

# 富含 S-层蛋白乳酸菌的鉴定及其 消化酶耐受性研究

肖荣<sup>1</sup>, 范郁冰<sup>1</sup>, 王远亮<sup>1,2</sup>, 李宗军<sup>1,2,3,\*</sup>

(1. 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南农业大学食品科学与技术学院, 湖南长沙 410128;

2. 湖南省发酵食品工程技术研究中心, 湖南长沙 410128;

3. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南农业大学, 湖南长沙 410128)

**摘要:** 通过平板划线分离法从新鲜牛奶中筛选获得一株乳酸菌菌株, 命名为 M8, SDS-PAGE 分析该菌株富含 S-层蛋白。结合表型特征、生理生化特征与 16S rRNA 基因序列分析法, 鉴定该菌株为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)。对其人工消化液耐受性分析, 结果显示: 其对人工胃液(3.0g/L, pH2.5)具有良好耐受能力, 能在人工肠液(10g/L, pH8.0)中增殖, 且 S-层蛋白具有耐消化酶酶解能力。提示 S-层蛋白作为保护屏障, 可抵抗消化酶的作用。

**关键词:** 乳酸菌; S-层蛋白; 消化酶; 耐受

## Identification of a Lactic Acid Bacteria Strain Rich in Surface (S)-Layer Protein and Its Tolerance to Digestive Enzymes

XIAO Rong<sup>1</sup>, FAN Yu-bing<sup>1</sup>, WANG Yuan-liang<sup>1,2</sup>, LI Zong-jun<sup>1,2,3,\*</sup>

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Provincial Engineering and Technology Center for Fermented Food, Changsha 410128, China; 3. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** A strain of lactic acid bacteria was isolated from fresh milk by plate streaking method. The isolated strain was named as M8, which was rich in S-layer protein according to sodium dodecyl sulfonate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis. The strain was identified as the species of *Lactobacillus brevis* via morphological observation, physiological and biochemical characteristics, and phylogenetic analysis of 16S rRNA sequences. Its excellent tolerance was found during sequential suspension at 37 °C in a mimic gastric juice (pH 2.5) containing pepsin (3 g/L) and citric acid-phosphate buffer (100 mmol/L) and then in a mimic small intestinal juice (pH 8.0) containing trypsin (10 g/L) and Tris-HCl buffer (25 mmol/L). Therefore, S-layer protein may function as a protective barrier and resist the invasion of digestive enzymes.

**Key words:** lactic acid bacteria; S-layer protein; digestive enzyme; tolerance

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)19-0165-05

乳酸细菌是自然界普遍存在的微生物类群, 几个世纪以前就被广泛应用于乳制品及其他发酵食品中, 甚至被直接开发成益生菌(probiotics), 因为它们中的许多种类构成了人和动物胃肠道中的正常菌群, 对宿主的健康非常有益。显然, 乳酸菌在肠道中存活的数量越多、定殖的时间越长, 对人体的健康就会越有利, 这也是评价益生菌的重要指标之一, 否则, 菌体细胞经摄食

进入胃肠后, 只会随消化道的蠕动被迅速排除体外而成为“过路菌”。因此, 乳酸菌能克服消化道中物理及化学因素的影响, 对胃液、肠液等具有良好耐受特性, 并能与胃肠道上皮细胞及黏液进行黏附, 是发挥其功效的前提<sup>[1]</sup>。随着对黏附机制的深入研究, 人们发现乳酸杆菌和宿主肠细胞的黏附与其菌体表面成分有关, 如脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)、胞外多糖

收稿日期: 2011-03-16

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z347); 湖南省研究生科研创新项目(54040108005/12254)

作者简介: 肖荣(1984—), 女, 博士研究生, 研究方向为食品微生物学。E-mail: xiaorong1216@126.com

\* 通信作者: 李宗军(1968—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: lizongjun@yahoo.com.cn

