

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2019.01.009

文章编号:2095-6002(2019)01-0054-08

引用格式:孙艳菲,陈瑞,王露,等.戊糖片球菌表面蛋白性质及抑菌作用研究[J].食品科学技术学报,2019,37(1):54-61.

SUN Yanfei, CHEN Rui, WANG Lu, et al. Surface properties of *Pediococcus pentosaceus* and antibacterial effect[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019,37(1):54-61.

戊糖片球菌表面蛋白性质及抑菌作用研究

孙艳菲¹, 陈瑞^{1,2}, 王露¹, 江睿¹, 邓淳¹, 胡源^{1,2}, 饶胜其^{1,2,*}

(1.扬州大学 食品科学与工程学院,江苏扬州 225127;

2.江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室,江苏扬州 225127)

摘要:以戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*) F28-8为研究对象,菌株的生长情况与产酸能力分析表明,F28-8具有良好的酸适应能力,透射电镜(TEM)观察表明其存在蛋白层结构。应用5 mol/L LiCl提取菌株表面蛋白并进行SDS-PAGE和MALDI-TOF-MS分析,发现该菌株表面含有主要组分为分子量83.5 kDa的N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶和分子量51.1 kDa的LysM肽聚糖结合域蛋白。进一步的菌株表面性质测试、胶原蛋白黏附实验以及抑菌实验结果显示,表面蛋白的剥离显著降低了菌株F28-8的表面性质(自动聚集能力、表面疏水性和表面电荷),降幅达到19.0%~56.1%;LiCl提取的F28-8表面蛋白能显著降低沙门氏菌(*Salmonella enterica* subsp. CICC 21513)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CICC 21600)对胶原蛋白的黏附力,降幅分别为74.59%和81.16%;LiCl提取的F28-8表面蛋白对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率分别达到31.5%和15.6%。研究表明,戊糖片球菌F28-8表面蛋白能改变菌体表面性质,增强其抑制致病菌黏附的能力并表现出一定的抑菌能力,在抗菌剂开发领域具有一定的应用潜力。

关键词:戊糖片球菌;表面蛋白;表面性质;黏附性;抑菌性**中图分类号:** TS201.3**文献标志码:** A

益生菌(probiotics)又称微生态调节剂、活菌制剂,是一类能够对宿主生理功能产生有益作用的活性微生物,具有调节肠道微生态、改善肠道内环境、调节肠道菌群、抑制致病性菌等作用,主要包括双歧杆菌、乳酸菌和酵母菌^[1-2]。戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)隶属链球菌科片球菌属,为革兰氏阳性菌,因其能发酵葡萄糖产生乳酸而属于乳酸菌的一种。戊糖片球菌广泛分布于泡菜、干酪、香肠等传统发酵食品中,对提高发酵食品的风味、营养及安全性具有重要作用,同时具有免疫调节、促进健康以及抵抗病原菌侵袭等多种益生功能^[3-4]。

乳酸菌的多种益生功能与其表面活性因子的存在密不可分。黏附是乳酸菌发挥益生作用的第一

步,乳酸菌依靠其表面的蛋白、多糖等黏附宿主肠上皮细胞并定植,分泌代谢产物等,进而发挥抑制致病菌黏附和抑制致病菌生长等重要生理作用。在乳酸菌表面的众多黏附因子当中,乳酸菌表面蛋白是其主要黏附因子,与黏附相关的表面蛋白主要包括s-层蛋白、引物酶Sortase依赖蛋白、黏膜结合蛋白、黏附胞外间质的表面蛋白等^[5-6]。目前有关乳酸菌表面蛋白的结构与功能研究主要集中在乳酸杆菌中,包括罗伊氏乳杆菌的黏液结合蛋白(Mub)^[7]、卷曲乳杆菌的胶原结合表层蛋白(CbsA)^[8]和S-层蛋白(Slp B)^[9]、植物乳杆菌NL42的细胞壁固定蛋白(CwaA)^[10]等,而有关乳酸球菌表面蛋白的研究报道相对较少。

本研究室前期从臭豆腐发酵卤水中筛选到一株

收稿日期:2018-12-03

基金项目:江苏省高等学校创新创业训练计划项目(201711117047Y);2018年中国博士后科学基金面上项目。

第一作者:孙艳菲,女,本科生,研究方向为食品微生物功能发掘。

*通信作者:饶胜其,男,副教授,博士,主要从事食源性微生物安全控制技术方面的研究。

高黏附性戊糖片球菌 F28-8, 为进一步探究其益生功能, 通过 LiCl 提取其表面蛋白, 研究其对菌株表面性质的影响; 同时研究其对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌黏附胶原蛋白的抑制作用以及抑菌作用, 希望为戊糖片球菌及其表面蛋白在食品、生物和医药领域的实际应用提供信息参考。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

P. pentosaceus F28-8, 扬州大学食品科学与工程学院食品微生物实验室专利保藏菌株(中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为 CGMCC No. 9956); *Staphylococcus aureus* CICC 21600, *Salmonella enterica* subsp. CICC 21513(低毒力), 购置于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

LB 液体培养基的配制: 胰蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、氯化钠 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蒸馏水 1 L, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 湿热灭菌 15 min。

