℃	时间	循环数/个
95	30 s	–
95	10 s	40
55 ~ 65	30 s*	40
72	30 s	40
95	5 min	–
16	1 min	–

注:* 表示梯度扩增,梯度退火温度设为 52、55、60 和 65 ℃;– 表示此步骤不需要循环

1.2.4 *全基因组分析* ①全基因组测序及组装:*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 由上海美吉生物科技有限公司提供原始测序服务,主要包括 DNA 的提取与测序、数据质控与拼接组装,以及通过Illumina 对组装结果进行优化与校对。②基因组注释:编码序列(CDS)预测使用 Glimmer[15]、GenMarkS[16]、Prodiga[17]软件,通过比对直系同源

簇数据库(Clusters of Orthologous Groups of proteins,COG,https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/)、基因本体数据库(Gene Ontology,GO)、京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)对预测到的 CDS 进行基因功能预测。③代谢系统分析:利用 Diamond 软件比对碳水化合物活性酶数据库(Carbohydrate-Active enZYmes Database,CAZy),对基因序列进行注释。④致病系统分析:致病系统分析主要包括毒力基因预测与耐药基因预测。毒力基因预测主要通过比对毒力因子数据库(Virulence Factor Database,VFDB),获得毒力因子基因注释概况并进行统计。耐药基因预测主要通过比对综合抗生素抗性数据库(Comprehensive Antibiotic Resistance Database,CARD)注释,获得每个基因组中包含的耐药基因信息。⑤乳酸代谢相关基因分析:查找文献中乳酸代谢相关基因,借助 OrthoMCL 开展同源基因识别与分析,明确基因家族归属,并统计每个样本中各特定家族所包含的基因数及其详细信息。结合 KEGG 注释,对目标代谢通路中的各个功能节点进行基因数量统计并呈现。⑥比较基因组分析:通过 GenBank 数据库下载相关 *Lactiplantibacillus* 菌株的全基因组序列。利用 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 与乳杆菌属代表性菌株进行平均核苷酸一致性(average nucleotide identity,ANI)分析,该数据由美吉生物在线云平台提供[18]。使用 TBtools(v 2.136)软件[19]进行与近缘菌株保守基因的共线性分析。

1.2.5 *数据统计分析* 使用 Office 2016 Excel 对原始数据进行初步整理与处理,随后采用 SPSS 25.0 进行双因素方差分析(Two-way ANOVA),两两比较采用 LSD 检验及 S-N-K 检验,$P<0.05$ 说明具有显著性差异。使用 Origin 64 绘制折线图。

2 结果与分析

2.1 青贮乳酸菌的鉴定及发酵菌株的选择

将菌株测序结果在 NCBI 数据库中进行序列同源性比对,发现筛选得到的乳酸菌属于乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)和融合魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)。此外,本实验室前期研究表明,在构树麸皮青贮饲料中添加副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)可有效提高乳酸含量,显著改善发酵品质[8]。因此,最终确定植物乳杆菌、副干酪乳杆菌、融合魏斯氏菌和乳酸片球菌这四种菌株进行后续研究,后续在文中表示为 *Lacticaseibacillus paracasei* R8、*Lactiplantibacillus plantarum* ZR、*Weissella cibaria* RW、*Pediococcus acidilactici* RP。

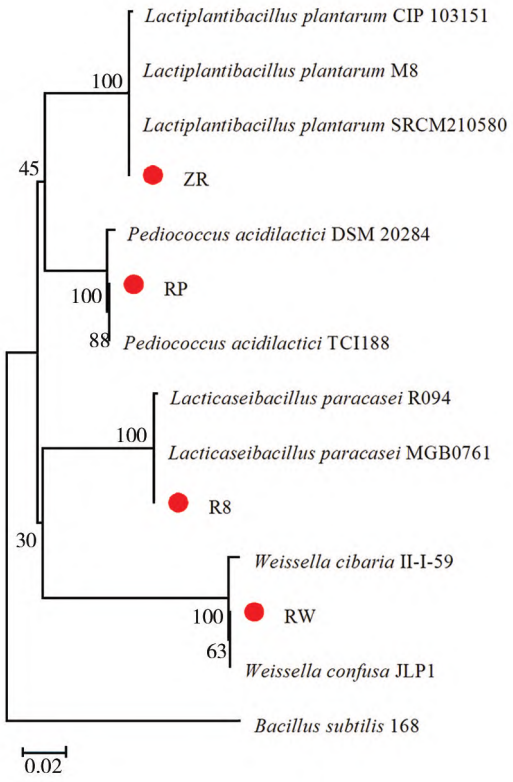


图 1 四种乳酸菌 16S rRNA 系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of four lactic acid bacteria 16S rRNA

2.2 青贮乳酸菌的发酵功能分析

2.2.1 *乳酸菌添加对青贮饲料中化学成分的影响* 干物质含量是青贮饲料制备完成后总营养物质的体现。由表 3 可知,BP65% 处理组干物质含量显著高于 BP100% 组($P<0.05$),且在 BP65% 条件下,ZR 处理组的干物质水平显著优于其他处理组。粗蛋白含量是评估青贮饲料品质的另一重要指标。ZR 处理组的粗蛋白含量显著高于 CK(不添加乳酸菌)($P<0.05$),表明该处理可有效抑制蛋白质分解,促进粗蛋白保存,从而提升发酵品质。这一现象可能归因于较低的 pH 环境及乳酸菌的丰度增加,抑制了其他微生物的生长,从而减少了对粗蛋白的分解[20]。

ADF 和 NDF 含量是衡量青贮饲料品质的重要指标,其水平过高会降低家畜的消化利用率[21]。BP100% 处理组结果显示,ZR 处理组的 ADF 和 NDF 含量显著低于其他处理组($P<0.05$),表明其具有更强的降解结构性碳水化合物的能力。氨态氮主要来源于梭菌等有害微生物对蛋白质的利用,数值越高,青贮饲料品质越差。各处理组的氨态氮含量均显著低于 CK 组($P<0.05$),其中 ZR 和 R8 处理组表现最优,氨态氮水平显著低于其他处理组($P<0.05$)。