(exopolysaccharides, EPS)和S-层蛋白(S-layer protein),其中S-层蛋白起着关键作用<sup>[2]</sup>。S-层蛋白介导乳酸菌发生黏附。如黏附到肠407细胞<sup>[3]</sup>、胃肠黏液(gastric and intestinal mucus)<sup>[4]</sup>、纤维黏连蛋白(fibronectin)和层黏连蛋白(laminin)<sup>[5]</sup>。

S-层蛋白是一类能够自我组装的细胞外层蛋白,由蛋白或糖蛋白亚基呈晶体状排列而成,分子质量为40~200kD,占整个细胞蛋白含量的10%~15%,其主要功能有:保护细胞免受外界环境的侵害,控制营养代谢与转运,赋予细胞吸附与表面识别能力,维持细胞形态与硬度<sup>[6-7]</sup>。乳酸细菌S-层蛋白是已知S-层蛋白中分子质量最小的一类,分子质量在25~71kD之间,乳酸菌S-层蛋白亚基能够形成规则结构,如:双层/多层片状、圆筒状、球体等<sup>[8-10]</sup>,其S-层蛋白均为碱性蛋白,而其他细菌的S-层蛋白多呈弱酸性<sup>[6]</sup>。

我国是一个乳酸菌种资源十分丰富的国家<sup>[11]</sup>,然而富含S-层蛋白的乳酸菌资源尤为稀缺。目前仅在*L. acidophilus*<sup>[9]</sup>、*L. helveticus*<sup>[10]</sup>、*L. crispatus*<sup>[12-13]</sup>、*L. brevis*<sup>[2-3,5]</sup>、*L. fermentum*<sup>[4]</sup>、*L. gallinarum*<sup>[14]</sup>等少数几种乳酸杆菌中发现有S-层蛋白。本研究旨在对本实验室已筛选获得的1株富含S-层蛋白的乳酸菌M8菌株进行鉴定,并检测该菌株及其S-层蛋白对消化酶的耐受能力,为利用该菌株及其S-层蛋白开发新型微生态制剂提供基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、培养基与试剂

菌株M8 分离自新鲜的牛奶<sup>[15]</sup>。

MRS肉汤、MRS琼脂 美国BD公司; Laemmli样品缓冲液、胃蛋白酶、胰蛋白酶(Geneview分装) 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; pTA2 Vector 日本(上海)生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

DY CZ-24DM蛋白电泳槽 北京市六一仪器厂; Mycycler™ Thermal Cycler PCR仪 美国Bio-Rad公司; SW-CJ-1FD单人单面净化操作台 苏州净化设备有限公司; TGL20M台式高速冷冻离心机 长沙英泰仪器有限公司; LMQJ3870C立式灭菌锅 山东新华医疗器械股份有限公司; WZZ-2S数字式自动旋光仪 重庆赛恩斯仪器有限公司。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 S-层蛋白 SDS-PAGE 检测

将受试菌株接种于MRS肉汤,37℃恒温培养过夜,取1.5mL培养物于5000×g低温离心5min,收集菌体,加纯水100μL和5×Laemmli样品缓冲液25μL,涡旋振荡数秒后,沸水浴5min,稍加离心取上清液15μL进行SDS-PAGE<sup>[16]</sup>,电泳后用考马斯亮蓝染色观察。

#### 1.3.2 表型特征鉴定

参照《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[17]</sup>,观察菌株M8经37℃培养48h后生长于MRS平板上的单菌落形态,包括形状、大小、色泽、表面、边缘等;对培养细胞进行革兰氏染色后显微镜下观察细胞形态,包括大小、形状、有无内生芽孢;并分析其生理生化特征,包括厌氧性实验、接触酶实验、H<sub>2</sub>S实验、pH4.5生长实验、乳酸旋光性测定。