1.2 仪器与设备

SX-500 型高压蒸汽灭菌锅, 日本 Tommy 公司; Tecnai-12 型透射电镜, 荷兰 Philips 公司; ALPHAI-2LD PLUS 型冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; 5800 型超高分辨飞行时间生物质谱仪, 美国 AB SCIEX 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株活化

取 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 甘油管保存的戊糖片球菌按体积分数 2% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养 20 h 后, 再按 2% 的接种量活化于 MRS 液体培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养 20 h, 备用。

取 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 甘油管保存的金黄色葡萄球菌和沙门氏菌按体积分数 2% 的接种量接种于 LB 液体培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床培养 14 h 后, 再按 2% 的接种量活化于 LB 液体培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床培养 14 h, 备用。

1.3.2 戊糖片球菌的生长及产酸能力测定

以 2% 接种量取 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 甘油贮存液接种于 MRS 培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养 24 h, 每隔 2 h 测其 OD_{600} 值与 pH 值并绘制生长情况与产酸能力曲线图。

1.3.3 戊糖片球菌表面蛋白的提取与分析

表面蛋白提取方法参考 Johnson-Henry 等^[11] 的研究并稍作修改。菌株接种 MRS 培养基, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养 18 h, 8000 r/min 离心收集菌体, PBS 洗涤 2 次离心。对照组将菌体重悬于 PBS(phosphate buff-

ered saline), 处理组菌体加 5 mol/L LiCl $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用 0.5 h, 离心 (8000 r/min , 15 min), 弃上清液, 4 mol/L 盐酸胍溶液重悬混匀, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中处理 1 h, 离心 (8000 r/min , 15 min), 收集上清液。将上清液移入 14 kDa 分子截留量的透析袋中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 去离子水中透析 48 h 后, 离心 (12000 r/min , 15 min) 取上清液, 即为戊糖片球菌表面蛋白。

将 LiCl 处理前后的菌体重悬于 PBS, 分别滴至专用铜网上, 自然晾干 10 min 后, 滴加体积分数为 2% 的磷钨酸染色 2 min, 滤纸吸除多余染液, 用灯烘干。将样品装入样品台, 放入样品室进行透射电子显微镜(TEM)观察。同时将 LiCl 提取物采用 12% 分离胶的 SDS-PAGE 进行电泳分析。将电泳胶上的条带进行割胶后, 采用 PBS 洗净, 经胰蛋白酶酶解后进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析, 并应用 MASCOT 软件搜索 NCBI 数据库以获得蛋白信息。

1.3.4 戊糖片球菌表面性质测定

1.3.4.1 表面疏水性测定

参考 Rahman 等^[12] 的方法并加以适当修改。采用 0.1 mol/L KNO_3 溶液 (pH 值 6.2) 调整戊糖片球菌悬液菌体浓度至约 10^8 CFU/mL , 记录其 OD_{600} 值为 A_0 。取 1 mL 二甲苯加到 3 mL 戊糖片球菌悬液中, 室温静置 10 min 后振荡 2 min, 再静置 20 min。取水相测定其 OD_{600} 值记为 A_1 , KNO_3 溶液为空白对照。表面疏水率计算公式为 $(1 - A_1/A_0) \times 100\%$, 公式中 A_1 代表二甲苯处理后戊糖片球菌悬液在 600 nm 波长下的吸光值, A_0 代表二甲苯处理前戊糖片球菌悬液在 600 nm 波长下的吸光值。对照组为未经 LiCl 处理的乳杆菌, 处理组为经过 LiCl 处理的乳杆菌。

1.3.4.2 自动聚集能力测定

参考杨振泉等^[4] 的方法加以适当修改。戊糖片球菌悬液用 PBS 调整菌体浓度至约 10^8 CFU/mL 。菌悬液混匀 10 s 后, 记录其 OD_{600} 为 A_0 。室温静置 4 h, 取上清液测定其 OD_{600} 为 A_4 , PBS 溶液作为空白对照。自动聚集率计算公式为 $(1 - A_4/A_0) \times 100\%$, 公式中 A_4 代表戊糖片球菌悬液静置 4 h 后在 600 nm 波长下的吸光值, A_0 代表初始戊糖片球菌悬液在 600 nm 波长下吸光值。对照组为未经 LiCl 处理的乳杆菌, 处理组为经过 LiCl 处理的乳杆菌。

1.3.4.3 表面电荷测定

表面电荷测定, 参考 Kos 等^[13] 的研究方法, 稍作修改。取 1 mL 三氯甲烷或乙酸乙酯加到 3 mL 戊

糖片球菌悬液中,室温静置 10 min 后振荡 2 min,再静置 20 min。取水相测定其 OD_{600} 值记为 A_1 , KNO_3 溶液为空白对照。溶剂吸附率计算公式为 $(1 - A_1/A_0) \times 100\%$ 。公式中 A_1 代表三氯甲烷或乙酸乙酯处理后的菌悬液在 600 nm 波长下的吸光值, A_0 代表三氯甲烷或乙酸乙酯处理前菌悬液在 600 nm 波长下的吸光值。对照组为未经 LiCl 处理的乳杆菌,处理组为经过 LiCl 处理的乳杆菌。

