

乳酸杆菌 S-层蛋白性质及其益生功能研究进展

卢千慧 张英春* 张兰威

(哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要: 乳酸杆菌为应用最早、研究最多的益生菌种之一, 能够调节肠道微生物区系的平衡, 增强机体的免疫力和抵抗力。S-层蛋白在乳酸杆菌黏附过程中起重要作用, 因此乳酸杆菌中的 S-层蛋白成为研究热点。本文对乳酸杆菌 S-层蛋白的结构、分离提纯方法、基因克隆情况和益生功能做了详细阐述。

关键词: 乳酸杆菌, S-层蛋白, 益生功能

Advances in S-layer protein properties of *Lactobacillus* and its probiotic functions

LU Qian-Hui ZHANG Ying-Chun* ZHANG Lan-Wei

(School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

Abstract: *Lactobacilli*, one of the most common members of intestinal microbiota, have been applied and studied considerably. Because it can regulate the host intestinal microbiota balance and improve the immunity and resistance of host. *Lactobacillus* surface layer proteins (S-layer proteins) have been a research hotspot for playing an important role in the adhesion to the host. Here we summarize the advances in researches about the structure, the method of separation and purification, the situation of gene cloning and the probiotic functions of S-layer protein.

Keywords: *Lactobacillus*, S-layer protein, Probiotic function

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是一类能利用碳水化合物产生乳酸的非病原性、革兰阳性细菌的通称, 包括乳杆菌(*Lactobacillus*)、乳球菌(*Lactococcus*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)等。一些乳酸菌是人和动物的胃肠道和雌性生殖道的共生菌, 可以促进人和动物的健康。研究表明, 乳酸菌具有改善胃肠道功能、提高免疫能力、改善机体营

养状况等良好机能^[1]。其中乳酸杆菌有嗜酸性, 最适pH 5.5–6.0, 且在pH 3.0–4.5仍能生存, 在无芽孢杆菌中其耐酸力最强。肠道乳酸杆菌可分解糖产酸, 抑制致病菌及腐败菌的繁殖。另外还可以产生乳酶, 可治疗腹泻。酸牛奶中的乳酸杆菌也有抑制肠道致病菌的作用。乳酸杆菌是一群生活在机体内有益于宿主健康的微生物, 它维护人体健康和调节

基金项目: 中国博士后基金项目(No. 2012M510093); 中央高校基本科研业务费专项资助项目(No. HIT.NSRIF.2012082); 国家 863 计划项目(No. 2007AA10Z354)

*通讯作者: ✉ zyc229@163.com

收稿日期: 2013-01-23; 接受日期: 2013-03-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

免疫功能的作用已被广泛认可。而S-层蛋白作为乳酸杆菌的作用因子之一,已经越来越受到人们的关注。目前对乳酸杆菌的研究大多都是在发酵制品和微生物制剂上,对乳酸杆菌的S-层蛋白的研究还很少。据国内外相关报道,并不是所有的乳酸杆菌都有S-层蛋白^[2]。目前已证实的具有S-层蛋白的乳酸杆菌有嗜酸乳酸杆菌、卷曲乳酸杆菌、嗜淀粉乳酸杆菌、约氏乳酸杆菌、短乳酸杆菌、瑞士乳酸杆菌、高加索乳酸杆菌、鸡乳酸杆菌、发酵乳酸杆菌、副干酪乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌,但同一种之间不同亚种也存在不具备S-层蛋白的现象^[3]。

本文将从 S-层蛋白的结构及组成、S-层蛋白的分离提纯方法、S-层蛋白基因克隆反映出的多样性、S-层蛋白的益生功能等方面对乳酸杆菌的 S-层蛋白进行综述。

1 乳酸杆菌 S-层蛋白

乳酸杆菌 S-层蛋白是由蛋白质或者糖蛋白亚基组成,呈规则的晶状排列,形成了能够覆盖整个细胞表面的固态表层。其分子量在 25–71 kD 之间,是已知表层蛋白中分子量最小的一类,一般细菌的

S-层蛋白的分子量都在 40–200 kD。绝大多数 S-层蛋白都是单一的蛋白质或糖蛋白组成的,很少有 两种或两种以上蛋白质组成的情况。另外,乳酸杆菌的表层蛋白的等电点为 9.35–10.40,均为碱性蛋白,这是乳酸杆菌独有的特性。