表 3 乳酸菌对青贮饲料中化学成分的影响

Table 3 Effect of lactic acid bacteria on nutritional components of silage

菌株	比例/%	干物质/%	粗蛋白/(g·100 g^{-1})	ADF/%	NDF/%	NH_3-N/(g·L^{-1})
CK	BP65	38.91±0.35cA	13.67±0.76cB	0.85±0.03abA	37.21±0.74aA	38.02±0.69aA
	BP100	14.19±0.22cB	17.28±0.21cA	0.80±0.02aB	37.85±0.52aA	34.96±0.82aB
R8	BP65	41.83±0.88bA	15.78±0.64bB	0.76±0.02cA	25.93±0.50dA	31.79±1.56cA
	BP100	19.96±1.33aB	19.09±0.12bA	0.69±0.05bcB	26.74±0.55cdA	31.27±0.69cA
ZR	BP65	43.29±0.47aA	15.62±0.26bB	0.78±0.01cA	27.35±0.63dA	31.20±0.52cA
	BP100	20.14±0.63aB	18.63±0.23bA	0.60±0.03dB	23.94±0.12dB	31.91±1.27cA
RW	BP65	39.64±1.13bcA	19.21±0.11aB	0.89±0.01abA	33.89±0.48abA	34.42±1.65bA
	BP100	16.81±0.50bB	19.72±0.41aA	0.71±0.01bcB	32.81±0.53abA	33.43±0.82aA
RP	BP65	38.85±1.25bcA	19.10±0.77aA	0.80±0.02bA	30.59±0.52bcA	37.76±0.41aA
	BP100	16.35±0.52bB	20.13±0.48aA	0.65±0.02cB	29.26±0.97cA	32.19±0.59bB

注:小写字母表示同一比例不同菌种的统计学差异;大写字母表示同一菌种不同配比的统计学差异。表 4、表 5 同

2.2.2 *乳酸菌添加对青贮饲料产酸能力的影响* 在青贮发酵的初始阶段,丰富的可溶性碳水化合物为乳酸菌等优势微生物提供充足底物,促使其大量产生有机酸,进而使体系 pH 迅速下降。随着发酵的进行,可溶性碳源逐渐耗尽,发酵进入相对稳定期,pH 值趋于平稳。由表 4 可知,青贮饲料的 pH 值降至 4.1~4.3,处于青贮饲料理想 pH 范围内[22],其中 BP65% 处理组中的 pH 值显著低于 BP100% 处理组($P<0.05$)。此外,乳酸的积累在青贮发酵过程中起着关键作用,适宜浓度的乳酸不仅有助于降低 pH,还能有效抑制腐败菌生长,维持发酵体系的稳定性[23]。由表 4 可知,BP65% 处理组的乳酸含量显著高于 BP100% 处理组,其中 ZR 处理组乳酸水平也明显高于 CK 组($P<0.05$),表明外源添加 ZR 可增强有益菌的发酵优势,有效降低青贮发酵后期潜在的腐败变质风险。

2.2.3 *乳酸菌在发酵过程中对碳水化合物活性酶酶活力的影响* 微生物通过分泌纤维素酶将动物难以消化的纤维素、半纤维素和木质素降解为小分子碳水化合物,进而被动物利用,提高了青贮饲料的品质[24]。如表 5 所示,内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β-葡萄糖苷酶的酶活力均受不同菌种的添加的影响,BP65% 处理组的青贮样品中,各类纤维素降解相关酶活力均显著高于 BP100% 处理组。此外,在 BP65% 处理条件下,ZR 处理组的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶及 β-葡萄糖苷酶活力均高于其他菌株处理组。说明菌株 ZR 处理组具有较强的纤维素降解能力。

表 4 乳酸菌对饲料青贮过程中产酸能力的影响

Table 4 Effect of lactic acid bacteria on acid production activity in silage

菌株	比例/%	pH	乳酸/(μg·mL^{-1})
CK	BP65	4.25±0.04aB	20.02±0.68cA
	BP100	5.24±0.08bA	0.37±0.04aB
R8	BP65	4.13±0.05aB	27.53±3.02aA
	BP100	5.13±0.10bA	0.51±0.04aB
ZR	BP65	4.22±0.04aB	24.42±1.38bA
	BP100	5.23±0.06bA	0.43±0.02aB
RW	BP65	4.09±0.03aB	18.46±4.93cA
	BP100	5.15±0.12bA	0.46±0.06aB
RP	BP65	4.10±0.02aB	24.55±0.42bA
	BP100	5.17±0.09bA	2.69±0.62aB

表 5 乳酸菌对饲料青贮过程中碳水化合物活性酶酶活力的影响

Table 5 Effect of lactic acid bacteria on CAZyme enzyme activity in silage

菌株	比例/%	外切葡聚糖酶/(U·μg^{-1})	内切葡聚糖酶/(U·μg^{-1})	β-葡萄糖苷酶/(U·μg^{-1})
CK	BP65	73.77±1.40bcA	208.38±2.90bcA	282.86±30.06bA
	BP100	33.92±1.70cB	53.01±1.36dB	56.56±0.77aB
R8	BP65	79.84±5.40bA	222.99±14.20bA	280.30±30.41bA
	BP100	35.42±2.77bcB	56.76±0.75cB	60.74±0.72abB
ZR	BP65	88.10±6.91aA	268.49±15.80aA	355.28±37.82aA
	BP100	42.79±4.26aB	56.25±1.79cdB	58.81±0.35bB
RW	BP65	62.72±1.96cA	152.33±18.53dA	192.44±21.20cA
	BP100	36.23±4.34bcB	61.13±2.29bB	61.48±1.88aB
RP	BP65	79.45±9.50bA	188.51±6.02cdA	245.58±16.48bcA
	BP100	34.58±0.90bcB	60.42±2.22bB	61.05±2.15abB

2.2.4 青贮过程中 4 株乳酸菌数量动态变化分析 通过 RT-PCR 技术对青贮过程中 4 株乳酸菌的动态变化进行检测,结果如图 2 所示。乳酸菌数量整体呈典型的先升后降趋势。不同处理条件下,BP65% 组样品中的乳酸菌数量显著高于 BP100% 组($P<0.05$)。但添加菌株 RW 的青贮样品,其变化趋势与其他菌株不同,BP100% 处理组中 RW 的数量是 BP65% 组的 5.8 倍,呈现出明显的逆向差异。综上所述,在青贮饲料制备过程中,ZR 和 R8 处理组在营养成分保留、抑制有害物质生成、产酸能力以及木质纤维素降解能力等方面均显著优于 CK、RW 和 RP 处理组,在 BP65% 处理组中 ZR 和 R8 的乳酸菌数量也多于 CK、RW 和 RP。另外,ZR 组在干物质保持和纤维素降解方面优于 R8,但菌体数量低于 R8,说明菌株 ZR 在较低菌数的情况下仍能发挥较强的青贮能力,因此后续试验将对菌株 ZR 进行全基因测序分析。