1.3.5 菌株细胞黏附能力测定

参考 Horie 等^[14]实验方法并做适当修改。将玻片置于 12 孔培养板,每孔加入胶原蛋白液(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)2 mL,室温下包被 12 h。弃去蛋白液,无菌 PBS (pH 值 7.2) 洗涤 3 次。分别加入 2 mL 1.3.3 中 LiCl 处理前后的戊糖片球菌 F28-8 菌悬液(10^8 CPU/mL),放在 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱孵育 3 h,每组做两个复孔。弃去未黏附乳杆菌菌体后,用无菌 PBS 冲洗 3 次,用质量分数为 10% 甲醇固定 5 min 左右,用结晶紫染色 2 min 后洗涤脱色烘干。使用光学显微镜,于 10×100 倍油镜下观察,随机挑选 10 个视野,计算玻片表面黏附的戊糖片球菌数量并取 3 次实验的平均值表示菌体的黏附能力。

待胶原蛋白贴壁完全后,于培养板中加入 2 mL 1.3.3 中提取的表面蛋白(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^\circ\text{C}$ 孵育 3 h。吸掉未结合的蛋白,无菌 PBS 洗涤 3 次。加入 2 mL *Staphylococcus aureus* CICC 21600、或 *Salmonella enterica* subsp. CICC 21513 (10^8 CFU/mL),放在 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱孵育 3 h,每组做两个复孔。弃去未黏附菌体细胞后,进一步采用甲醇固定、结晶紫染色和显微镜观察,计算玻片表面黏附的菌体细胞数量。

1.3.6 戊糖片球菌表面蛋白抑菌能力测定

参照 Pradoacosta 等^[15]的研究方法加以修改。取活化好的 *S. aureus* CICC 21600 和 *S. enterica* subsp. CICC 21513 菌悬液接种入 LB 液体培养基中,接种量(体积分数)为 2%。实验组同时加入戊糖片球菌表面蛋白(终质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),而对照组只接种 *S. aureus* CICC 21600 和 *S. enterica* subsp. CICC 21513,37 $^\circ\text{C}$ 摇床振荡培养 10 h,每 2 h 测一次 OD_{600} 值。绘制生长曲线图。同一培养时间,实验组的吸光度值记为 A_T ,对照组的吸光度值记为 A_C ,按照式(1)计算 *S. aureus* CICC 21600 和 *S. enterica* subsp. CICC 21513 的生长抑制率。

$$\text{生长抑制率} = \frac{A_C - A_T}{A_C} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.7 数据统计分析

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,用 Duncan's 多重分析进行组间显著性检验,显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 戊糖片球菌的生长及产酸情况分析

将活化好的戊糖片球菌培养液接种至 MRS 液体培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 24 h,每 2 h 测一次 OD_{600} 值,绘制一定培养条件下戊糖片球菌的生长曲线图,如图 1。图 1 中,随着培养时间的增加,戊糖片球菌的生长速度逐步增快,并在 4 h 左右开始进入对数生长期,培养 12 h 后达到稳定期,生长减缓。在戊糖片球菌的适应期和对数期,培养基中的 pH 值一直在下降,从 5.64 下降到 4.14,并在 12 h 趋于稳定。在酸性条件下仍然保持生长稳定,说明戊糖片球菌具有较强的酸适应能力,能够在较低 pH 值条件下存活。

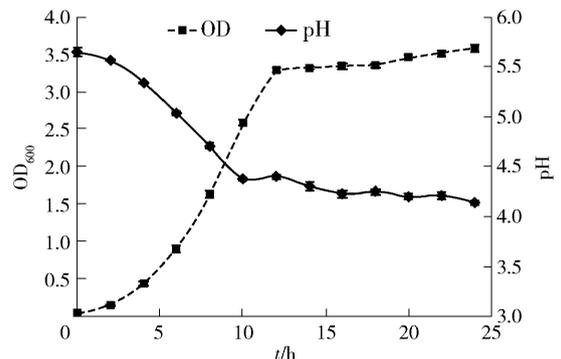
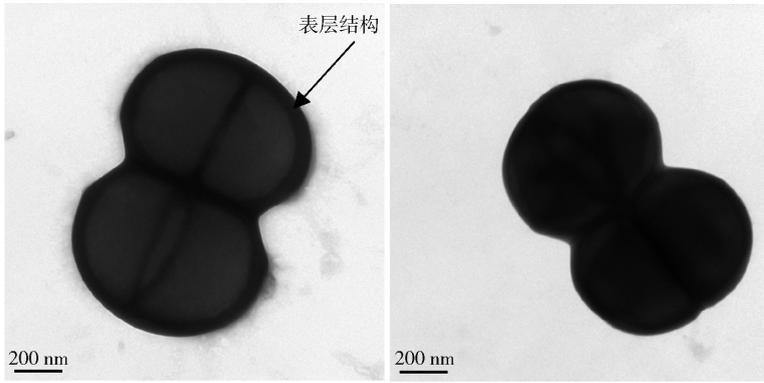