1.1 乳酸杆菌 S-层蛋白的结构及组成

S-层蛋白自我组装成均匀结晶的平面结构,它的晶格有倾斜、正方形和六角形 3 种,其中六角形的晶格在古生菌中占大多数,如图 1A 所示。S-层蛋白的晶格厚度为 2.5–35.0 nm^[4–7],外表层更为平滑,内层则相对粗糙。用电子显微镜和原子力显微镜观察到高达 70%的晶格表面被 2–8 nm 大孔径的气孔覆盖^[8–11],如图 1B 所示,为乳酸杆菌 S-层蛋白表面结构的冰冻刻蚀照片,可以清晰的看见其平面气孔结构。

质谱法可以对 S-层蛋白质一级结构进行鉴定^[12],主要给出 S-层蛋白的精确分子量和氨基酸组成等信息。Ramiah 等^[13]用质谱法对从 SDS 凝胶上切下的 *L. plantarum* 423 的 S-层蛋白带进行纯化和鉴定,结果表明 20 kD 和 35 kD 的 S-层蛋白分别

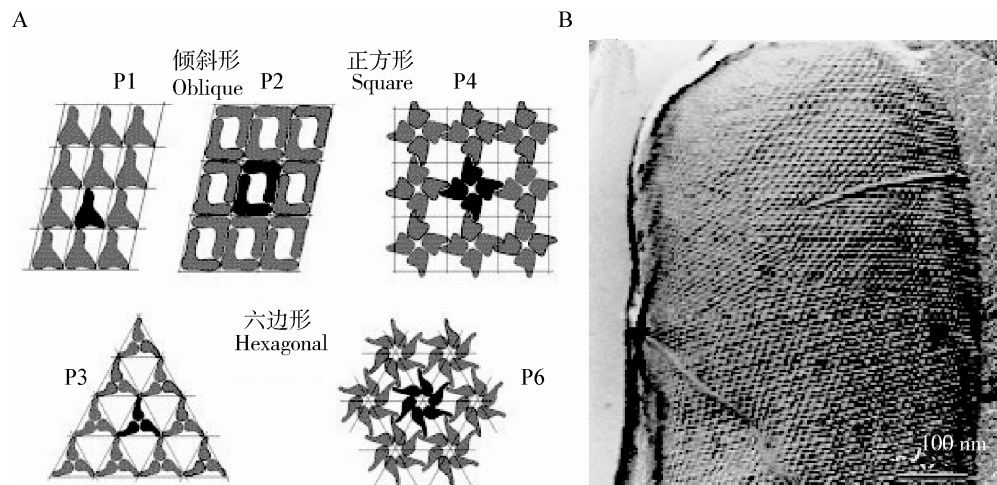


图 1 电镜下乳酸杆菌表面 S-层蛋白冰冻刻蚀照片及其形状^[4]

Figure 1 Electronic micrograph of *Lactobacillus* S-layer proteins and its shape^[4]

注: A: S-层蛋白的形状有倾斜形(P1, P2)、正方形(P4)、六边形(P3, P6); B: 70%的晶格表面被2–8 nm大的孔径的气孔覆盖。
Note: A: The shape of the S-layer protein is oblique (P1, P2), square (P4) or hexagonal (P3, P6); B: 70% of the lattice surface is covered by 2–8 nm stomatal.

为EF-Tu和GAPDH。Borja等^[14]把*L. rhamnosus* GG的S-层蛋白带从SDS凝胶上切下后用胰蛋白酶化,把产生的肽混合物用MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight)进行串联质谱分析,鉴定出了此菌株表面有核糖体蛋白,磷酸丙糖异构酶,氨肽酶等多种蛋白质及其分子量。典型的S-层蛋白主要以酸性、疏水的氨基组成。通过对一些乳酸杆菌的S-层蛋白的氨基组成的研究,如短乳酸杆菌(*L. brevis*)、嗜酸乳酸杆菌(*L. acidophilus*)、瑞士乳酸杆菌(*L. heiveticus*)、约氏乳酸杆菌(*L. johnsonii*)、加氏乳酸杆菌(*L. gasseri*),得出S-层蛋白含有大量疏水性氨基酸,含量在31.9%–38.7%之间,乳酸杆菌S-层蛋白含羟基氨基酸的含量也较高,为23%–33%,硫氨基酸含量较小,最大为1.8%。迄今为止,乳酸杆菌中只有加氏乳酸杆菌(*L. gasseri*) VPI11759 Apfl蛋白发现含有一个半胱氨酸残基。而赖氨酸残基含量为4.7%–10.7%,精氨酸残基含量为1.2%–2.9%^[15]。