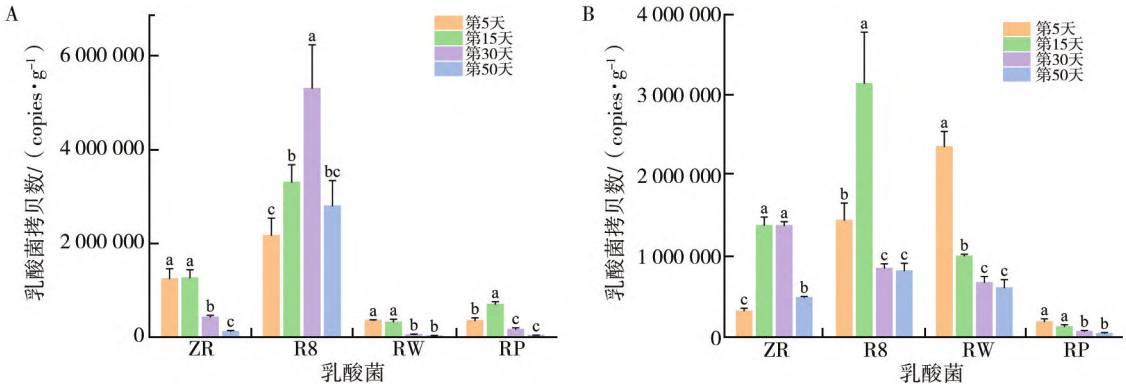


图 2 青贮过程中乳酸菌数动态变化

Fig. 2 Dynamic change of Lactobacillus number during silage

A:BP65%;B:BP100%;不同小写字母表示同一种乳酸菌在不同时间差异显著($P<0.05$)

A:BP65%;B:BP100%;Different lowercase letters indicate significant differences for the same *Lactobacillus* strain across different time($P<0.05$)

2.3 全基因组分析

2.3.1 基因组信息 菌株 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 的全基因组二代测序数据质控结果表明,该菌株具有较低的基因组杂合度和较少的重复序列,且未检测到样品或质粒污染,整体测序数据质量良好。通过 CGView 软件绘制菌株 ZR 基因组圈图,结果如图 3 所示,基因组总长度为 3 398 411 bp,由 1 条环状染色体和 6 个环状质粒组成。其中,染色体共注释到基因 3 198 个,平均长度为 893.73 bp,GC 含量为 44.38%;PlasmidA、PlasmidB、PlasmidC、PlasmidD、PlasmidE、PlasmidF 分别注释到 66、55、46、28、17、21 个基因。

2.3.2 基因组注释 在 COG 注释中,共有 2 523 个基因被注释,并被分配到 23 个不同的功能组

(图4A)。其中碳水化合物代谢、转录以及氨基酸转运代谢数量最多,分别占总功能的12.64%、11.06%和8.84%。由表6可知,参与转录最丰富的COG是DNA结合转录调节因子和转录调节因子,参与碳水化合物转运与代谢最丰富的是阿拉伯糖外排渗透酶和磷酸转移酶系统,参与核糖体结构和生物转化最丰富的是核糖体蛋白质。此外,在PlasmidA中共注释到12个与碳水化合物转运和代谢相关的基因,主要包括ABC型糖运输系统与MFS超家族。综上所述,菌株ZR基因组中与碳水化合物代谢和转运相关的基因占较大比例,表明其具备较强的多糖降解潜力。GO根据基因与已知序列的匹配程度分为三类,包括细胞成分(Cellular component)、分子功能(Molecular function)、生物过程(Biological process)。图4B为菌株ZR的GO功能注释分类,共注释了2 327个基因,其中分子功能的GO term和基因数量最多(1 905个),其次是生物过程(1 198个)和细胞成分(1 161个)。对*Lactiplantibacillus plantarum* ZR的CDSs进行KEGG途径分析以确定其代谢途径。如图4C所示,在6种KEGG通路的分类中,代谢类通路所包含的基因数量最多,共计2 296个;其次为遗传信息处理相关通路,包含204个基因。这些编码基因功能主要注释于碳水化合物代谢和氨基酸代谢,分别含有229和138个基因。因此,氨基酸代谢和碳水化合物代谢被认为是该菌株的主要功能,后续将进行与碳水化合物代谢相关基因的分析。PlasmidA注释到的基因主要与碳水化合物转运和代谢以及移动元素组成分相关;PlasmidB注释到的基因主要与DNA复制、重组和修复相关,仅1个基因与碳水化合物转运和代谢相关;PlasmidF仅注释到2个与碳水化合物转运和代谢相关的基因,且均与肽聚糖/木聚糖/几丁质去乙酰化酶合成相关。

表6 基因与COG的对应关系

Table 6 The correspondence of gene-COG

COG类型	COG功能	基因数量/个
碳水化合物转运与代谢	磷酸转移酶系统	66
	阿拉伯糖外排通透酶AraJ	35
转录	转录调节因子	27
	DNA结合型转录调节因子	135
核糖体结构与生物发生	核糖体蛋白	53