图 1 *P. pentosaceus* F28-8 的生长曲线及产酸情况
Fig. 1 Growth curve and acid production of *P. pentosaceus* F28-8

2.2 戊糖片球菌表面蛋白的提取及鉴定结果

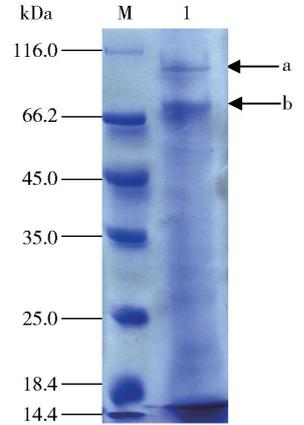
戊糖片球菌 F28-8 在 37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 18 h 后,透射电镜结果,见图 2。图 2(a) 显示分离株的细胞形态为四联球,并存在表层结构(图 2(a)),经 LiCl 处理之后,菌株表层基本脱落(图 2(b))。对 LiCl 提取的表面蛋白进行了电泳分析,如图 3。图 3 中,戊糖片球菌的 LiCl 提取物在分子量 45 ~ 116 kDa 存在主要蛋白条带 a 和 b。

将条带 a 和 b 分别进行割胶回收,胶内酶解,利用 MALDI-TOF-MS 进行蛋白鉴定,条带 a 的一级质谱图及代表母离子 1 567.79 m/z 的二级质谱见图 4。图 4 中条带 b 的一级质谱图及代表母离子 1 868 m/z 的二级质谱见图 5。通过 MASCOT 数据库搜索



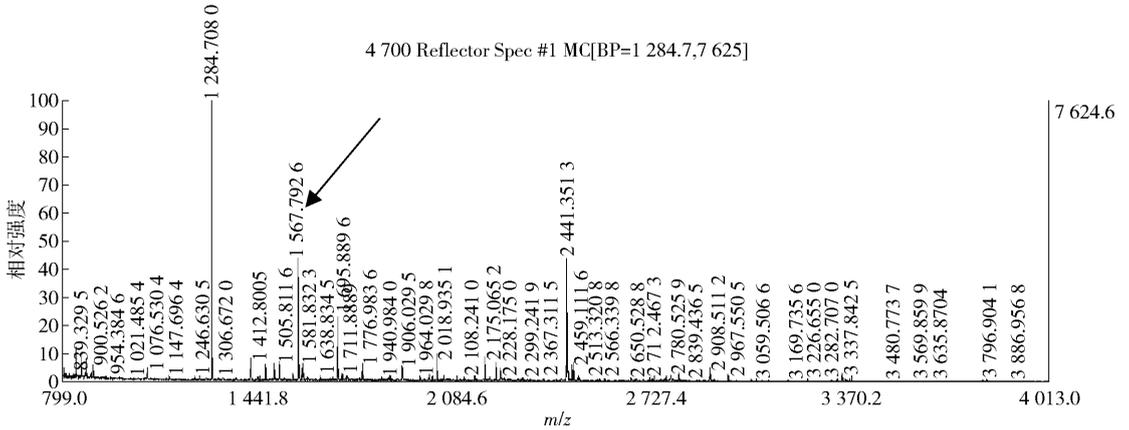
(a) 未处理的 *P. pentosaceus* F28-8 (b) LiCl 处理的 *P. pentosaceus* F28-8

图 2 *P. pentosaceus* F28-8 透射电镜图
Fig. 2 Transmission electron micrograph of *P. pentosaceus* F28-8

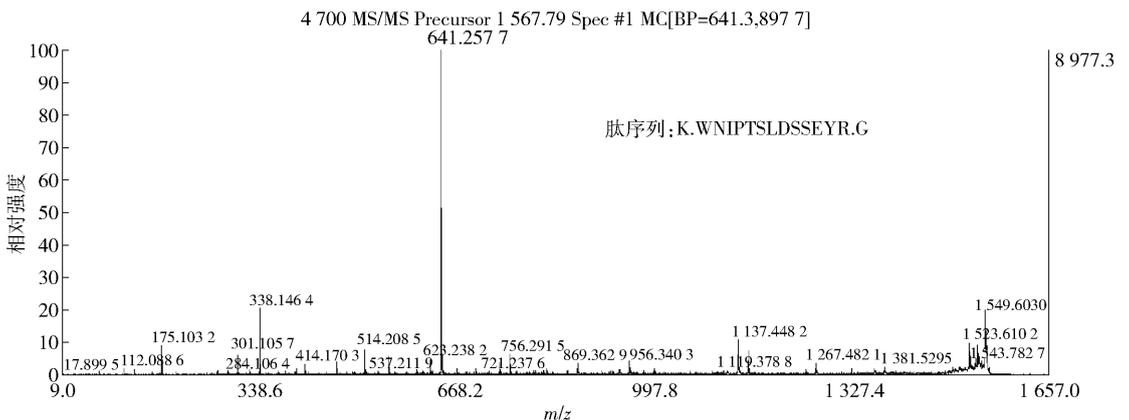


M: 标准蛋白 Marker; 1: 戊糖片球菌表层提取物。
图 3 *P. pentosaceus* F28-8 LiCl 提取物的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of LiCl extract of *P. pentosaceus* F28-8