目前报道的用于分析S-层蛋白二级结构的技术主要有圆二向色谱技术(Circular-dichroism, CD)、红外光谱技术(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)和示差扫描量热仪(Differential scanning calorimeter, DSC)技术等。CD分析S-层蛋白的二级结构得出,大约20%的氨基酸形成了 α -螺旋,40%形成 β -折叠,而形成的无规则卷曲和 β -转角结构在5%–45%之间。FTIR分析*L. brevis* ATCC8287的S-层蛋白二级结构得出,非聚集菌株含有40%–50%的 β -折叠,聚集菌株中的 β -折叠含量降到了25%–30%;分析*L. kefir*的S-层蛋白二级结构得出,含有27.7%的 α -螺旋,含有56.5%的 β -折叠。用DSC对S-层蛋白进行热分析,结果表明,*L. brevis* ATCC8287 β -折叠的热稳定性很高,蛋白折叠的含量相比于其他蛋白也很高,其在30–130 °C有两个相变,分别在58 °C和98 °C。*L. kefir*分别在67–70 °C和110–119 °C有相变,在加热过程中二级结构被修改,热稳定性增加, β -折叠的百分比在第一相变发生变化^[16-17]。

S-层蛋白为多结构域的蛋白,其中一个细胞壁连接结构域与S-层蛋白连接在乳酸杆菌细胞壁表面的糖链结合的肽段有关,其连接作用与一个特殊的细胞壁多聚体亚单位有关。而自我组装结构域与大部分的蛋白组装有关。基因技术的发展,大量的S-层蛋白基因序列被测定出来,发现自我装配区域位于S-层蛋白的中心或C-末端,C-末端区域位于S-层蛋白的外层表面,主要负责蛋白对细胞外膜的锚定作用,同源性比较高。N-末端区域通常位于S-层蛋白的内层表面,它的区域主要与蛋白的自身组装及对细胞的黏附作用相关,变异较大^[18]。

S-层蛋白从单体到二维蛋白质晶体的自我组装还可以通过化学交联法和原子力显微镜来检测。但是有关S-层蛋白亚基之间的相互作用的分子性质的研究报道较少。目前,还没有确定的残基分布在肽聚糖结合蛋白晶体的内侧,但是有研究称S-层蛋白单位上有残基,于是Helen等^[19]用化学交联法与巯基反应和光活化试剂来识别亚基界面的残基,用凝胶电泳法检测到了交联的二聚体,结果表明23个残基中的8个位于亚基界面处。分析表面接触蛋白的数据,可以看出10个残基在亚基界面的内部,有5个残基被暴露到了细胞壁表面晶格的外部。而在革兰阳性菌中S-层蛋白亚基和菌体表层的肽聚糖或假胞壁质相连。

原子力显微镜(Atomic force microscope, AFM)用于解决在纳米尺度及以上的乳酸杆菌的S-层蛋白的结构,相互作用和柔软度问题。虽然乳酸杆菌的表面的聚合物的构象对其物理化学性质具有重大的意义,但是对这些构象的研究很少。原子力显微镜是最合适直接研究表面聚合物构象性质的仪器,如图2所示。图2C、D是在错误信号偏转模式(Error-signal deflection mode)中得到的图像,显示出其非均质性,而图2A、B则比较均匀。由图2A、B的热波动现象可以看出这两个菌株的表面结构不同。图2A中*L. johnsonii*菌株的表面表现出了一个模糊的特性,而其他菌株的表面比*L. johnsonii*菌株更模糊,因此含有表面蛋白越多的菌株,其表面越平滑。

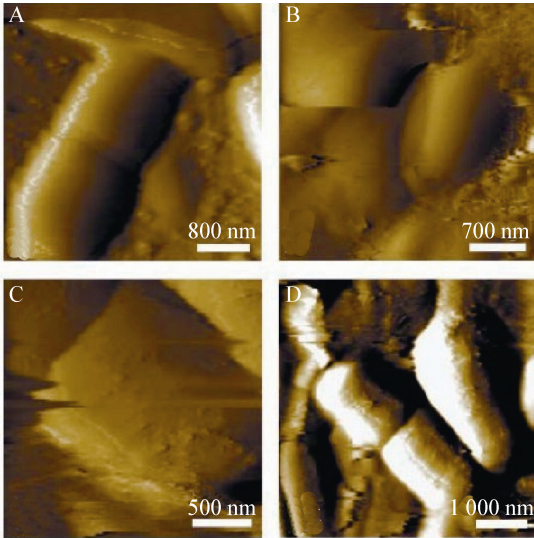


图 2 AFM 偏转图像显示的乳杆菌菌株的表面形貌^[20]
Figure 2 AFM deflection images showing the surface morphology of the *Lactobacillus* strains^[20]
注: A: *L. johnsonii* ATCC33200; B: *L. crispatus* DSM20584; C: *L. helveticus* ATCC12046; D: *L. helveticus* ATCC15009. *L. johnsonii*菌株的表面表现出了一个模糊的特性, 因此含有表面蛋白越多的菌株, 其表面越平滑.
Note: A: *L. johnsonii* ATCC33200; B: *L. crispatus* DSM20584; C: *L. helveticus* ATCC12046; D: *L. helveticus* ATCC15009. The surfaces of the *L. johnsonii* strains exhibit a fuzzy character, whereas the definition of the surfaces of the S-layer-containing strains is higher, and the surfaces appear smoother.