#### 1.3.3 16S rRNA 基因序列分析

##### 1.3.3.1 菌株基因组DNA的提取

将受试菌株接种到MRS肉汤,37℃培养至饱和状态,取1.5mL培养物于5000×g低温离心5min;菌体用560μL的pH8.0 TE缓冲液使之重悬,加入适量溶菌酶(终质量浓度为2mg/mL),37℃温育1h后,加10% SDS 30μL轻轻混匀,继续37℃温育30min;加入5mol/L NaCl 100μL,充分混匀再加入80μL十六烷基三甲基溴化铵-氯化钠(CTAB-NaCl)溶液,混匀后于65℃温育20min;加等体积的氯仿-异戊醇(24:1, V/V)轻轻混匀,12000×g低温离心5min,将上清液转入新管中;加等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V)轻轻混匀,12000×g低温离心5min,将上清液转入新管中;加入0.6倍体积的异丙醇,轻轻混匀,室温放置过夜,12000×g低温离心5min;用-20℃预冷的70%乙醇1mL洗涤沉淀,弃上清液,真空抽干后加20μL TE(含20μg/mL的Rnase)缓冲液,室温作用30min后,以1%琼脂糖电泳检测,总DNA样品于-20℃保存备用。

##### 1.3.3.2 PCR扩增16S rRNA基因序列

以制备好的基因组DNA为PCR扩增模板,16S rRNA序列扩增参照文献<sup>[18]</sup>进行,引物序列为27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3')。PCR扩增反应体系(25μL):DNA 1μL、10×buffer(Mg<sup>2+</sup>plus)2.5μL、dNTP 100μmol/L、每条引物各10pmol、Taq DNA polymerase 1U。PCR扩增条件:第一步95℃,预变性4min;第二步95℃,变性50s,52℃,退火1min,72℃,延伸2min,30个循环;第三步:72℃,延伸10min。PCR产物经胶回收试剂盒纯化后,与pTA2 Vector连接,连接产物转化感受态细胞DH5α,经异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-gal)平板进行蓝白斑筛选,提取蓝白斑质粒,以EcoR I进行酶切,1%琼脂糖凝胶电泳检测各片段,对阳性重组子进行序列测定。将所得序列,运用Blast程序与Genbank中序列进行相似性比对,以鉴定该富含S-层蛋白的乳酸菌菌株M8的种属。

##### 1.3.4 菌株对人工胃液、肠液的耐受能力

参照文献<sup>[9,19]</sup>方法,在pH2.5、0.1mol/L柠檬酸-

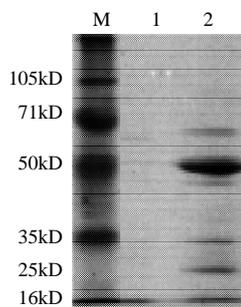
磷酸盐缓冲液中, 以过滤除菌法加入适量胃蛋白酶, 使终质量浓度为 3.0g/L(1000U/g), 制得人工胃液; 同样方法向 pH8.0 的 25mmol/L Tris-HCl 缓冲液中, 加入适量胰蛋白酶, 使终质量浓度为 10g/L(250U/g)制得人工肠液。菌悬液过夜培养, 活菌数为 10<sup>9</sup>CFU/mL, 无菌吸取该菌悬液 1~9 mL 人工胃液中, 涡旋混匀(此时活菌数为 10<sup>8</sup>CFU/mL), 于 37℃ 恒温培养 3h 后, 进行活菌计数, 并立即无菌吸取 1mL 经人工胃液处理 3h 以后的菌液至 9mL 人工肠液中, 涡旋混匀后继续于 37℃ 恒温培养, 分别于 4、8h 后取样进行活菌计数。

### 1.3.5 S-层蛋白耐消化酶能力

称取适量胃蛋白酶、胰蛋白酶, 分别用 0.1mol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH2.5)、25mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)溶解至适宜的浓度备用<sup>[9]</sup>。无菌吸取 1mL 对数生长期的菌悬液数管, 4℃、5000 × g 离心 5min, 弃上清液收集菌体, 用 50mmol/L Tris-HCl(pH7.5)洗涤两次, 分别用 100 μL 50 μg/mL 胃蛋白酶液、胰蛋白酶液重悬, 涡旋混匀后于 37℃ 温育 1h, 加 5 × 上样缓冲液, 沸水浴 5min 终止反应, SDS-PAGE 检测 S-层蛋白降解情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 M8 S-层蛋白检测