(a) 条带 a 的一级质谱



(b) 条带 a 一级质谱中母离子 1 567.79 m/z 的二级质谱

图 4 *P. pentosaceus* F28-8 表面蛋白中条带 a 的质谱分析

Fig. 4 Mass spectrometric analysis of band a in surface protein of *P. pentosaceus* F28-8

比对质谱鉴定的多肽序列, 结果见表 1。条带 a 被鉴定为 N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶 (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase), 理论相对分子量为 83.5 kDa。条带 b 被鉴定为含有 LysM 肽聚糖结合

蛋白 (LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein), 理论相对分子量为 51.1 kDa。

2.3 表面蛋白对戊糖片球菌表面性质的影响

表面蛋白对戊糖片球菌表面性质的影响见图 6。

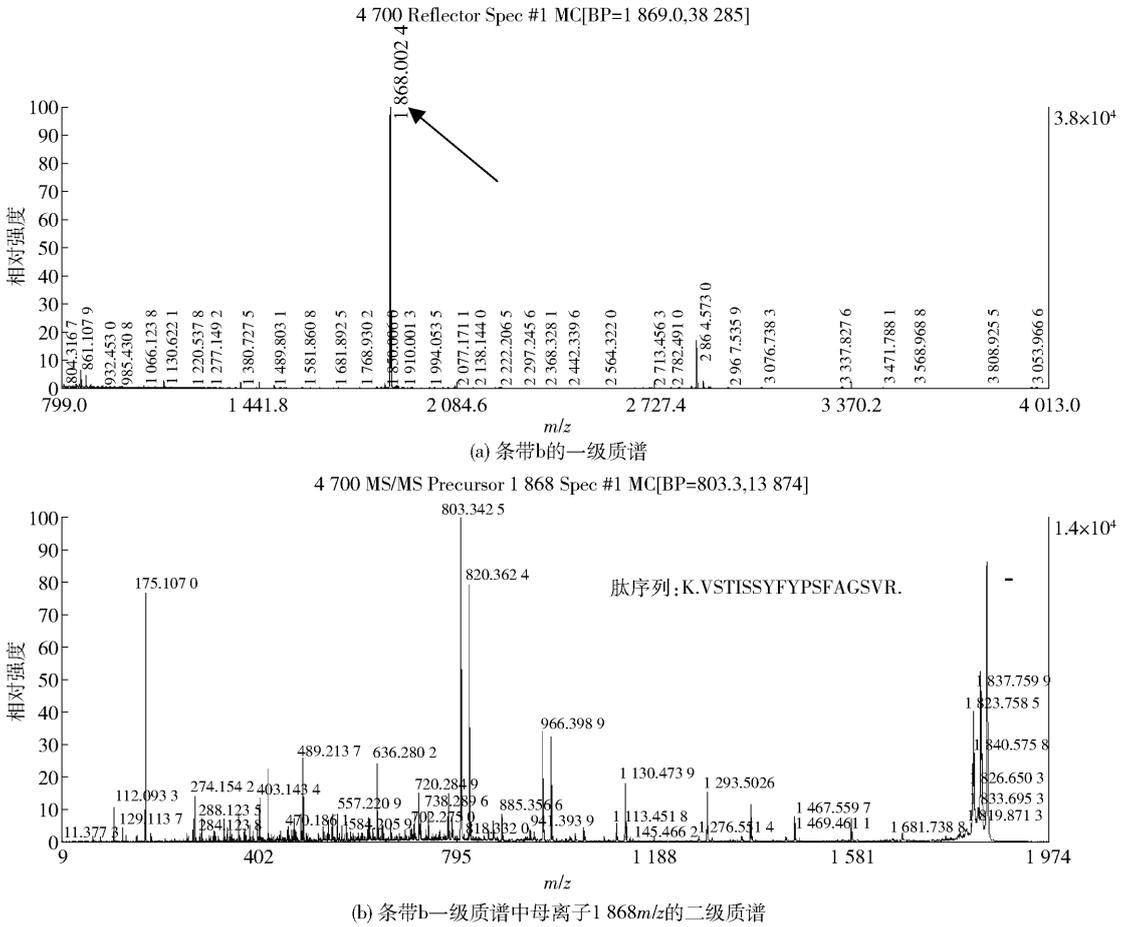
图5 *P. pentosaceus* F28-8 表面蛋白中条带b的质谱分析Fig. 5 Mass spectrometric analysis of band b in surface protein of *P. pentosaceus* F28-8

表1 蛋白质谱鉴定结果

Tab. 1 Protein mass spectrometry identification

| 条带 | NCBI 检索号 | 理论相对分子量/kDa | 分值 | 蛋白名称 |
|----|-----------------|-------------|-----|--|
| a | gi ASCO8890 | 83 466 | 497 | N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase |
| b | gi WP_023440519 | 51 087 | 239 | LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein |

经 LiCl 处理失去表面蛋白后,戊糖片球菌的表面疏水性、自动聚集能力、表面电荷(三氯甲烷处理)和表面电荷(乙酸乙酯处理)均显著性降低,降幅分别达到 34.4%、19.4%、56.1%、19.0%。由此推断,表面蛋白结构对戊糖片球菌维持表面疏水性、自动聚集能力和表面电荷起重要作用,进而可能对菌株的非特异性黏附能力产生影响。

2.4 戊糖片球菌表层提取物对黏附性的影响

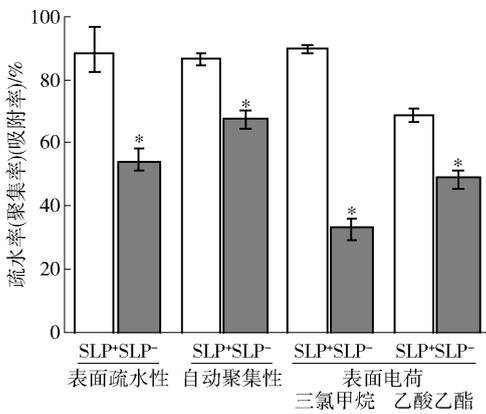
鉴于 2.3 结果,对去除表面蛋白的戊糖片球菌与未去除表面蛋白的戊糖片球菌的黏附能力进行了研究,结果见图 7。图 7(a)中,相比正常戊糖片球菌,去除表面蛋白导致戊糖片球菌的黏附力显著降低,对胶原蛋白的黏附率降低了 48.2%,说明表面

蛋白对戊糖片球菌的黏附能力至关重要。

进一步研究了戊糖片球菌表面蛋白对 *S. enterica* subsp. CICC 21513 和 *S. aureus* CICC 21600 与胶原蛋白黏附作用的影响。图 7(b)和图 7(c)中,添加戊糖片球菌表面蛋白导致 *S. enterica* subsp. CICC 21513 和 *S. aureus* CICC 21600 黏附胶原蛋白的能力显著下降,黏附菌落数均有显著减少。*S. enterica* subsp. CICC 21513 和 *S. aureus* CICC 21600 黏附菌落数分别降低了 74.59% 和 81.16%。由此可见,戊糖片球菌的表面蛋白参与了不同菌株黏附胶原蛋白的过程,降低了致病菌的黏附性。

2.5 戊糖片球菌表面蛋白的抑菌性分析

鉴于戊糖片球菌 F28-8 表面蛋白具有 N-乙酰



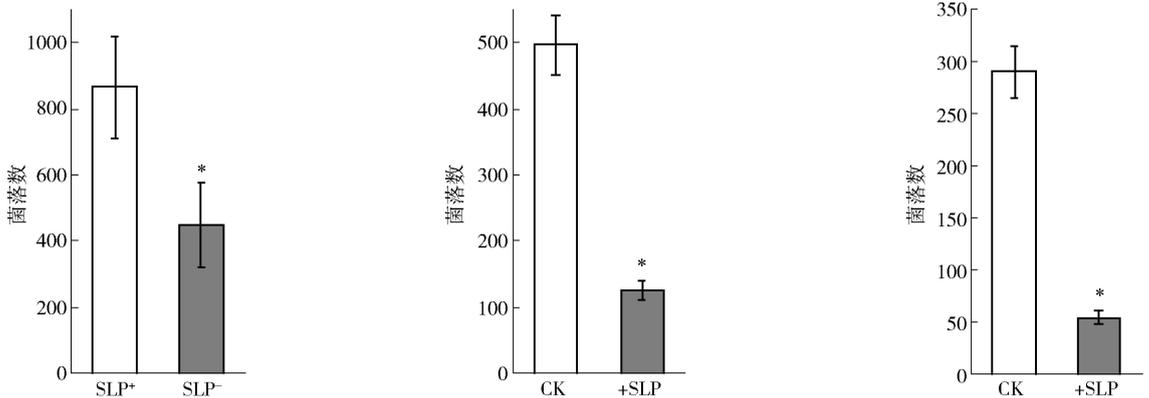
表面疏水性: 菌体与二甲苯混合后对其的吸附率; 自动聚集性: 菌体涡旋并静置 4 h 后的自动聚集能力; 表面电荷: 菌体与三氯甲烷 (乙酸乙酯) 混合后对其的吸附率; SLP⁺: 未去除表面蛋白菌株, SLP⁻: 去除表面蛋白菌株; “*”表示实验组和对照组差异显著 ($P < 0.05$)。

图6 *P. pentosaceus* F28-8 失去表面蛋白前后的表面性质
Fig. 6 Surface properties of *P. pentosaceus* F28-8 before and after loss of surface protein

基胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性,以及对致病菌黏附能力的负作用,进一步研究了戊糖片球菌表面蛋白对 *S. enterica* subsp. CICC 21513 和 *S. aureus* CICC 21600 的抑菌活性,结果见图 8。图 8 显示,在培养 10 h 时,相比对照组,添加表面蛋白的处理组对 *S. enterica* subsp. CICC 21513 和 *S. aureus* CICC 21600 的抑菌率分别为 31.5% 和 15.6%。结果表明,戊糖片球菌表面蛋白对 *S. enterica* subsp. CICC 21513 的抑菌效果稍强于 *S. aureus* CICC 21600,原因可能是 LiCl 提取物中除了能有效抑制革兰氏阳性菌的抑菌因子外,还存在能抑制革兰氏阴性菌的其他抑菌因子。有关抑菌因子的分离、鉴定及其抑菌谱,有待进一步研究。