1.2 S-层蛋白的分离提纯方法

表面蛋白在细胞内合成后转运到作用位点, 通过共价或非共价方式结合到细胞表面的肽聚糖层, 因此可以利用疏水键破坏剂或电荷捕获剂来提取。早在1979年, Masuda等^[21]用高浓度的尿素提取乳杆菌(*L. brevis*)表层蛋白; 1980年, Masuda等^[22]又尝试了盐酸胍法提取乳杆菌(*L. brevis*)表层蛋白; 2004年Garrote等^[23]使用了高浓度的LiCl提取*L. kefir*和*L. parakefir*的表层蛋白获得了较好的效果。李振梅等^[24]对*L. acidophilus* S-层蛋白的提取方法进行了改进, 用酸性5 mol/L LiCl法、中性5 mol/L LiCl法和8 mol/L尿素法提取嗜酸乳杆菌的表层蛋白, 考马斯亮蓝测蛋白浓度, 进行常规SDS-PAGE, 用Gel-Pro软件进行数据分析, 得出其中酸性5 mol/L LiCl法提取表层蛋白百分含量最多。从温

度、时间分析影响提取条件的因素, 进行常规SDS-PAGE, 检测提取表层蛋白的效果, Sephadex G-100柱分离提纯表面蛋白, 发现25 °C处理15 min得到最大量的S-层蛋白。后来Sánchez等^[14]用了6种不同的方法提取LGG的S-层蛋白。由表1可知, 用NaOH、LiCl和溶菌酶萃取的S-层蛋白明显高于其他的方法, 其中以用5 mol/L LiCl的方法提取的S-层蛋白最多。用pH 7.3的PBS处理的比用pH 4.0的PBS处理的S-层蛋白的含量高12倍。这一结果表明, 中性到碱性的pH溶液可能会扰乱某些表面相关蛋白之间相互的静电作用和细菌细胞膜, 从而允许从细胞表面提取较高量的蛋白质。目前大部分实验者都选择用5 mol/L LiCl法分离表层蛋白。

国内外学者们曾采用过尿素、LiCl对一些乳杆菌的S-层蛋白进行分离, 以阳离子交换柱层析法^[25]、Sephacryl S200 HR柱层析法^[26]、阴离子交换柱层析法^[3]对S-层蛋白进行纯化, 效果良好。肖容等^[27]采用SephadexG-75凝胶过滤柱层析法来纯化短乳杆菌M8的S-层蛋白的粗提物, 于52 min时出现一个明显的洗脱峰, 如图3A所示, 取相对应管号的收集产物进行SDS-PAGE检测, 从图3B中馏分12~17可以发现条带在50 kD处清晰单一, 可判定该收集产物为纯化的S-层蛋白, 与上述国外研究对比, 此操作方法更为简单, 对填料要求不苛刻, 无需使用变性剂作为洗脱液, 可避免S-层蛋白因变性剂处理时间过长而引起不可逆变性, 更有效地保障了S-层蛋白的生物活性, 为进一步利用其活性而开辟新思路。

表 1 不同方法提取的表面 S-层蛋白的含量 ^[14]	
Table 1 Protein yields of the different methods for extraction of surface-associated proteins ^[14]	
方法 Methods	蛋白含量 Protein yield (mg/L)
0.01 mol/L NaOH	493.1±61.9
5 mol/L LiCl	591.7±49.8
Lysozyme buffer	355.0±70.4
2 mol/L Guanidine-HCl	11.0±0.1
PBS (pH 7.3)	142.7±78.0
PBS (pH 4.0)	12.0±0.4