M. 预染蛋白 Marker; 1. 培养上清液; 2. 体细胞。

图1 菌株 M8 S-层蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of S-layer protein from strain M8

菌体细胞与 Laemmli 缓冲液混合后, 沸水浴过程中, 将 S-层蛋白氢键、疏水键等次级键打断, 使之变性溶解于 Laemmli 缓冲液中。菌株 M8 的 S-层蛋白检测结果见图 1。培养上清液未检测到条带, 而菌株 M8 的菌体细胞显示出约 50kD 大小的优势条带, 表明该菌株不能分泌 100kD 以内的胞外蛋白, 菌体细胞本身携带有丰富的 S-层蛋白。Leeuw 等<sup>[5]</sup>研究发现 *L.brevis* ATCC 8287 的 S-层蛋白 A(SlpA)由 435 个氨基酸残基组成, 分子质量也为 46kD, 略低于菌株 M8 的 S-层蛋白分子质量, 而 Jakava-Viljanen 等<sup>[2]</sup>报道的 *L.brevis* ATCC 14869 菌株的 *slpB* 基因编码表达的 S-层蛋白分子质量为 50kD, 这与该实验结果一致。

### 2.2 菌株 M8 的鉴定

#### 2.2.1 表型特征鉴定

菌落形态特征(图 2a): 圆形、直径为 2~3mm、灰白色、湿润、菌落平坦、表面光滑、有晕圈、边缘不整齐、容易挑取。细胞形态特征(图 2b, × 100 油镜): 革兰氏染色阳性、短杆状、两端钝圆、单个或成短链、长为 1.4~3.2 μm、宽为 0.7~0.8 μm, 无内生芽孢。

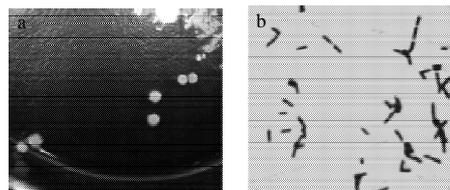


图2 菌株 M8 菌落及细胞形态图

Fig.2 Morphology of strain M8 colonies and cells

#### 2.2.2 生理生化特征

经生理生化特性分析发现: 菌株 M8 属兼性厌氧型、接触酶反应阴性、不能产生 H<sub>2</sub>S、能在 pH4.5 条件下生长、可产生 DL-型乳酸(表 1)。综合表型特征及生理生化特征, 根据《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[17]</sup>, 初步将菌株 M8 鉴定为乳杆菌属(*Lactobacillus*)。

表1 菌株 M8 生理生化反应

Table 1 Biochemical characteristics of strain M8

实验项目	结果
需氧情况	兼性厌氧
接触酶	阴性
是否产 H <sub>2</sub> S	否
pH4.5 条件下是否生长	是
产乳酸的类型	DL 型

#### 2.2.3 16S rRNA 基因序列分析

16S rRNA 基因序列具有高度的保守性和特异性且足够长, 因此对该基因序列的分析是细菌分类学研究当中最常用和最有效的手段, 人们越来越青睐这种既快速又可靠的菌种鉴定方法。本研究结合了经典的表型鉴定与 16S rRNA 序列分析方法, 对富含 S-层蛋白的菌株 M8 的种属进行判定。

经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示: 提取的基因组 DNA 条带亮、质量高(图 3a); PCR 扩增产物条带亮、大小约 1.5kb, 与预测结果相符(图 3b); 将阳性克隆的重组子质粒进行酶切, 结果显示插入片段约 1.5kb, 与扩增出来的目的片段大小相符, 表明转化成功(图 3c), 对此质粒进行序列分析(测序工作由上海生工生物工程技术服务有限公司完成), 获得菌株 M8 16S rRNA 近全长序列,