3 结论

通过透射扫描电镜、SDS-PAGE、MALDI-TOF-MS 等手段证实 *P. pentosaceus* F28-8 存在表面结构

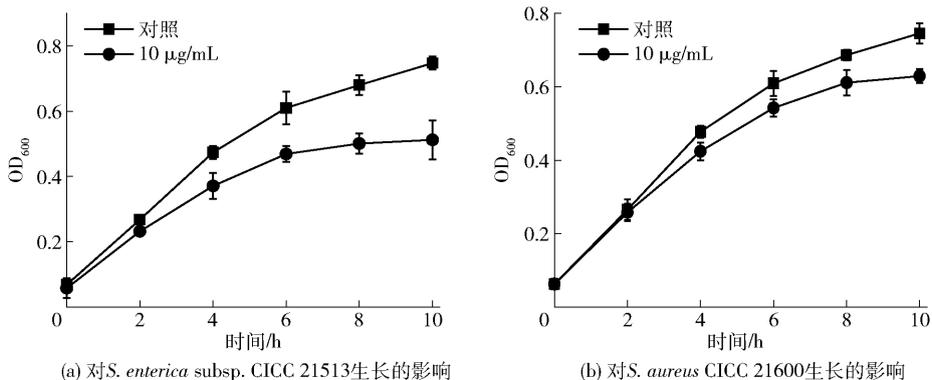


(a) 对 *P. pentosaceus* F28-8 黏附胶原蛋白的影响 (b) 对 *S. enterica* subsp. CICC 21513 黏附胶原蛋白的影响 (c) 对 *S. aureus* CICC 21600 黏附胶原蛋白的影响

SLP⁺: 未去除表面蛋白菌株; SLP⁻: 去除表面蛋白菌株; CK: 未添加表面蛋白组; +SLP: 添加表面蛋白组; “*”表示实验组和对照组有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图7 *P. pentosaceus* F28-8 表面蛋白对菌株黏附的影响

Fig. 7 Effect of *P. pentosaceus* F28-8 surface protein on adhesion of strains



(a) 对 *S. enterica* subsp. CICC 21513 生长的影响

(b) 对 *S. aureus* CICC 21600 生长的影响

图8 *P. pentosaceus* F28-8 表面蛋白对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌生长的影响

Fig. 8 Effect of *P. pentosaceus* F28-8 surface protein on growth of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*

及表面蛋白,经鉴定表面蛋白中含有主要成分 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶和 LysM 肽聚糖结合域蛋白。进一步研究表明,戊糖片球菌表面蛋白对菌株的表面性质具有极显著影响($P < 0.01$),该表面蛋白可竞争性抑制致病菌的黏附作用,并具备一定的抑菌作用。

参考文献:

- [1] GOSALBEZ L, RAMON D. Probiotics in transition: novel strategies[J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(4):195-196.
- [2] 余萍, 吴少勤. 益生菌及其应用研究进展[C]//全国益生菌与健康及应用技术交流讨论会. 沈阳: 汉臣氏生物医药开发有限公司, 2009:173-176.
YU P, WU S Q. Advances in research on probiotics and their applications[C]//National Symposium on Probiotics and Health and Applied Technology Exchange. Shenyang: Hanson Biomedical Development Co Ltd, 2009:173-176.
- [3] 曹振辉, 潘洪彬, 张鲜焰, 等. 戊糖片球菌的益生功能及其在食品科学领域中的应用[J]. 安徽农业科学, 2016(9):106-108.
CAO Z H, PAN H B, ZHANG X Y, et al. Application of the beneficial function of *Pediococcus pentosaceus* in the field of food science[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2016(9):106-108.
- [4] 杨振泉, 靳彩娟, 张咪, 等. 高黏附性戊糖片球菌的筛选、标记及其表面疏水与自凝聚性特征[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(9):926-934.
YANG Z Q, JIN C J, ZHANG M, et al. Screening and molecular marking of highly adhesive *Pediococcus pentosaceus* and the characteristics of their surface hydrophobicities and auto aggregation abilities[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(9):926-934.
- [5] 何名芳, 陈卫平. 乳酸菌抑制致病菌黏附作用机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(20):386-389.
HE M F, CHEN W P. The development of the *Lactobacillus* adhesive effects mechanism in inhibiting the pathogen microorganism[J]. Food Industry and Technology, 2013, 34(20):386-389.
- [6] 余银, 罗芳, 高婉茹, 等. 乳酸菌黏附特性的研究新进展[J]. 食品研究与开发, 2018(4):218-224.
- [7] SHE Y, LUO F, GAO W R, et al. The new advance of research on the adhesion of *Lactobacillus* [J]. Food Research and Development, 2018(4):218-224.
- [8] ROOS S, JONSSON H. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. [J]. Microbiology, 2002, 148(2):433-442.
- [9] SILLANPAA J, MARTÍNEZ B, ANTIKAINEN J, et al. Characterization of the collagen-binding S-layer protein, cbsA of *Lactobacillus crispatus* [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(22):6440-6450.
- [10] SUN Z, LI P, LIU F, et al. Synergistic antibacterial mechanism of the *Lactobacillus crispatus* surface layer protein and nisin on *Staphylococcus saprophyticus* [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):265.
- [11] ZHANG B, ZUO F, YU R, et al. Comparative genome-based identification of a cell wall-anchored protein from *Lactobacillus plantarum* increases adhesion of *Lactococcus lactis* to human epithelial cells [J]. Scientific Reports, 2015, 5(1):14109.
- [12] JOHNSON-HENRY K C, HAGEN K E, GORDON-POUR M, et al. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells [J]. Cellular Microbiology, 2010, 9(2):356-367.
- [13] RAHMAN M M, KIM W S, KUMURA H, et al. Auto-aggregation and surface hydrophobicity of bifidobacteria [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, 24(8):1593-1598.
- [14] KOS B, SUSKOVIC J, VUKOVIC S, et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(6):981-987.
- [15] HORIE M, ISHIYAMA A, FUJIHIRA-UEKI Y, et al. Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(3):396-403.
- [16] PRADOACOSTA M, RUZAL S M, ALLIEVI M C, et al. Synergistic effects of the *Lactobacillus acidophilus* surface layer and nisin on bacterial growth [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(3):974-977.