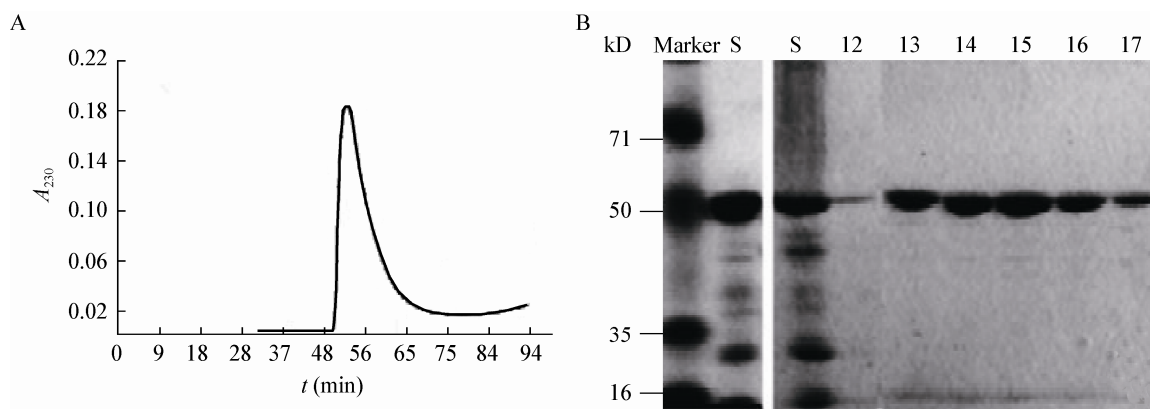


图3 S-层蛋白的提纯及 SDS-PAGE 检测^[27]

Figure 3 Purification and SDS-PAGE of S-layer protein^[27]

注: A: S-层蛋白粗提物凝胶过滤层析谱图; B: S-层蛋白的SDS-PAGE分析; S: S-层蛋白粗提物; 12-17: 各管号收集产物。

Note: A: Elution profile of S-layer proteins on Sephadex G-75 column; B: SDS-PAGEs of eluate fractions; S: Crude extract of S-layer protein; 12-17: Collect products in each tube.

1.3 S-层蛋白的基因克隆反映出的多样性

GenBank中收录的S-层蛋白基因序列至少16种, 长度约为12-22 kb, 其他的像*L. amylovorus*、*L. buchneri*、*L. gallinarum*、*L. kefir*及*L. parakefir*等也有关于S-层蛋白的报道。有的乳酸杆菌有一种S-层蛋白基因, 但是有的乳杆菌有2-3种S-层蛋白基因^[3]。也有的乳酸杆菌里不含S-层蛋白, 比如*L. gasseri*和*L. johnsonii*就不含S-层蛋白编码基因^[27]。目前的研究结果中还没有在乳球菌里发现S-层蛋白。对GenBank中收录的S-层蛋白基因序列进行比对后发现同种乳酸菌S-层蛋白基因相似性非常大^[28], 且不同菌株间相似性也较大; 但是不同种的乳酸菌S-层蛋白的基因相似性很低。然而, *L. acidophilus*和*L. helveticus*的S-层蛋白在整个序列都表现着高度的相似性。

不同菌株间S-层蛋白的多样性可能与其基因表达的生态环境有关。在*L. acidophilus* ATCC 4356及其相近的菌种, 例如*L. crispatus*、*L. amylovorus*和*L. gallinarum*中, 找到了两个编码S-层蛋白的基因, 其中一个沉默的, 而另外一个能够转录。在*L. acidophilus*的基因组中, 其活性基因和沉默基因位于染色体上的一段6 kb大小的片段上, 并且两

者的转录方向相反。在*L. brevis* ATCC 14869的基因组中存在着4个S-层蛋白基因, 并且它们的表达受生长条件的调控。Jakava-Viljanen等^[25]的研究显示, *L. brevis* ATCC14869在通风条件下*SlpB*和*SlpD*都能表达, 菌落呈现光滑型; 在厌氧条件下仅*SlpB*能够表达, 菌落呈现粗糙型; 而*SlpC*在实验条件下都未检测到表达。而肖容等的研究表示*L. brevis* M8在氧气充足条件下菌落呈现光滑型, 这似乎是环境对乳酸杆菌S-层蛋白表达有影响。*L. crispatus* ATCC 4356和*L. crispatus* JCM 5810, 其中一个基因可在细菌中得到表达, 而另一个则为沉默型。*L. crispatus* ZJ001的S-层蛋白基因*slpA*和*slpB*位于长约9.0 kb的*slp*片段上, 间隔约4.5 kb^[29]。当然不同的分离方法也会对S-层蛋白的量产生影响甚至造成S-层蛋白的丢失^[20], 这也会对结果产生一定影响。不同的培养基也会对S-层蛋白的性状和功能造成影响, Prisca等^[30]的研究显示, 当大量减少碳水化合物含量时, *L. acidophilus* NCC2628 S-层蛋白的含量会稍有增加; 在没有蛋白胨的培养基中, S-层蛋白的成分也会发生改变, 而且S-层蛋白的表达也与氮源密切相关。由此可见乳酸杆菌的S-层蛋白在不同的生态条件下, 其表达和产量会受到很大的影响。