与 GenBank 中序列 Blast 比对结果显示(表 2): 与该序列相似性较高的前 100 个序列中, 93 个为短乳杆菌(*L. brevis*), 3 个为不可培养细菌克隆子(uncultured bacterium colne), 2 个为不可培养堆肥细菌(uncultured compost bacterium), 1 个为香肠乳杆菌(*L. faciminis*), 1 个为瘤胃细菌(rumen bacterium)的 16S rRNA 序列的部分序列, 相似性均  $\geq 99\%$ , 且前 37 个均为短乳杆菌, 因此推断该菌株 M8 为 *L. brevis* M8。

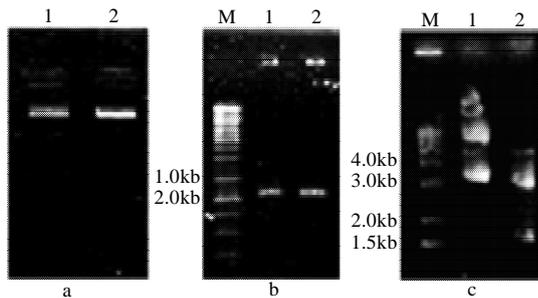


图 a: 1、2.基因组 DNA; 图 b: M. DNA Marker, 1、2. PCR 产物; 图 c: M. DNA Marker, 1.阴性克隆重组子, 2.阳性克隆重组子。  
图 3 菌株 M8 模板 DNA、PCR 扩增产物、阳性重组子质粒酶切琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of strain M8 DNA template, PCR amplified products and fragments from recombinant plasmid digested by restriction enzymes

### 2.3 耐消化酶能力

*L. brevis* 是一种极具应用前景的益生性乳酸菌, 常常以益生性乳品辅助物和疫苗载体的形式进入宿主胃肠道。益生菌摄入消化道后, 若对其分泌的消化酶具有良好耐受能力, 则可在消化道顺利存活并增殖, 从而持久地发挥其功效。哺乳动物胃肠道主要分泌胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶, 后两种蛋白酶作用相似。

#### 2.3.1 菌株对消化酶耐受能力

对人工胃液和人工肠液的耐受性可用来反馈益生菌细胞在消化道的存活率。该实验采用这两种消化液来模拟人体和动物胃肠道环境, 测定菌株对消化酶的耐受能力。

表 2 菌株 M8 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中序列 Blast 比对部分结果  
Table 2 Partial list for the results of 16S rRNA gene sequence comparison with Genbank

登录号	序列描述	最大匹配分值	总分值	查询序列的覆盖度/%	E 值	最高相似度/%
HQ702478.1	<i>Lactobacillus brevis</i> strain NS01 16S ribosomal RNA gene	1945	1945	100	0.0	99
HQ293076.1	<i>Lactobacillus brevis</i> strain NWL53 16S ribosomal RNA gene	1945	1945	100	0.0	99
GU125543.1	<i>Lactobacillus brevis</i> strain IMAU80121 16S ribosomal RNA gene	1945	1945	100	0.0	99
AB266535.1	<i>Lactobacillus brevis</i> gene for 16S ribosomal RNA	1945	1945	100	0.0	99
DQ523492.1	<i>Lactobacillus brevis</i> strain LA122 16S ribosomal RNA gene	1945	1945	100	0.0	99
HM058398.1	<i>Lactobacillus brevis</i> strain MGC8-1 16S ribosomal RNA gene	1943	1943	99	0.0	99
CP000416.1	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367, complete genome	1940	9689	100	0.0	99
HQ726794.1	<i>Lactobacillus brevis</i> strain CGMCC1306 16S ribosomal RNA gene	1934	1934	100	0.0	99
HM162416.1	<i>Lactobacillus brevis</i> strain CGMCC_1.2028 16S ribosomal RNA gene	1929	1929	99	0.0	99

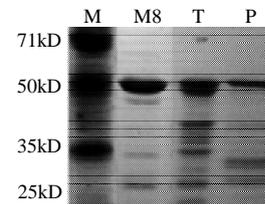
表 3 模拟胃肠道环境下活菌数变化( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Viable counts in mimic gastrointestinal environments( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