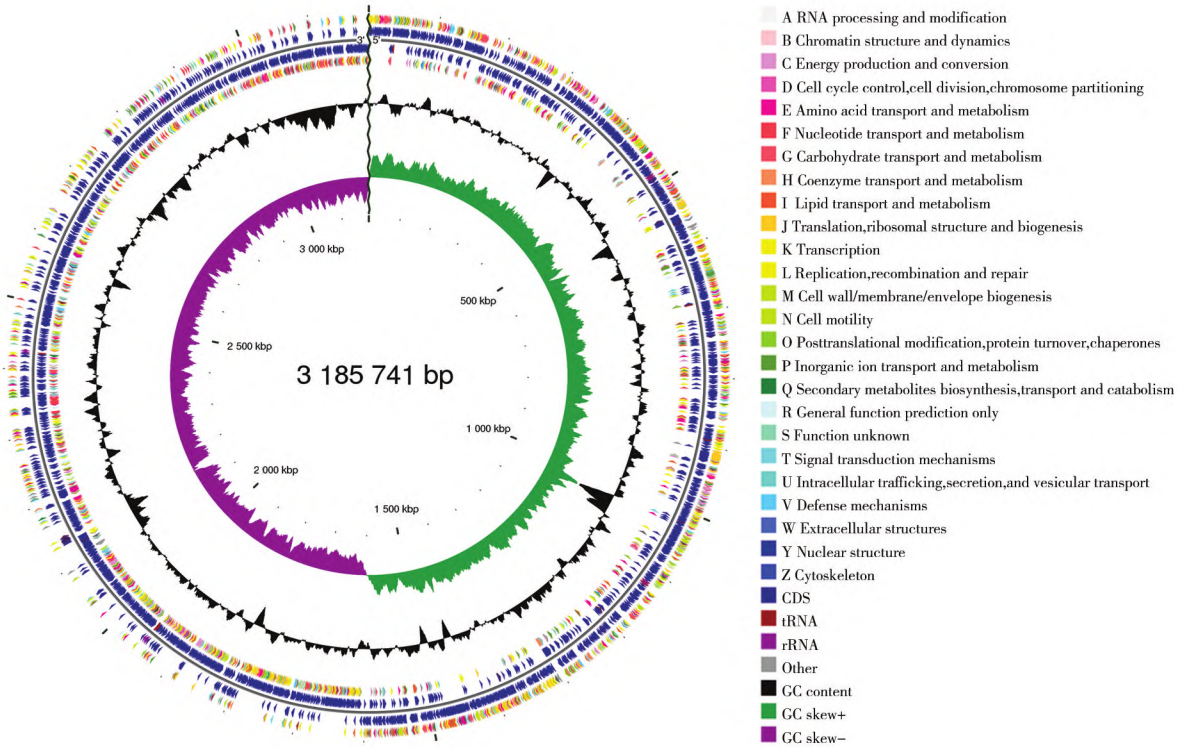


图3 菌株*Lactiplantibacillus plantarum* ZR的基因组圈图

Fig. 3 Circular map of *Lactiplantibacillus plantarum* ZR genome

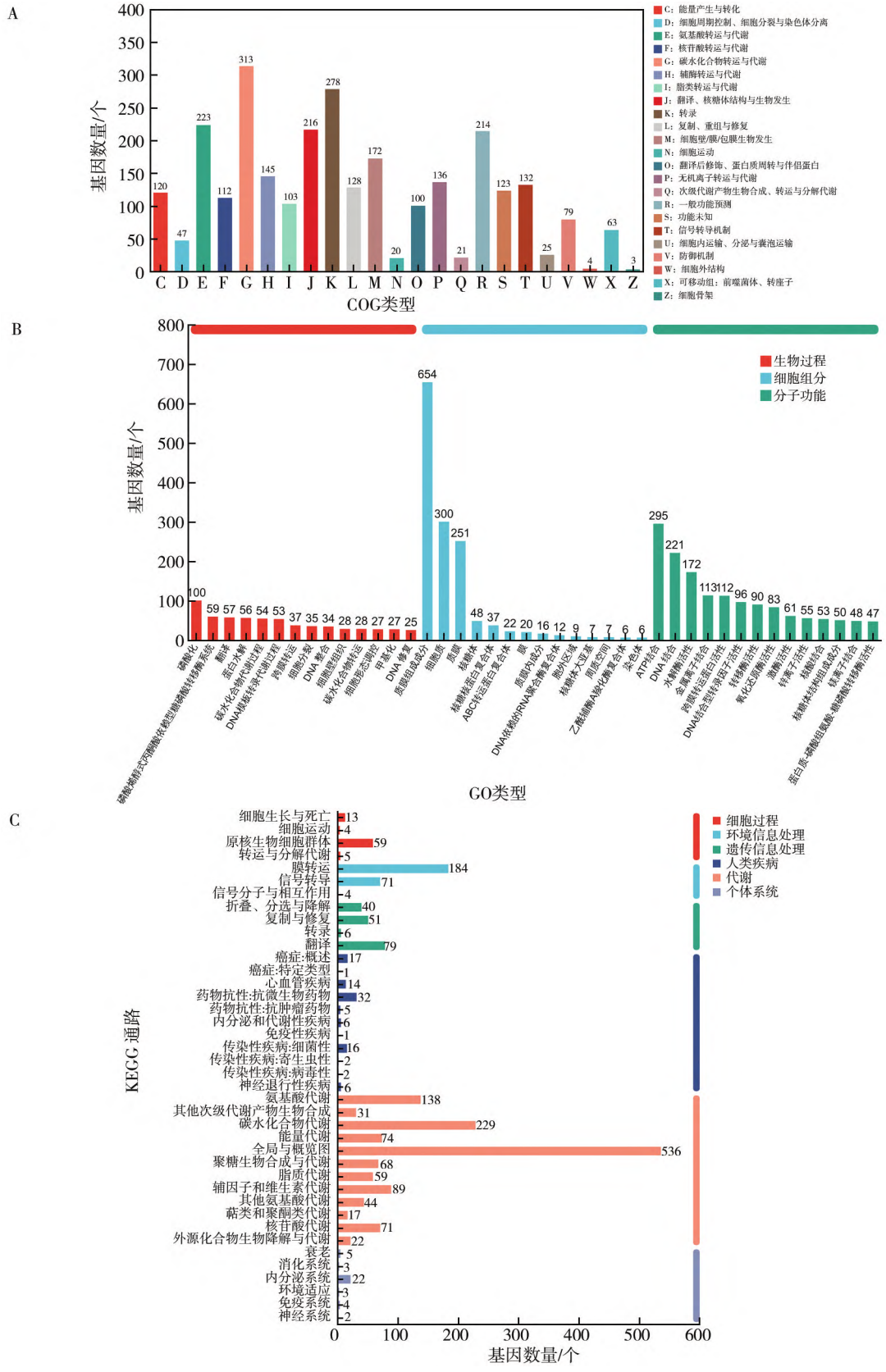


图 4　COG 注释(A)、GO 注释(B)及 KEGG 注释(C)结果

Fig. 4　The results of COG annotation (A), CO annotation (B) and KEGG annotation (C)