2 S-层蛋白的益生功能

S-层蛋白规则的晶格有重要的生物学性能: 结构支架、分子筛、矩阵锚定的外切酶、促进细胞黏附的毒力因子、对宿主免疫应答的保护层、在体外进行自我组装。虽然对乳酸菌S-层蛋白的功能还不是很了解, 但是随着研究的深入, 越来越多的研究表明乳酸菌S-层蛋白对宿主细胞具有黏附性。

2.1 S-层蛋白对致病菌黏附的抑制作用

致病菌黏附到肠上皮细胞的机制之一是和肠上皮细胞表面分子的受体结合, 而乳酸杆菌细胞壁上的表面大分子能够阻断或抑制致病菌与这些受体的结合, 乳酸杆菌与宿主的相互作用主要与菌体S-层蛋白、脂磷壁酸(Lipoteichoic acids, LTA)和胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS)等有关^[31], 其中的S-层蛋白对致病菌的抑制黏附作用研究较多^[32-33], 这与其自身的黏附性有关。用*L. acidophilus* L-92研究对肠上皮Caco-2细胞的黏附作用, 这株菌表现出很高的黏附性。对此株菌的细胞壁上的蛋白用双向电泳进行分析, 挑选出信号比较强的18个点进行MALDI-TOF检验, 其中*slpA*被认为是与黏附性有关的蛋白。用LiCl提取*slpA*, 做SDS-PAGE分析, 发现*slpA*含量的多少与黏附性强弱有关^[34]。

为了深入了解乳酸杆菌的S-层蛋白的抗菌机制, Li等^[35]研究了乳酸杆菌S-层蛋白如何作用在鼠伤寒沙门氏菌上来影响人结肠上皮细胞Caco-2在体外诱导的细胞凋亡。Caco-2细胞感染鼠伤寒沙门氏菌SL1344, 活化的半胱天冬酶-3介导细胞凋亡。当鼠伤寒沙门氏菌SL1344和S-层蛋白同时孵育, 用流式细胞仪和显微镜观察, 可以观察到显著降低了Caco-2细胞凋亡并且修复了细胞的损伤。详细分析结果表明, S-层蛋白抑制半胱天冬酶-3活性, 激活细胞外信号调节激酶1和2(ERK1/2)的信号转导通路。这些研究结果表明, 乳酸杆菌S-层蛋白保护细胞, 防止沙门氏菌通过降低半胱天冬酶-3的活性来诱导的细胞凋亡。

用细胞分离实验在体外的真核细胞里做*L. kefir*的S-层蛋白抑制艰难梭状芽孢杆菌(TcdA和TcdB)产毒素的细胞病理实验。来自8个不同株的*L. kefir*的S-层蛋白能够抑制艰难梭菌通过消耗培养物上清液对Vero细胞产生的损伤。此外, 相同的保护效果在F-肌动蛋白网络染色中也被观察到了。聚集性的*L. kefir* (CIDCA 83115, 8321, 8345和8348)的S-层蛋白比那些非聚集性的(CIDCA 83111, 83113, JCM 5818, ATCC 8007)表现出较高的抑制能力, 这表明菌株结构上的差异与拮抗梭菌毒素的效果有关^[36]。

同时, 我们课题组从传统发酵乳制品和肠道中分离筛选到一株*L. paracasei* M5-L 和一株*L. johnsonii* F0421, 能够显著抑制宋内志贺菌对 HT-29 细胞的黏附作用, 主要是S-层蛋白发挥主要的作用, SDS-PAGE分析表明其分子量分别为45 kD和40 kD, 进一步对S-层蛋白的氨基酸组成研究发现, 其中疏水性氨基酸的含量达到40.52%和35.40%, 推测可能是这种疏水性氨基酸有助于M5-L抑制致病菌黏附作用^[37-38]。

2.2 S-层蛋白对病毒的抑制作用

目前的资料报道*L. acidophilus* ATCC4365的S-层蛋白被认为可能是胡宁病毒(Junin virus, JUNV)抑制剂^[39]。因为DC-SIGN (DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin)是一种细胞表面黏附因子, 它能增强病毒的侵入。DC-SIGN在细胞表达时能增强JUNV的侵入。实验中使用3T3细胞表达DC-SIGN, 当用*L. acidophilus* ATCC4365的S-层蛋白处理3T3细胞后, 几乎完全抑制了JUNV感染, 分析原因可能是由于S-层蛋白的高等电点(PI>9.5), S-层蛋白和DC-SIGN之间有静电作用, 这个静电作用阻断了JUNV的侵袭。