指标	人工胃液(pH2.5)		人工肠液(pH8.0)		
	0h	3h	0h	4h	8h
活菌数 (lg(CFU/mL))	8.18 $\pm$ 0.04	7.01 $\pm$ 0.06	6.01 $\pm$ 0.06	7.30 $\pm$ 0.03	7.02 $\pm$ 0.07

由表 3 可见, 37℃人工胃液中温育 3h 后, 降低了 1.17 个对数单位, 存活率为 67.67%, 活菌数仍在  $10^7$ CFU/mL 数量级; 在随后的 37℃人工肠液中继续温育 4、8h 后活菌数分别升高了 1.29 和 1.01 个对数单位, 即由  $10^6$ CFU/mL 增殖到了  $10^7$ CFU/mL。提示该菌株在上消化道环境中具有良好的耐受能力, 在模拟下消化道环境中可顺利存活并且能有效增殖。

#### 2.3.2 S-层蛋白耐消化酶酶解能力



M.预染蛋白 Marker; M8. M8 酶解前; T. M8 菌株胰胃蛋白酶酶解后; P. M8 菌株胰蛋白酶酶解后。

图 4 消化酶酶解 S-层蛋白的 SDS-PAGE 分析  
Fig.4 SDS-PAGE analysis of the fragments from S-layer protein digested by digestive enzymes

由图 4 可见, 胃蛋白酶作用菌体后, 除含大量 S-层蛋白未被消化外, 降解产物中含较多 30、25kD 的片段, 少量 40、36kD 的片段; 胰蛋白酶处理后, 也有大量 S-层蛋白存在, 降解产物中略小于 49kD 的片段居多, 40、32、25kD 片段次之, 36、20kD 的片段较少。可见, 两种蛋白消化酶分别作用后, 均能引起 S-层的部分降解, 但 S-层蛋白含量仍占主导, 表明 *L. brevis* M8 的 S-层蛋白具有较强的抗消化能力。

Smit 等<sup>[9]</sup>报道了 *L. acidophilus* ATCC 4356 的 S-层蛋白(分子量 43kD)经胰蛋白酶 37℃作用 1h 后被彻底消化, 裂解片段中除了含大量约 36kD 的多肽外, 还含有少量 31、25、18kD 的多肽片段, 这与本实验中胰蛋白酶消化 *L. brevis* M8 的 S-层蛋白所得的片段大小基本一致。

### 3 讨论

经鉴定确定菌株 M8 为乳杆菌属, 短乳杆菌种 (*Lactobacillus brevis*), 富含 S- 层蛋白, 分子质量大小约 50kD。国外研究发现几种 *L.brevis* 均可分泌表达 S- 层蛋白, 但分子质量在 43~50kD 不等<sup>[2-3]</sup>, 可见 S- 层蛋白的表达具有菌株特异性。*L.brevis* ATCC 14869 菌株氧气充足的情况下长成粗造型(R)菌落, 分泌表达两种 S- 层蛋白; 而在厌氧条件下长成光滑型(S)菌落, 仅分泌表达一种 S- 层蛋白, 分子质量为 50kD<sup>[2]</sup>; 相反, 受试菌株 M8 却是在氧气充足条件下长成 S 型菌落, 并富含 50kD 的 S- 层蛋白。提示 S- 层蛋白的分泌表达可能决定了菌落的表型; 二者所要求的培养方式不同, 故推断编码表达 50kD 的 S- 层蛋白的 S- 层基因存在差异。

模拟胃环境下, *L.brevis* M8 细胞活菌数由 10<sup>8</sup>CFU/mL 降低至 10<sup>7</sup>CFU/mL, 存活率大于 60%, 在随后的模拟肠环境下, 其初始活菌数由 10<sup>6</sup>CFU/mL 增殖到了 10<sup>7</sup>CFU/mL, 活菌数不降低反升高。SDS-PAGE 分析显示: 经胃肠液分别处理后, *L.brevis* M8 菌体细胞上的 S- 层蛋白有少部分降解, 但大量的 S- 层蛋白仍不被消化。提示分布于细胞壁最外层的 S- 层蛋白, 起天然屏障的作用, 使细胞有效抵抗胃蛋白酶、胰蛋白酶的侵袭。Chartreteris 等<sup>[19]</sup>曾推断, 牛奶蛋白、黏液可能为消化蛋白酶缓释剂和抑制剂, 从而在消化道蠕动过程中能够更好地维护摄入体内的细菌活性。又因为乳杆菌 S- 层蛋白为碱性蛋白质, 因此, *L.brevis* M8 菌株细胞在 S- 层蛋白保护下, 更能适应 pH 8.0 的人工肠液, 从而得以顺利存活并有效增殖。