2.3.3 碳水化合物活性酶注释 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 基因组中共有 109 个基因编码碳水化合物活性酶，如图 5 所示，其中数量最多的是糖苷水解酶（Glycoside Hydrolases，GH）基因 50 个，其次是糖基转移酶（Glycosyl Transferases，GT）与碳水化合物酯酶（Carbohydrate Esterases，CE），分别为 32 个和 19 个。CAZyme 注释分析表明，该基因组中编码纤维素酶的基因主要来自 GH1 和 GH4 家族，分别包括 10 个和 2 个基因，这两个家族也分别与 6-phospho-b-半乳糖苷酶和 6-phospho-b-葡萄糖苷酶相互作用。编码半纤维素酶的基因主要来自 CE4 家族。CE1 家族酶属于糖酯酶类，能够非氧化性地去除木聚糖中的肉桂酰酯和乙酰酯，这些酯键分别破坏半纤维素和木质素以及半纤维素和纤维素之间的木素-碳水化合物复合结构。与木质素降解相关的酶主要集中在氧化还原酶（AA）中。GT 不直接参与纤维素或半纤维素的降解，但它们在木质素的生物合成和修饰中起着关键作用[25]，如 GT4、GT2 可通过形成糖苷键参与木质素的生物合成，改变纤维素和半纤维素的相互作用，进而影响木质纤维素结构和降解效率。因此，本研究检测到的发酵样品表现出的各种酶活力是群落内各成员协同作用的结果，其中以 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 贡献最为显著。由于所用构叶原料未经灭菌处理，发酵体系中不仅存在乳酸菌 ZR，还包含其他原生菌株，因此发酵样品所表现出的各种酶活力是群落内所有菌株的共同贡献。实验发现 BP65% 处理组的发酵中，ZR 处理组的纤维素酶（内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β-葡萄糖苷酶）酶活均高于其他处理组，充分表明 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 在纤维素降解中具有优势作用。CAZyme 注释分析结果显示，*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 基因组中共鉴定出 109 个 CAZyme 家族基因，其中与纤维素降解密切相关的 GH 基因数量最多为 50 个，此外还有 7 个木质素降解酶基因（表 7）。这些基因组学证据不仅支持了发酵样品中高水平酶活力主要来源于 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 的结论，也揭示了该菌株在木质纤维素降解中的巨大潜力。

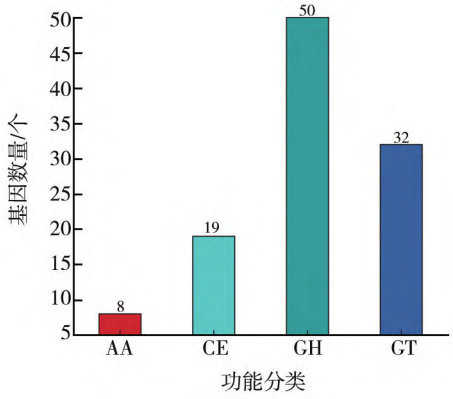


图 5 碳水化合物活性酶注释统计

Fig. 5 Results of CAZymes annotation

表 7 木质纤维素降解相关基因家族数量分类统计

Table 7 The number of lignocellulose degradation related gene families

类型	基因家族	基因数量/个
纤维素	GH1	10
	GH4	2
	GH32	1
	GH13	11
半纤维素	CE4	1
木质素	AA4	1
	AA10	1
	AA6	2
	AA3	3

2.3.4 致病系统分析 通过 VFDB 注释分析表明，*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 具有 289 个毒力基因，编码的产物主要与免疫调节和营养物质的代谢有关（图 6）。经 CARD 分析显示，*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 含有 207 个耐药基因，主要包括抗生素大环内酯（macrolide antibiotic）、四环素类抗生素（tetracycline antibiotic）等（图 7）。由于这些抗生素抗性基因均位于染色体 DNA，而质粒上不存在抗性基因，因此不易发生细菌种间抗生素抗性基因的转移。

2.3.5 乳酸代谢途径及相关基因分析 乳酸菌在厌氧环境下，首先通过糖酵解途径将底物转化为丙酮酸，随后在乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase，LDH）的催化作用下，丙酮酸接受由 NADH 携带的氢离子，最终还原生成乳酸。*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 参与糖酵解过程以及相关基因数量如图 8A 和表 8 所示，共 31 个基因含有糖酵解所必须的所有酶，可以充分保证丙酮酸的供给。在 D-乳酸合成途径中，*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 含有可催化丙酮酸直接还原生成 D-乳酸的乳酸脱氢酶基因 *IdhA*。在 L-乳酸合成

通路中，*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 还包含编码磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸的丙酮酸激酶基因 *pyk*，以及将丙酮酸进一步转化为 L-乳酸的 L-乳酸脱氢酶基因 *Idh*。此外，该菌株还含有编码丙酮酸氧化酶基因 *poxL*，该酶可在有氧环境中将丙酮酸氧化为 CO_2，有助于青贮过程中快速形成厌氧环境，抑制腐败微生物生长，促进乳酸发酵阶段的启动。图 8B 和表 9 展示了 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 在丙酮酸代谢通路中涉及的基因数量。