2.3 S-层蛋白对消化酶的耐受性

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。肖容等^[40]的实验采用胰胃蛋白酶和胃蛋白酶处理来模拟人体和动

物胃肠道环境,测定*L. brevis* M8菌株对这两种消化酶的耐受能力。此实验证实在模拟胃环境下,*L. brevis* M8细胞活菌数由 10^8 CFU/mL降低至 10^7 CFU/mL,存活率大于60%,在模拟肠环境下,其初始活菌数由 10^6 CFU/mL增殖到了 10^7 CFU/mL,活菌数不降低反升高。经由SDS-PAGE实验分析: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。由此说明*L. brevis* M8的S-层蛋白对消化酶有耐受性。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。

3 结语

乳酸杆菌作为一种微生物制剂,有很大的应用前途,而黏附性是影响其效果的重要指标,乳酸杆菌S-层蛋白对其黏附性有很大作用,但是其黏附机理还需要进一步研究。近年来,乳酸杆菌S-层蛋白由于其独特的性质(自动聚集性、黏附性以及耐酶性)受到越来越多的关注。发酵乳制品是人类摄入外源乳酸杆菌的重要途径,利用分子手段、基因手段加以研究,筛选出黏附性高的乳酸杆菌菌株,以生产出功能性发酵乳制品,对乳制品的附加值有很大意义。大力研究乳酸杆菌S-层蛋白,使其在基因工程疫苗、生物传感器、生物制剂等方面也能够得到应用。

我国丰富的乳酸发酵食品蕴含大量的乳酸杆菌,对传统发酵乳制品中乳酸杆菌中的S-层蛋白挖掘研究相对较少,因为并不是所有的乳酸杆菌都具有S-层蛋白,不同的生态环境对其的形成有重要的影响,由此可见,传统乳制品中的乳酸杆菌是挖掘S-层蛋白的重要的生物资源,对今后我国乳酸杆菌资源可持续利用有着重要意义。

参考文献

- [1] 雷欣宇, 曾凡坤, 康建平, 等. 乳酸菌的生理功能及其食用制剂制备技术进展[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(2): 6-8.
- [2] Hagen KE, Guan LL, Tannock GW, et al. Detection and characterization of *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.
- [3] 李鹏成, 叶小兰, 王志胜, 等. 乳酸杆菌 S-层蛋白对鼠伤寒沙门氏菌黏附及入侵 Cao-2细胞的拮抗作用[J]. 微生物学报, 2010, 50(9): 1226-1231.
- [4] Sára M, Sleytr UB. S-layer proteins[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(4): 859-868.
- [5] Sleytr UB, Beveridge TJ. Bacterial S-layers[J]. Trends Microbiology, 1999, 7(6): 253-260.
- [6] Baumeister W, Engelhardt H. Three-dimensional structure of bacterial surface layers[J]. Membrane Structures, 1987, 6: 109-154.
- [7] Sleytr UB, Messner P, Pum D, et al. Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology[J]. Angewandte Chemie International Edition, 1999, 38(8): 1035-1054.
- [8] Scheuring S, Stahlberg H, Chami M, et al. Charting and unzipping the surface layer of corynebacterium glutamicum with the atomic force microscope[J]. Molecular Microbiology, 2002, 44(3): 675-684.
- [9] Ebner A, Kienberger F, Huber C, et al. Atomic force microscopy imaging and molecular recognition force microscopy of recrystallized heterotetramers comprising an S-layer-streptavidin fusion protein[J]. ChemBioChem, 2006, 7(4): 588-591.
- [10] Györfvay ES, Stein O, Pum D, et al. Self-assembly and recrystallization of bacterial S-layer proteins at silicon supports imaged in real time by atomic force microscopy[J]. Journal of Microscopy, 2003, 212(3): 300-306.
- [11] Engelhardt H, Saxton WO, Baumeister W, et al. Three-dimensional structure of the tetragonal surface layer of *Sporosarcina ureae*[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 168(1): 309-317.
- [12] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels[J]. Analytical Chemistry, 1996, 68(5): 850-858.
- [13] Ramiah K, van Reenen CA, Dicks LMT. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*[J]. Research in Microbiology, 2008, 159(6): 470-475.
- [14] Sánchez B, Bressollier P, Chaignepain P, et al. Identification of surface-associated proteins in the probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. International Dairy Journal, 2009, 19(2): 85-88.
- [15] 刘元元, 杨秀华, 王远亮. 乳酸杆菌表层蛋白及应用研究[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 279-283.
- [16] Mobili P, Londero A, Maria TMR, et al. Characterization of S-layer proteins of *Lactobacillus* by FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry[J]. Vibrational Spectroscopy, 2009, 50(1): 68-77.
- [17] Gerbino E, Mobili P, Tymczynszyna E, et al. FTIR

- spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus kefir* S-layers and metal ions[J]. Journal of Molecular Structure, 2011, 987(1): 186-192.
- [18] 刘志华, 沈通一, 秦环龙. 乳酸杆菌表面蛋白结构和生物学功能的研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 2009, 16(6): 368-372.
- [19] Kinns H, Howorka S. The surface location of individual residues in a bacterial S-Layer protein[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 377(2): 589-604.
- [20] Schär-Zammaretti P. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations[J]. Biophysical Journal, 2003, 85(6): 4076-4092.
- [21] Masuda K, Kawata T. Ultrastructure and partial characterization of a regular array in the cell wall of *Lactobacillus brevis*[J]. Microbiology and Immunology, 1979, 23(10): 941-953.
- [22] Masuda K, Kawata T. Reassembly of the regularly arranged subunits in the cell wall of *Lactobacillus brevis* and their reattachment to cell wall[J]. Microbiology and Immunology, 1980, 24(4): 299-308.
- [23] Garrote GL, Delfederico L, Bibiloni R, et al. *Lactobacilli* isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins[J]. Journal of Dairy Research, 2004, 71(2): 222-230.
- [24] 李振梅, 陈营, 安利国, 等. 嗜酸乳杆菌表层蛋白提取方法及影响因素的研究[J]. 生命科学研究, 2007, 11(1): 44-47.
- [25] Boot HJ, Kolen CPAM, van Noort JM, et al. S-Layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(19): 6089-6096.
- [26] Sampathkumar P, Gilchrist ML. Synthesis and characterization of bioconjugates of S-layer proteins[J]. Bioconjugate Chemistry, 2004, 15(4): 685-693.
- [27] 肖容, 范郁冰, 张丽丽, 等. 乳源短乳杆菌 M8 S-层蛋白的提纯及其生物学特征分析[J]. 食品科学, 2012, 33(7): 172-175.
- [28] 杨秀华, 王远亮, 肖荣, 等. 乳酸菌 S-层蛋白的功能特性及在微生态制剂中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(11): 124-130.
- [29] 王凡, 李晓清, 刘婷. 乳酸杆菌 S-层蛋白研究进展[J]. 中国饲料, 2012, 19: 34-37.
- [30] Prisca SZ, Dillmann ML, Nicola DA, et al. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8165-8173.
- [31] 张英春, 韩雪, 单毓娟, 等. 益生菌抑制致病菌作用的机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1306-1313.
- [32] Johnson-Henry KC, Hagen KE, Gordonpour M, et al. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells[J]. Cellular Microbiology, 2007, 9(2): 356-367.
- [33] Chen XY, Xu JJ, Shuai JB, 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(3): 307-312.
- [34] Ashida N, Yanagihara S, Shinoda T, et al. Characterization of adhesive molecule with affinity to Caco-2 cells in *Lactobacillus acidophilus* by proteome analysis[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 112(4): 333-337.
- [35] Li PC, Yin YY, Yu QH. *Lactobacillus acidophilus* S-layer protein-mediated inhibition of Salmonella-induced apoptosis in Caco-2 cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 409(1): 142-147.
- [36] Carasi P, Trejo FM, Pérez PF, et al. Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize *in vitro* cytotoxic effect of clostridium difficile toxins[J]. Anaerobe, 2012(18): 135-142.
- [37] Zhang YC, Zhang LW, Tuo YF, et al. Inhibition of *Shigella sonnei* adherence to HT-29 cells by lactobacilli from Chinese fermented food and preliminary characterization of S-layer protein involvement[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(8): 667-672.
- [38] Zhang YC, Zhang LW, Ma W, et al. Screening of probiotic lactobacilli for inhibition of *Shigella sonnei* and the macromolecules involved in inhibition[J]. Anaerobe, 2012, 18(5): 498-503.
- [39] Martínez MG, Acosta MP, Candurra NA, et al. S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* inhibits JUNV infection[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 422(4): 590-595.
- [40] 肖荣, 范郁冰, 王远亮, 等. 富含 S-层蛋白乳酸菌的鉴定及其消化酶耐受性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 165-169.