综上所述, M8 菌株为一株 *Lactobacillus brevis*, 能分泌大量 S- 层蛋白, 该菌株及其 S- 层蛋白具有耐消化酶能力。这些特性显示了 *L.brevis* M8 及其 S- 层蛋白应用于益生菌具有良好前提和基础。针对该菌株 S- 层蛋白及 S- 层基因展开相关研究: 如探讨 S- 层蛋白的纯化方法、表面形貌的结构展示、与宿主的黏附及拮抗病原菌的特性, 克隆编码该 S- 层蛋白的基因, 使之得以异源表达, 构建基因工程菌株等, 将是本课题组下一步的研究重点。

### 参考文献:

- [1] del PIANO M, MORELLI L, STROZZI G P, et al. Probiotics: from research to consumer[J]. Digestive and Liver Disease, 2006, 38(Suppl 2): S248-S255.
- [2] JAKAVA-VILJANEN M, ÅVAIL-JÄÄSKELAINEN S, MESSNER S, et al. Isolation of three new surface (S-)layer protein genes(sip)from *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184: 6786-6795.
- [3] ÅVALL-JÄÄSKELAINEN S, LINDHOLM A, PALVA A. Surface display of the receptor-binding region of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive intestinal epithelial cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 2230-2236.
- [4] ROJAS M, ASCENCIO F, CONWAY P L. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2330-2336.
- [5] LEEUW E, LI Xiangqun, LU Wuyuan. Binding characteristics of the *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 surface layer to extracellular matrix proteins[J]. Federation of European Microbiological Societies, 2006, 260(2): 210-215.
- [6] SÁSA M, SLEYTR U B. S-layer proteins[J]. J Bacteriol, 2000, 182(4): 859-868.
- [7] 刘元元, 杨秀华, 王远亮, 等. 乳酸杆菌表层蛋白及应用研究[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 279-282.
- [8] KATRIN P, SABINE M. Construction of an S-layer protein exhibiting modified self-assembling properties and enhanced metal binding capacities [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75: 1079-1085.
- [9] SMIT E, OLING F, DEMEL R, et al. The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 305: 245-257.
- [10] KATHENE C J H, KAREN E H, MAHSA G, et al. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells cellular[J]. Microbiol, 2007, 9(2): 356-367.
- [11] 都立辉, 刘芳, 鞠兴荣, 等. 与宿主相互作用的乳酸杆菌表面蛋白综述[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 323-328.
- [12] CHEN Xueyan, XU Jingjing, SHUAI Jiangbing, et al. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 115: 307-312.
- [13] HORIE M, ISHIYAMA Y, FUJIHIRA U Y, et al. Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer[J]. J Appl Microbiol, 2002, 92(3): 396-403.
- [14] HAGEN K E, GUAN L L, TANNOCK G W, et al. Detection, characterization, and *in vitro* and *in vivo* expression of genes encoding S-proteins in *Lactobacillus gallinarum* strains isolated from chicken crops [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6633-6643.
- [15] 肖荣, 杨秀华, 王远亮, 等. 乳酸杆菌的筛选及其 S- 层蛋白的初步研究[J]. 农产品加工: 学刊, 2008(11): 8-11.
- [16] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [17] 凌代文, 东秀珠. 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: 6-24.
- [18] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3<sup>rd</sup> ed. Beijing: Science Press, 2002: 611-617.
- [19] CHARTRETERIS W P, KELLY P M, MORELLI L. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84(5): 759-768.