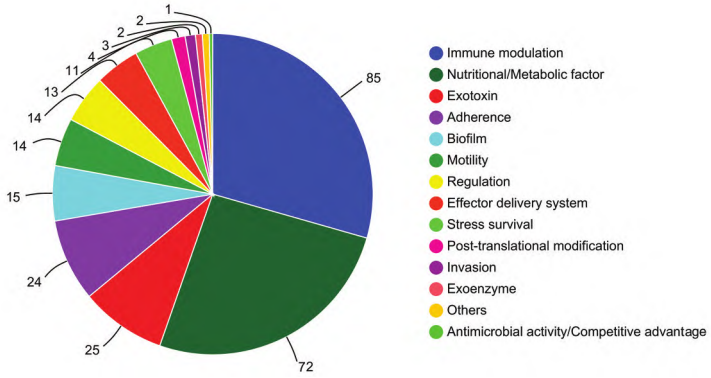


图 6　毒力基因预测分类统计

Fig. 6　Classification statistic chart of virulence gene prediction

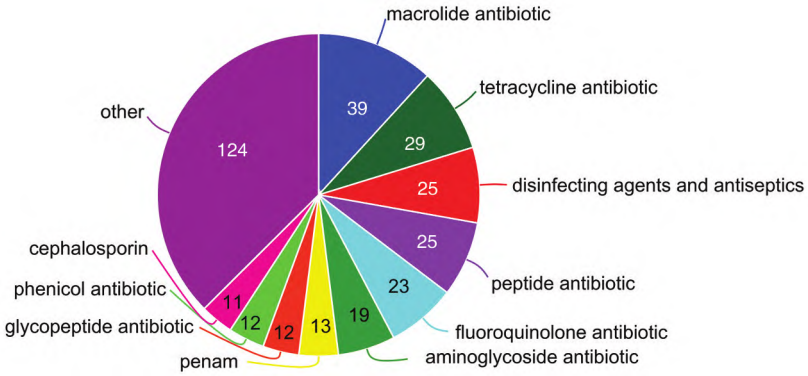


图 7　耐药基因预测分类统计

Fig. 7　Classification statistic chart of drug resistance gene prediction

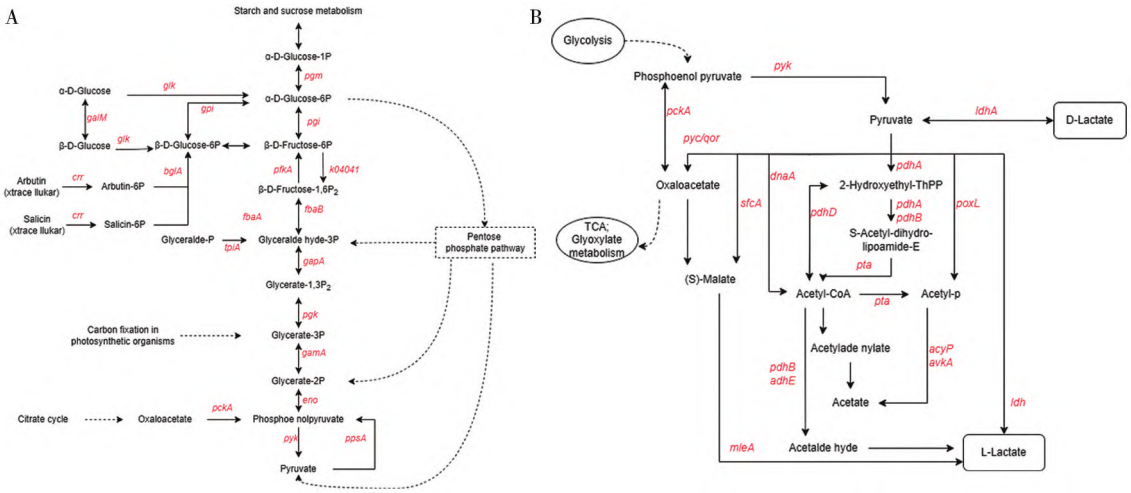


图 8　*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 参与的糖酵解途径（A）、丙酮酸代谢途径（B）

Fig. 8　*Lactiplantibacillus plantarum* ZR participated in TCA pathways (A) and pyruvate metabolic pathways (B)

表 8 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 参与糖酵解途径的基因

Table 8 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR participated in TCA pathways genes

基因	基因功能	基因数量/个
pgm	磷酸葡萄糖变位酶	1
pgi	葡萄糖-6-磷酸异构酶	1
glk	未注释	1
bglA	6-磷酸-β-葡萄糖苷酶	10
galM	醛糖-1-差向异构酶	3
fbaA	Ⅱ类果糖二磷酸醛缩酶	1
tpiA	丙糖磷酸异构酶	1
gapA	3-磷酸甘油醛脱氢酶	1
pgk	磷酸甘油酸激酶	1
gpmA	磷酸葡萄糖变位酶	2
eno	烯醇化酶	2
pyk	丙酮酸激酶	1
crr	磷酸转移酶系统糖特异性 IIA 组分	3
pfkA	6-磷酸果糖激酶 1	1
pckA	磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(ATP)	1
ppsA	丙酮酸-水二激酶	1

表 9 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 参与丙酮酸代谢途径的基因

Table 9 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR participated in pyruvate metabolic pathways genes

基因	基因功能	基因数量/个
pyk	丙酮酸激酶	1
IdhA	D-乳酸脱氢酶	2
poxL	丙酮酸氧化酶	5
pta	磷酸乙酰转移酶	1
ackA	乙酸激酶	3
Idh	L-乳酸脱氢酶	6
mLeA	未注释	1
acyp	酰基磷酸酶	1
adhE	乙醛/乙醇脱氢酶	2
pyc	丙酮酸羧化酶	1
sfcA	苹果酸脱氢酶(草酰乙酸脱羧型)	1
pckA	磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(ATP)	1
pdhA	丙酮酸脱氢酶 E1 组分 α 亚基	1
aceF	丙酮酸脱氢酶 E2 组分二氢硫辛酰基转乙酰酶	1
pdhB	丙酮酸脱氢酶 E1 组分 β 亚基	1
dnaA	甲酸 C-乙酰转移酶	1
pdhD	二氢硫辛酰胺脱氢酶	1

2.3.6 比较基因组分析 平均核苷酸一致性(Average Nucleotide Identity, ANI)主要用于全基因组水平评估物种间的亲缘关系[26],常根据范围分为亚种间相似(90% ~ 96%)、种间相似(70% ~90%)和属间相似(50% ~70%),同一物种间的 ANI 值一般在 95% 以上[27]。本研究从 NCBI 数据库中筛选并下载 12 株已完成全基因组测序且无污染的乳杆菌,其中 7 株为与 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 同源性较高的植物乳杆菌,5 株为其他乳杆菌。对上述 12 株乳杆菌和菌株 ZR 进行 ANI 分析,结果显示,7 株植物乳杆菌和菌株 ZR 的 ANI 值均高于 99%(图 9)。这一结果表明,*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 与其他植物乳杆菌的同源相似性较高,进一步验证了其分类地位属于植物乳杆菌。共线性通常是指不同物种染色体中某些区域在基因排列顺序上具有

高度一致性。通常情况下,物种间的进化距离越远,其基因组的共线性程度越低,因此,共线性分析常被用于推测物种间的系统发育关系。此外,该分析还能够揭示在进化过程中基因组结构所发生的重排、缺失或重复等变异情况。*Lactiplantibacillus plantarum* WCSF1 最早于 2001 年从人类唾液中分离获得,并于同年完成了首次全基因组测序,后于 2012 年进行了基因组的重新测序与功能注释[28]。本研究选取 *Lactiplantibacillus plantarum* WCSF1 的全基因组序列作为参考模板,利用 TBtools 软件对 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 的基因组进行共线性比较分析(图 10)。结果显示,*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 突变重组位置较少,与 *Lactiplantibacillus plantarum* WCSF1 共线性及相似度极高,但也有局部位置发生插入、缺失和倒位等现象。其中 *scrR*、*bglA*[29]、*galE*[30] 等基因分别涉及甘露醇代谢、β-葡萄糖苷酶编码、果糖/甘露聚糖代谢、半乳糖代谢等碳水化合物代谢,*agrA*、*oppA*[31]、*opuA* 等基因与转录或转运相关。这些短片段基因的插入与倒位现象表明,该菌株在进化中经历了基因重组和位移现象,该现象可能与 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 具有较强产乳酸和木质纤维素降解能力有关。