Surface Properties of *Pediococcus pentosaceus* and Antibacterial Effect

SUN Yanfei¹, CHEN Rui^{1,2}, WANG Lu¹, JIANG Rui¹, DENG Chun¹,
HU Yuan^{1,2}, RAO Shengqi^{1,2,*}

(1. School of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Safety Control, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: The growth condition and analysis of acid production capacity showed that *Pediococcus pentosaceus* F28-8 had a good acid adaptability, and the surface structure was observed with transmission electron microscopy. The S-layer was extracted with 5 mol/L LiCl and analysed by SDS-PAGE and MALDI-TOF-MS. It was found that the S-layer of F28-8 contained a kind of surface protein with molecular weight of 83.5 kDa and 51.1 kDa. The further surface property test, collagen adhesion test and antibacterial experiment showed that the stripping of surface protein significantly reduced the surface properties (automatic aggregation ability, surface hydrophobicity and surface charge), with a decrease of 19.0% – 56.1%. The surface protein of F28-8 extracted by LiCl significantly reduced the adhesion of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* to collagen, with a decrease of 74.59% and 81.16%. The inhibitory rate of surface protein of F28-8 extracted by LiCl against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* reached 31.5% and 15.6%, respectively. The results indicate that surface protein of *P. pentosaceus* F28-8 can change the surface properties of cells, enhance their ability to inhibit the adhesion of pathogenic bacteria and exhibit certain antibacterial ability, and has certain application potential in the field of antibacterial agents.

Keywords: *Pediococcus pentosus*; surface protein; surface properties; adhesion; bacteriostasis

(责任编辑:叶红波)

(上接第 53 页)

Effects of *Rhizoma gastrodiae* Ethanol Extracts on Mycelia Polysaccharides and β -Glucan Biosynthesis Quantity of *Grifola frondosa*

ZHONG Min¹, TANG Qingli¹, WU Tianxiang^{1,2,*}, LU Hongyun¹, NIE Wenqiang¹
(1. School of Liquor & Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China;
2. Mingde College, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: *Rhizoma gastrodiae* ethanol extracts were supplemented into the fermentation system of *Grifola frondosa* to study effects of *R. gastrodiae* ethanol extract on mycelia biomass, mycelia polysaccharides and β -glucan yield of *Grifola frondosa* by submerged fermentation. In addition, the key ingredients in *Rhizoma gastrodiae* ethanol extracts were identified. Meanwhile, the appropriate concentration of characteristic constituents of *R. gastrodiae* ethanol extracts were determined by high performance liquid chromatography. The results showed that *R. gastrodiae* ethanol extracts with the concentration of 7 g/L could significantly promote cell growth, mycelia polysaccharides, and β -glucan yield. Under this concentration, the biomass, mycelia polysaccharides and β -glucan yield reached 1.708 g/L, 5.974% and 2.055 mg/g, and significantly ($P < 0.05$) increased by 0.36, 1.29, and 1.44 times, respectively, compared with the control (without additives). The characteristic ingredients of *R. gastrodiae* ethanol extracts were gastrodin (GA), p-hydroxybenzyl alcohol (HA), and p-hydroxybenzaldehyde (HBA), and the contents were 5.837 5, 1.107 2, and 0.660 1 mg/g, respectively. Meanwhile, HBA was the most responsible ingredients to promote the biomass, mycelia polysaccharides and β -glucan yield in submerged culture of *Grifola frondosa* and the optimum supplemental levels were 100, 250, and 150 mg/L, respectively.

Keywords: characteristic constituents of *Rhizoma gastrodiae*; *Grifola frondosa*; mycelia polysaccharides; β -glucan; p-hydroxybenzaldehyde

(责任编辑:张逸群)