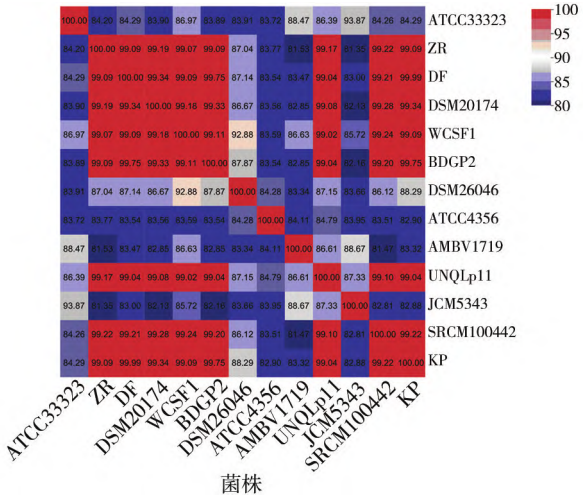


图 9 菌株基因组 ANI 热图

Fig. 9 Heatmap of strains genome ANI

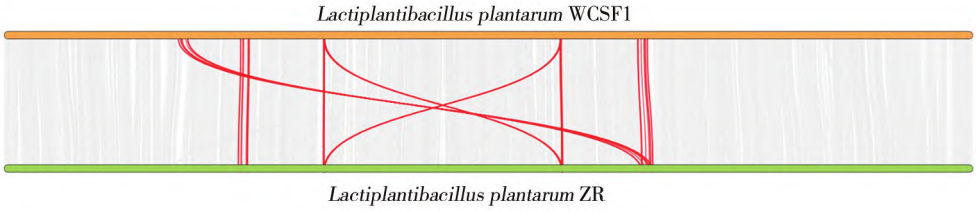


图 10 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 共线性分析

Fig. 10 Synteny analysis of *Lactiplantibacillus plantarum* ZR

3 讨 论

植物乳杆菌是青贮饲料制备过程中最常用的菌种[32],在青贮饲料制备过程中,植物乳杆菌能够迅速占据微生物群落的主导地位,并在 48 h 内通过厌氧糖酵解途径(EMP 途径)快速产生乳酸和乙酸,这一代谢活动有效抑制了腐败微生物的生长[6],使青贮饲料能够长期储存,对高质量青贮饲料的制备起着关键作用。本研究通过对一株具有较强青贮发酵功能的 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 进行全基因组测序,并对饲料乳酸含量、木质纤维素含量和木质纤维素降解酶活力进行测定和基因组注释、代谢系统分析以及比较基因组分析,阐明其具有较强的青贮发酵功能的基因组特征。

本研究发现,*Lactiplantibacillus plantarum* ZR

共有 31 个基因参与糖酵解途径,这些基因编码了糖酵解过程中所必需的全部酶系。此外,在 D-乳酸合成途径中,*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 含有编码 D-乳酸脱氢酶的基因(*IdhA*),能够直接将丙酮酸还原为 D-乳酸。在 L-乳酸合成途径中,*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 则包含多个关键酶编码基因,包括参与磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸的丙酮酸激酶基因(*pyk*)和催化丙酮酸生成 L-乳酸的 L-乳酸脱氢酶基因(*Idh*),以及丙酮酸氧化酶编码基因(*poxL*)。植物乳杆菌中乳酸产生的调控机制涉及多个基因和信号传导系统,如陆兆新等[33]研究表明植物乳杆菌中 *agr* 的双组分调控系统参与了乳酸产生和黏附性的调控;刘颖颖等[34]对 *L. plantarum* DY6 全基因组测序分析发现基因 *fruK*、*ack1*、*Idhl2*、*sacK*、*galM*、*argH* 和 *argF* 突变后,该菌株在葡萄糖、果糖和半乳糖代谢中生长活性和产酸性能等代谢均具有显著差异($P<0.05$)。这些发现与本研究在比较基因组中观察到的 *galE*[30]和 *agrA* 基因发生倒位现象后产乳酸能力增强的结果相符。

木质纤维素含量也直接影响青贮饲料品质。本研究发现外源添加 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 可显著降低 ADF 和 NDF 含量($P<0.05$)。菌株基因组代谢系统分析表明,该菌株共注释到 109 个 CAZyme 基因,其中 GH 基因 50 个,GT、CE 和 AA 基因分别为 32、19 和 6 个,在该菌株的基因组中,GH 基因的数量和占比均最高。岑时[35]通过比较基因组学对四类不同来源的植物乳杆菌进行比较,发现 CAZyme 基因在植物乳杆菌中存在共性:在 CAZyme 六大分类中,植物乳杆菌基因组内 GH 基因数量和占比最高,与本研究结果一致。众所周知,木质纤维素的降解过程离不开纤维素酶、半纤维素酶以及木质素降解酶的协同作用。彭明芳等[36]从广西酸菜中筛选获得 3 株乳杆菌,CAZyme 注释发现 3 株乳杆菌包含 17 个 CAZyme 共有基因,包括纤维素、半纤维素降解酶基因,果胶和淀粉降解酶基因等。本研究中 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 也具有丰富的木质纤维素酶基因,包括 25 个纤维素、半纤维素降解酶基因和 7 个木质素降解酶基因,说明该菌株在木质纤维素降解方面具有巨大潜力。除此之外,本研究的比较基因组分析还发现,*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 中 *scrR*、*bglA*[29]、*malL*、*galE*[30]、*agrA*、*oppA*[31]、*opuA* 等基因存在局部位置插入、缺失和倒位等现象,这些基因及其编码的酶在产乳酸代谢途径或木质纤维素降解途径中扮演着重要角色,参与了糖酵解以及中间产物合成、转运、分解、调控等过程。该现象可能是由于 *Lactiplantibacillus plantarum* ZR 在长期的进化过程中与其他细菌进行基因交换或独自发生基因突变的结果,这一突变可能与该菌株具备较强的产乳酸及木质纤维素降解能力有关。

本研究从构叶青贮饲料中筛选得到 4 株青贮优势乳酸菌,并将其分别作为接种菌剂进行为期 50 d 的青贮发酵试验。通过对青贮饲料的营养成分含量、产酸能力、木质纤维素降解酶活力以及乳酸菌数量动态变化检测发现,*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 较另外 3 株乳酸菌在青贮过程中最大程度地降解构叶中的木质纤维素,具有定殖和产乳酸能力强等优良性状,且富含多种木质纤维素降解和乳酸发酵功能基因,以及一定数量的毒力基因和耐药基因。在比较基因组分析中发现,*Lactiplantibacillus plantarum* ZR 与参考菌株 *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1 的基因组共线性和相似性极高,仅有少数与转录、转运和碳水化合物代谢相关的基因出现倒位现象,推测这一突变可能与该菌株具备较强产乳酸及木质纤维素降解能力有关,本研究结果可为菌株改造和功能优化提供参考。

参考文献:

[1] 邓植,沈世华. 构树作为新兴的蛋白饲料原料的研究[J]. 饲料工业, 2018, 39(11): 23-28.

[2] 张红,陈凤鸣,黄兴国,等. 构树叶的营养价值及其在动物生产中的应用研究进展[J]. 动物营养学报, 2020, 32(9): 4086-4092.

[3] 华世旋,杨旭艳,董红林,等. 杂交构树生产性能、营养价值及饲喂效果分析研究[J]. 现代畜牧科技, 2023(7): 16-20.

[4] 王为栋,孙海娟,张春宝. 构树的营养价值及其在畜禽生产中的应用研究进展[J]. 饲料研究, 2021, 44(3): 152-154.

[5] Wang WB, Nie YS, Tian H, et al. Microbial community, co-occurrence network relationship and fermentation lignocellulose characteristics of *Broussonetia papyrifera* ensiled with wheat bran[J]. Microorganisms, 2022, 10(10): 2015.

[6] 陈萍,师慧娟,郝怡欣,等. 青贮乳酸菌类型和乳酸合成途径的研究进展[J]. 中国饲料, 2024(19): 1-7.

[7] 庞悦,王思元,王琦,等. 基于 Meta 分析的乳酸菌添加剂对

全株玉米青贮发酵品质的影响[J]. 饲料工业,2025,46(8):147-156.
[8] 陈萍. 青贮乳酸菌的比较基因组分析及发酵功能研究[D]. 济南:济南大学, 2024.
[9] Wang YL, Wang WK, Wu QC, et al. The effect of different lactic acid bacteria inoculants on silage quality, phenolic acid profiles, bacterial community and *in vitro* rumen fermentation characteristic of whole corn silage[J]. Fermentation, 2022, 8(6): 285.
[10] Gallo A, Fancello F, Ghilardelli F, et al. Effects of several lactic acid bacteria inoculants on fermentation and mycotoxins in corn silage[J]. Animal Feed Science and Technology, 2021, 277: 114962.
[11] Kowalska JD, Nowak A, Śliżewska K, et al. Anti-salmonella potential of new *Lactobacillus strains* with the application in the poultry industry[J]. Polish Journal of Microbiology, 2020, 69(1): 5-18.
[12] 张校闯,胡雪俊,李成,等. 发酵液中乳酸含量测定方法比较研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2024, 51(3): 34-39.
[13] 张洪瑞,吉方财,王一凡,等. 不同栽培措施对全株玉米青贮效果及体外消化率的影响[J]. 草业科学, 2024, 41(12): 3016-3024.
[14] 张晓丽,吴望君,袁璐,等. 饲料中纤维素酶活力的测定方法研究[J]. 中国饲料, 2019(17): 104-107.
[15] Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, et al. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer[J]. Bioinformatics, 2007, 23(6): 673-679.
[16] Besemer J, Borodovsky M. GeneMark: Web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(web serverissue): W451-W454.
[17] Chan PP, Lowe TM. tRNAscan-SE: Searching for tRNA genes in genomic sequences[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1962: 1-14.
[18] Han C, Shi C, Liu L, et al. Majorbio cloud 2024: Update single-cell and multiomics workflows[J]. Imeta, 2024, 3(4): e217.
[19] Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(1): 81-91.
[20] Zhang F, Miao F, Wang X, et al. Effects of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on the quality and aerobic stability of corn silage[J]. Canadian Journal of Animal Science, 2021, 101(4): 761-770.
[21] Yi Q, Wang P, Yu M, et al. Effects of additives on the fermentation quality, *in vitro* digestibility, and aerobic stability of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) and wheat bran mixed silage[J]. Fermentation, 2023, 9(8): 711.
[22] Jung JS, Ravindran B, Soundharrajan I, et al. RETRACTED: Improved performance and microbial community dynamics in anaerobic fermentation of triticale silages at different stages[Z]. Elsevier, 2022,345: 126485.
[23] Blajman J, Vinderola G, Paez RB, et al. The role of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for alfalfa silage: A meta-analysis[J]. The Journal of Agricultural Science, 2020, 158(1-2): 107-118.
[24] 宋慧. 乳酸菌筛选及其对苜蓿青贮发酵性能的影响[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2022.
[25] Li SY, Wang GQ, Long L, et al. Functional and structural dissection of glycosyltransferases underlying the glycodiversity of wolfberry-derived bioactive ingredients lycibarbarspermidines[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 4588.
[26] Sun Z, Harris HM, Mccann A, et al. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera[J]. Nature Communications, 2015, 6(1): 8322.
[27] Castillo-Ramírez S. On the road to genomically defining bacterial intra-species units[J]. MSystems, 2024, 9(7): e00584-00524.
[28] Liu CJ, Wang R, Gong FM, et al. Complete genome sequences and comparative genome analysis of *Lactobacillus plantarum* strain 5-2 isolated from fermented soybean[J]. Genomics, 2015, 106(6): 404-411.
[29] Xiao Y, Dong S, Liu YJ, et al. Key roles of β-glucosidase BglA for the catabolism of both laminaribiose and cellobiose in the lignocellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 250: 126226.
[30] Nagode A, Vanbeselaere J, Dutkiewicz Z, et al. Molecular characterisation of *Entamoeba histolytica* UDP-glucose 4-epimerase, an enzyme able to provide building blocks for cyst wall formation[J]. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2023, 17(8): e0011574.
[31] Hughes AM, Darby JF, Dodson EJ, et al. Peptide transport in *Bacillus subtilis*-structure and specificity in the extracellular solute binding proteins OppA and DppE[J]. Microbiology, 2022, 168(12): 001274.
[32] 李年顺,曹雅雄,郭孟娇,等. 不同植物乳酸杆菌对苜蓿和全株玉米青贮的影响[J]. 饲料工业,2025,46(22):102-108.
[33] 陆兆新,孟凡强. 植物乳杆菌素合成及其调控机制的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(5): 784-792.
[34] 刘颖颖,卢艳波,杨小雁,等. 植物乳杆菌 DY6 的生理特性及代谢机制分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(18): 11-19.
[35] 岑时. 不同来源植物乳杆菌的特异性进化规律及遗传背景多样性研究[D]. 无锡:江南大学, 2020.
[36] 彭明芳,李培骏,单杨,等. 比较基因组揭示广西酸菜乳杆菌碳水化合物活性酶谱[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(4): 68-73.